



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Área: Bioquímica Clínica

**Libro electrónico sobre microorganismos de *Staphylococcus* y
Streptococcus de importancia clínica**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

Luis Fernando Hernández Santos

Director de tesis: Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Asesor de tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Lugar de desarrollo:

**LABORATORIO 1. PLANTA ALTA, DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA
DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA**

**Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIME PE202716
CDMX.2016**





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.

FILOSOFÍAS

Si no conozco algo, lo investigaré

- Louis Pasteur -

La suerte favorece sólo a la mente preparada

- Albert Einstein -

La ciencia es el gran antídoto contra el veneno de la superstición

- Adam Smith -

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Lucy y José Luis gracias por su cariño, por depositar su confianza en mi y por todos sus esfuerzos que me dieron la oportunidad de cumplir mis objetivos; Papi y mami juntos lo logramos!!!

A mis hermanos Michel, Diana y Karen gracias por su hermandad, los quiero nunca lo olviden

A mi directora Mtra. Yolanda Flores y asesor Dr. Luis Mora, agradezco por haberme permitido realizar la tesis bajo su tutoría, por su paciencia y dedicar su tiempo para poder culminar este trabajo. Gracias!!!

Mis sinodales QFB. Paty Vidal, Mtra. Marisol Ortíz y QFB. Manuel Orduña agradezco mucho por sus asertivas correcciones, sus comentarios que enriquecieron este trabajo y por brindar de su valioso tiempo para la revisión de este trabajo. Gracias!!!

A la jefa, mi jefecita Dra. Marlene Rodríguez agradezco tu apoyo incondicional, por darme trabajo pero sobre todo por brindarme tu amistad!!! Eres una persona maravillosa gracias por haberme permitido conocerte mi marle.

A la banda Alan, Pelos, Mike, Campa, Carretus, Choche, Tavo, Adrian, Pollo, Alex, Kechol, Ramón, Gaby Zea, Mario (socio), Jesualdo, Irvin boy, Isma y los que faltan brindo por esos momentos épicos de aventuras que convivimos cuando fuimos estudiantes de la facultad, nunca lo olvidare; gracias por su amistad caballeros.

A todos los compañeros que conocí durante mi estancia en el laboratorio de la UMIEZ esta tesis va también por ustedes muchachos.

Al Dr. Ruben Marroquin y al Químico Armandaro muchas gracias por su patrocinio y por el apoyo recibido y como olvidar esos chistes que inyectaban alegría al laboratorio.

+ A Jesucristo +

Gracias por acompañarme siempre en mi camino

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	2
1. Libro electrónico.....	2
Ventajas.....	3
Tipos de libros electrónicos	5
Aspectos pedagógicos.....	5
Educación pedagógica digital para la enseñanza y aprendizaje.....	6
2. El mundo microbiano	7
3. <i>Staphylococcus</i> de importancia clínica	7
3.1. Características generales de <i>Staphylococcus sp</i>	8
3.2. Factores de patogenicidad y manifestación clínica	9
4. Familia <i>Streptococcaceae</i>	11
4.1. Características generales de <i>Streptococcus sp</i>	12
4.2. Factores de patogenicidad y manifestación clínica.....	12
4.3. Clasificación de Lancefield.....	14
5. Siembra e identificación de <i>Staphylococcus</i> y <i>Streptococcus</i>	15
5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
5.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15
5.3 <i>Streptococcus pyogenes</i>	16
5.4 <i>Streptococcus agalactiae</i>	17

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
OBJETIVOS.....	19
DIAGRAMA DE FLUJO.....	20
MÉTODO.....	21
RESULTADOS.....	23
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
CONCLUSIÓN.....	32
RECOMENDACIONES.....	33
REFERENCIAS.....	34
REFERENCIAS DE FIGURAS.....	38

INTRODUCCIÓN

Actualmente la información de los libros electrónicos proporcionan a los estudiantes a obtener fuentes de acceso a la información para la consulta de un tema de interés, ya que un libro su contenido electrónico se encuentra organizado como un libro ordinario, cuenta con un formato visualmente atractivo por contener esquemas e imágenes que vuelven más accesible y comprensible el texto. Generalmente un libro electrónico es considerado un material didáctico que ha llegado a sumarse como una nueva herramienta para la enseñanza y aprendizaje. Por ello la elaboración del presente libro electrónico que se encuentra en CD-ROM contiene información útil y relevante sobre microorganismos de *Staphylococcus sp* y *Streptococcus sp* de importancia clínica el cual se encuentra estructurado por cuatro capítulos y un anexo. El capítulo I contiene información sobre introducción a la microbiología hecho para alumnos que tienen su primer acercamiento con la asignatura. En el capítulo II redacta *Staphylococcus* de importancia clínica. En el capítulo III se encuentra información sobre la Familia *Streptococcaceae*. En el capítulo IV se encuentran los resultados obtenidos de la siembra e identificación de bacterias de importancia clínica como el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*. En el apartado de anexos contiene información de cómo llevar a cabo las técnicas de laboratorio como tinciones, pruebas bioquímicas, pruebas especiales, entre otros para la identificación de dichas bacterias de importancia clínica que se trabajaron en la parte experimental, además este apartado cuenta con imágenes de resultados de referencia.

MARCO TEÓRICO

1. Libro electrónico

Un libro electrónico, también conocido como e-Book, ecolibro o libro digital es una publicación cuyo soporte no es el papel impreso, sino un archivo electrónico que no se degrada y puede ser reproducible. La innovación del libro electrónico fue integrar al texto recursos multimedia como: sonidos, videos, ilustraciones, gráficas tridimensionales e hipervínculos, lo que permite ser más atractivo para el usuario. Además las ventajas del uso de un libro electrónico generan ahorros en encuadernación, reimpresión y gastos en hojas de papel. Por otra parte su capacidad de almacenamiento por volumen es de alta capacidad por disco (58.000 imágenes/ disco, cifra que constantemente está cambiando), permite almacenar gran cantidad de información que cuenta con tablas, diagramas, iconos e ilustraciones que pueden estar organizadas del mismo modo que las de un libro impreso.

Por lo general los formatos utilizados para diseñar un libro electrónico son PDF, publicación electrónica (epub) , mobipocket, entre otros y para su lectura al utilizar la tinta electrónica a blanco y negro ésta no tiene retroiluminación, por lo tanto no hay cansancio alguno para la vista, pudiéndose prolongar así por varias horas la lectura sin afectar la vista del usuario. Conforme avanza la tecnología, el libro electrónico ha encontrado la forma de mejorar los libros ordinarios ya que se puede almacenar y trasladar gran cantidad de libros electrónicos en cualquier dispositivo que cuente con un ordenador, memoria expandible y pueda leer formatos en PDF^{1,2}.

Los libros electrónicos se refieren a una publicación cuyo soporte no es un papel sino que su texto se presenta en formato digital y se almacena en diskette, CD-ROM, USB, computadoras portátiles, entre otros dispositivos electrónicos.

Sin la limitación que impone la impresión y la encuadernación, los libros electrónicos ofrecen enlaces de hipertexto, ejecutan búsquedas de palabras clave, proporcionan notas marginales y amplían la noción del conocimiento y aprendizaje de muchas otras maneras. Algunos de los beneficios de utilizar libros electrónicos es que no pesan, son portátiles, duran sin arruinarse, no se desgastan como las hojas de un libro impreso ya que después de un tiempo las hojas se ponen amarillas. Por otra parte se pueden descargar los libros electrónicos a través de internet en cuestión de minutos y como prioridad se pueden traducir los textos al idioma que se desee^{3, 4}.



Figura.1 Libro electrónico¹

Ventajas

- La información cargada en un libro electrónico es rápida, económica y ecológica.
- Su enorme capacidad de almacenaje.
- Facilidad de transportar el ejemplar electrónico.
- Busca los fragmentos de texto que interese de forma instantánea.
- No se dañan con facilidad debido a que se encuentran en un CD-ROM.
- El desarrollo de programas de enseñanza basados en el autoaprendizaje.
- Costo mínimo por libro electrónico.
- Son novedosos.
- Se puede reproducir en CD-ROM.
- Los libros electrónicos tienen herramientas para facilitar la lectura (buscar, resaltar, insertar comentarios, etc.)
- El diseño del libro electrónico ayuda a mejorar la comprensión del texto.
- Su innovación multimedia de los libros electrónicos ayudan a mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje.
- Se pueden guardar muchos ejemplares en una computadora o en cualquier dispositivo portátil, ya que este tipo de libros ocupan poca memoria.
- Son innovadores.

Por otra parte la existencia de libros electrónicos no representa una amenaza para las obras impresas en papel, no existe competencia entre ellos, pues los intereses de los consumidores de ambos productos difieren⁵.

Tipos de libros electrónicos

- ✓ Libros hipermedia: Son libros multimedia que cuentan con características especiales para una mejor organización textual electrónica.
- ✓ Libros Multimedia: Se pueden realizar combinaciones del texto, imágenes estáticas, animación y sonido todo en un medio de difusión.
- ✓ Libros de dibujos estáticos: Son los que poseen una colección de dibujos inéditos estáticos.
- ✓ Libros de dibujos animados: Son los que contienen dibujos animados hiperactivos en vez de imágenes fijas.
- ✓ Libros parlantes: Incluyen sonidos grabados y diversas técnicas de sonidos hiperactivos.
- ✓ Libros telemáticos: Benefician a los libros multimedia y redes de comunicación electrónica, esto para ofrecer servicios como correo electrónico en multimedia⁶.

Aspectos pedagógicos

La tecnología educativa como disciplina pedagógica es un excelente apoyo para el alumno, ya que genera un conocimiento y desarrollo de estrategias de aprendizaje autónomo sin complejos. Por ello la vanguardia de la nueva tecnología del libro electrónico para la educación cuenta con elementos multimedia, acceso a la red y puede permitir el acceso rápido a la información en cualquier sitio, sin embargo la educación pedagógica ya está aprovechando estos recursos como herramienta útil para mejorar el aprendizaje del estudiante.

Educación pedagógica digital para la enseñanza y aprendizaje

Un libro electrónico educativo deberá al menos ofrecer un material didáctico en formato digital, de manera que tanto el profesor pueda crearlo como el alumno pueda utilizarlo. Además este material que cuenta con un texto en formato digital y que presenta tecnología multimedia el cual lo vuelve más atractivo, impulsará al estudiante a generar un mejor aprendizaje.

La tecnología educativa prepara, las condiciones del aprendizaje de manera que éste sea más eficiente y las habilidades del alumno aumenten en lugar de verse restringidas, por ello el potencial educativo que poseen los textos electrónicos y los beneficios que estos ofrecen ayudarán al estudiante, por lo que sus componentes multimedia promueven la capacidad de retroalimentación y el desarrollo de independencia intelectual de los lectores ya que las nuevas tecnologías de educación incrementan la productividad intelectual del alumno^{7, 8}.

Los componentes educativos electrónicos son frecuentemente diseñados para la enseñanza y aprendizaje, esto ocurre por la interacción de los estudiantes con los elementos que se presentan en un libro electrónico. Los textos electrónicos representan una alternativa como fuentes de búsqueda de información en el proceso investigativo por lo tanto favorecen el aprendizaje. Por otra parte es necesario entonces, que los docentes incorporen nuevas tecnologías en especial las fuentes de información electrónica en el salón de clases, a los proyectos pedagógicos y de investigación.

El aprendizaje puede ser enriquecido por medios virtuales de la siguiente manera:

- 1- Materiales didácticos, objetos tales como libros, revistas, apuntes, entre otros.
- 2- Contexto natural, sería enriquecido a través de los sistemas de realidad virtual, Simuladores y videos^{9, 10}.

2. El mundo microbiano

Los microbios también denominados microorganismos son seres vivos diminutos que presentan múltiples formas y tamaños que no se pueden ver a simple vista ya que los microbios sólo pueden ser visualizados a través de un microscopio; el grupo incluye bacterias que son células procariotas que no poseen núcleo celular definido, los hongos y parásitos protozoos son células eucariotas que poseen un núcleo celular definido, los virus que son parásitos intracelulares obligados que tienen en su interior ADN y ARN y también incluyen algas marinas.

Los microorganismos tienen muchas aplicaciones comerciales a nivel industrial ya que algunos microbios son manipulados para la producción de antibióticos, ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas y alcoholes. Además de la producción principal de vinagre, encurtidos, suero de leche, queso, yogurt y bebidas alcohólicas ^{11, 12}.

3. *Staphylococcus* de importancia clínica

El género *Staphylococcus* contiene al menos 30 especies, los tres de importancia clínica son: *Staphylococcus aureus* que es coagulasa positivo lo que los difiere de las otras especies y su patogenicidad varía provocando intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas. *Staphylococcus epidermidis* es coagulasa negativo, son normales en la piel, aunque suelen causar infecciones casi siempre vinculados

con dispositivos y cateteres implantados. El *Staphylococcus saprophyticus* es causa principal de infección en vías urinarias (IVU), uretritis y vaginitis. El *Staphylococcus aureus* habitualmente forma colonias de color amarillo o dorado cuando se desarrollan en medios de cultivo que contengan altas concentraciones de salinidad (NaCl al 7.5 %). El aislamiento primario de las colonias de *Staphylococcus epidermidis*, en general son colonias de color gris o blanco, muchas colonias desarrollan pigmentos sólo después de incubación prolongada. El *Staphylococcus saprophyticus* sus colonias por lo general son de color grisáceo, en agar sangre es no hemolítico, es coagulasa negativo y en el humano la bacteria se encuentra en la vagina y la uretra. Además, el género de *Staphylococcus sp* se puede encontrar principalmente en muestras como pus, esputo, cultivo nasal y cultivo faríngeo y líquido cefalorraquídeo^{13, 14}.

3.1. Características Generales de los *Staphylococcus*

Son bacterias en forma de diplococo o agrupadas en racimo de uva; son Gram positivos; no forman esporas y no presentan flagelos. Su metabolismo es anaerobio facultativo, son catalasa positiva, oxidasa negativo, fermentan carbohidratos y son alfa, gamma y beta hemolíticos en agar sangre. Los *Staphylococcus* se localizan en piel y mucosas del ser humano; también se encuentran en animales de sangre caliente, en las superficies de objetos inocuos, en el suelo, suspendidos en el aire, agua y alimentos contaminados. Los *Staphylococcus* son relativamente resistentes a la desecación por calor (resisten 50°C durante 30 min), pero se inhiben con facilidad a ciertas sustancias como por

ejemplo el hexaclorofeno al 3 %, además este género muestra susceptibilidad variable a muchos antimicrobianos.

3.2 Factores de patogenicidad y manifestación clínica

Enzimas

Catalasa

Los *Staphylococcus* contienen citocromo catalasa que descomponen el H_2O_2 en $H_2O + O_2$, por lo que esta enzima es antifagocítica.

Coagulasa

Es específica de *Staphylococcus aureus* actúa transformando el fibrinógeno en fibrina formando una capa sobre la bacteria que le protege de la fagocitosis.

Lipasas

Actúa sobre diferentes sustratos (aceites, grasas, ceras, etc.) que permite colonizar áreas de la piel con altas concentraciones de éstas.

Estafiloquinasa

Es una fibrinolisisina que activa el plasminógeno, los transforma en plasmina y actúa rompiendo enlaces peptídicos que lisan la fibrina.

Hialuronidasas

Actúa sobre el ácido hialurónico que se encuentra presente en el pegamento de las células de los tejidos, favoreciendo así la difusión de la bacteria en los tejidos.

Nucleasas

Tienen propiedades endonucleolíticas y exonucleolíticas que pueden actuar sobre el ADN y el ARN.

Gelatinasa

Esta enzima es segregada como gelatinasa exocelular para degradar proteínas.

Beta- Lactamasa

Es una enzima que posee el género *Staphylococcus* su función es desdoblar el anillo β - lactámico de la penicilina (penicilina β - lactamasa-1) por lo tanto la penicilina pierde su efectividad.

Toxinas Extracelulares

Toxina Alfa

Es una toxina con acción hemolítica sobre eritrocitos y además lesiona plaquetas.

Toxina Beta

Es una esfingomielinasa que actúa sobre esfingomielina de la membrana de los eritrocitos produciendo hemólisis.

Toxina Delta

Es hemolítica, lesiona linfocitos, plaquetas y eritrocitos.

Toxina Gama

Solo produce lisis de eritrocitos.

Toxina Exfoliativa

Es toxina específica de *Staphylococcus aureus* la cual produce descamación.

Toxina del síndrome de shock Tóxico (TSST)

Induce fiebre, rash y daña órganos. Es una complicación muy severa, con alta mortalidad, presenta fiebre y shock progresivo que va desarrollando hipotensión arterial hasta pérdida de la presión venosa, taquicardia, taquipnea y alteración del Sistema Nervioso Central^{16, 17}.

4. Familia *Streptococcaceae*

Rebeca Craighill Lancefield estudió la universidad de Columbia, New York y fue química bacterióloga de profesión. Rebeca realizó la clasificación serológica extrayendo los carbohidratos de la pared celular de los *Streptococcus* hemolíticos, analizó el carácter antigénico y la especificidad de la membrana, mediante el análisis de algunas proteínas de la pared identificó los serotipos M y T. Los antígenos destacados en el sistema de grupos de Lancefield son polisacáridos de la pared celular (*Streptococcus* del grupo A, B, C, F y G) y los ácidos lipoteicoicos de la pared celular (especies de *Enterococcus*) ya que estas características mencionadas sirvieron para diferenciar las cepas no patógenas, con las cepas beta-hemolíticas. Lancefield clasificó el tipo de hemólisis que producen los *Streptococcus* en medios de Agar Sangre de la siguiente manera:

Hemólisis alfa

Hemólisis parcial y la zona de crecimiento de colonias aparece rodeada de un halo verdoso

Hemólisis Beta

Destrucción total de eritrocitos y el halo que rodea las colonias es totalmente transparente.

Hemólisis Gamma

No hay lisis de eritrocitos y no genera halo alrededor de colonia.

Hemólisis alfa-prima

Un pequeño halo de eritrocitos parcialmente lisados permanecen adyacentes a la colonia, rodeada de una zona de hemólisis completa que se extiende en el cultivo.

4.1. Características del género *Streptococcus Sp.*

El género *Streptococcus* son bacterias Gram positivas esféricas que por lo general forman cadenas largas en cultivos líquidos y cadenas cortas o diplococos en medios sólidos, son inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos, aunque algunas cepas crecen mejor en condiciones anaerobias, si bien casi todas las especies crecen en el aire, el crecimiento de la mayoría de ellas es estimulado por el aumento del CO₂, los *Streptococcus* son homofermentadores, lo que significa que el único producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico, sin producción de gas y H₂S los *Streptococcus* son catalasa y oxidasa negativo^{18, 19}.

4.2. Factores de patogenicidad y manifestación clínica

Hemolisinas

Estreptolisina O

Es una exoenzima inmunogénica tóxica que actúa sobre eritrocitos humanos que se inactiva fácilmente con la presencia de O₂ y es producida principalmente por *Streptococcus* β- hemolítico que pertenece al grupo A. La bacteria en agar sangre de carnero es capaz de lisar los eritrocitos produciendo β-hemolisis alrededor de las colonias.

Estreptolisina S

Es el agente causante de las zonas hemolíticas alrededor de las colonias de *streptococcus* que crecen sobre la superficie de placas de agar sangre, se elaboran en presencia de suero de allí el nombre de estreptolisina S, no es antigénica, su efecto tóxico suele ser más intenso en riñón (nefrotóxico) y no se inactiva en presencia de oxígeno.

Toxina Eritrogénica

Es causante del exantema de la fiebre escarlatina y se produce en algunas cepas de *Streptococcus pyogenes* que se encuentran parasitadas por bacteriófagos en estado lisogénico. Además esta toxina es un potente pirógeno que actúa directamente en el hipotálamo produciendo fiebre en el humano.

Enzimas

Estreptoquinasa (fibrinolisisina)

Producida por la mayoría de los *Streptococcus* β -hemolíticos; provoca la transformación del plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica activa que dirige a la fibrina y a otras proteínas.

Estreptodornasa

Es una ADNasa que despolimeriza el ADN e induce la formación de anticuerpos.

Difosfopiridina nucleotidasa

Los *Streptococcus* que producen esta sustancia tienen la capacidad de destruir a los leucocitos.

Desoxirribonucleasas

Enzima que actúa sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) y cuando se acumula en las secreciones purulentas produce un material viscoso que atrapa a las bacterias permitiendo así su difusión.

Leucocidina

Es una enzima llamada Nicotinamida-adenina-dinucleótido-glucohidrolasa que tiene acción selectiva contra en el metabolismo de los leucocitos²⁰.

Cuadro 1. Clasificación de Lancefield y principales aspectos clínicos ^{21,22}.

Grupos de Lancefield	Género y especie	Hemólisis	Enfermedades al humano	Sitio localizado	Pruebas de laboratorio
A	<i>S. pyogenes</i>	β	Celulitis en heridas, Impétigo, Septicemia, Fiebre reumática, Glomerulonefritis y Erisipela	Faringe y piel	Disco de Bacitracina A, Anticuerpos fluorescentes, Aglutinación en látex Y Bactrim
B	<i>S. agalactiae</i>	β	Endocarditis, Neumonitis, Infección neonatal, Neumonía, Meningitis y Septicemia	Faringe, vagina, heces y orina	Prueba de Camp, Hidrolisis de Hipurato, Bilis Esculina y Aglutinación en látex
C	<i>S. dysgalactiae</i>	β	Sepsis puerperal, Infección de heridas, Endocarditis y Celulitis	Faringe, vagina y piel	Hidrolisis de Hipurato Fermentación de Trehalosa, sorbitol y Aglutinación en látex
D	<i>Enterococcus</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i>	α , β , γ	Infección del tracto genitourinario y gastrointestinal, Peritonitis, Endocarditis e Infecciones de heridas	Intestino grueso	Hidrolisis de Bilis – Esculina, Aglutinación en látex y PYR
H	<i>S. sanguinis</i>	α	Caries dentales, Endocarditis, Septicemia y Acceso cerebral	Boca, faringe, vagina y piel	Fermentación de inulina y Producción de polisacáridos, viscosos en caldo de sacarosa al 5 %
K	<i>S. salivarius</i>	α	Septicemia, Endocarditis, Sinusitis y Meningitis	Faringe y boca	Ácido a partir de glucosa, sacarosa, maltosa, no ácido a partir de glicerol, manitol y sorbitol
Sin grupo	<i>S. pneumoniae</i>	α	Neumonía lobar, Otitis, Endocarditis, Bacteriemia y Sinusitis	Faringe, boca y tráquea	Reacción de Quellung, Solubilidad de bilis y Susceptibilidad a la Optoquina
Grupo Viridians	<i>S. mutans</i>	β	Caries dental, Meningitis. Endocarditis y Bacteremia	Boca, dientes y faringe	Acidificación de carbohidratos y Aglutinación en látex

5. Siembra e identificación de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica

5.1 *Staphylococcus aureus*

Es un diplococo inmóvil que mide de 0.5-1 μm de diámetro, forma un aspecto de racimo de uvas en conjunto, en extendido de pus los cocos aparecen solos (coco), en pares (diplococo) o racimos, es Gram positivo, es β -hemolítico en medios de agar sangre, su metabolismo es anaerobio facultativo, no esporulado, es productor de la enzima coagulasa lo que la diferencia de las demás especies, licua la enzima gelatinasa, posee la enzima catalasa, carece de citocromo oxidasa y fermenta la mayoría de carbohidratos.

El *Staphylococcus aureus* producen toxinas denominadas toxina-1 del síndrome de choque tóxico al igual que la enterotoxina F y la exotoxina C pirógena, el prototipo del superantígeno en los humanos se vincula con la fiebre y afección de múltiples sistemas incluyendo erupción descamativa de la piel. Por otra parte la bacteria es sensible a la nobovicina y es resistente a la penicilina dejando a los antibióticos más eficaces para combatirlo como los del grupo aminoglucósidos, tetraciclina y antibióticos como cefalosporina, oxacilina, entre otros^{23, 24}.

5.2 *Staphylococcus epidermidis*

Es un diplococo inmóvil que mide de 0,5-1 μm de diámetro, es no esporulado, anaerobio facultativo, es catalasa positivo, coagulasa negativo y termonucleasa negativo, crece por respiración aeróbica por la fermentación de glucosa, sacarosa, lactosa y forma productos de ácidos terminales, no produce gas, es ureasa positivo

y es γ -hemolítico en agar sangre. Es parte de la biota normal en piel, aunque *S. epidermidis* suele ser patógeno en pacientes con sistema inmune comprometido por ser el blanco principal para desarrollar una infección; estas infecciones pueden ser tanto nosocomiales o adquiridas en la comunidad ya que representan una amenaza mayor para los pacientes hospitalizados por encontrarse dicho microorganismo en trasplantes de prótesis y catéteres cuando estos no están bien esterilizados. Otro problema resulta ser el uso continuo de antibióticos y desinfectantes en los hospitales, lo cual hace más resistente y virulenta a la bacteria^{25, 26}.

5.3 *Streptococcus pyogenes*

El *Streptococcus* del grupo A se presenta como célula oval o esférica, mide de 0,5-1 μm de diámetro, se encuentra agrupada en cadenas cortas en medios sólidos o en cadenas largas en cultivos líquidos, es Gram positivo, inmóvil, no esporulado, es β -hemolítico en medio de agar sangre, carece de la enzima catalasa y citocromo oxidasa y su metabolismo es anaerobio facultativo, crece en presencia de CO_2 , fermenta carbohidratos produciendo ácido láctico, ácido fórmico, etanol y dióxido de carbono. Las infecciones por esta bacteria se desaminan con mucha facilidad por gotitas respiratorias generadas al gritar, toser y estornudar a una distancia de 60 a 150 cm de un individuo sano. Su proteína "M" es una sustancia importante de virulencia de la bacteria, esta proteína tiene la apariencia de prolongaciones en la pared celular del *Streptococcus*. Cuando la sustancia se encuentra presente en los *Streptococcus* son virulentos y en ausencia de anticuerpos específicos tipo "M" pueden resistir la fagocitosis

efectuado por leucocitos polimorfonucleares. La bacteria es resistente a Optoquina, pero es sensible a Bacitracina y a la mayoría de los antibióticos^{27, 28}.

5.4 *Streptococcus agalactiae*

El *Streptococcus* del grupo B se caracteriza por agruparse en cadenas largas, es inmóviles, no esporulado, es Gram positivo, carecen de la enzima catalasa y oxidasa, es β - hemólítico en medios de agar sangre, su metabolismo es anaerobio facultativo, fermenta la mayoría de carbohidratos, es resistente a Bacitracina y a la sustancia de Optoquina. El *Streptococcus agalactiae* elabora un hidrato de carbono grupo específico que puede detectarse en las personas infectadas y para saber un diagnóstico rápido de la infección estreptocócica se puede detectar en líquido cefalorraquídeo, sangre y orina. Este microorganismo del grupo B se caracteriza principalmente por producir una proteína difusible y termoestable (Factor de CAMP), que interactúa con la β - hemolisina que es secretada por *S. aureus* el cual produce esfingomielinasa C ya que al unirse al factor de CAMP provocara un sinergismo de la hemólisis y por lo tanto se formara una punta de flecha en la siembra.

Es muy común encontrar a *Streptococcus agalactiae* como biota nativa del aparato genital, aparato respiratorio y aparato digestivo; la bacteria es un patógeno oportunista en adultos comprometidos por quimioterapia, Diabetes Mellitus tipo II, daño hepático y embarazo de alto riesgo. Además este microorganismo suele presentarse en infecciones como pielonefritis, gangrena, endocarditis, meningitis principalmente en neonatos y además puede provocar septicemia^{29, 30}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los módulos de Microbiología General y Microbiología Médica que se imparten en diferentes semestres de la Carrera Química Farmacéutico Biológica que pertenece a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; se manejan microorganismos de importancia clínica, que deben ser identificados correctamente.

Por ello se elaboró un libro electrónico sobre *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* el cual incluye información sobre cómo realizar cultivo e identificación de dichas bacterias. Este trabajo no pretende sustituir literatura especializada del tema, más bien ser un material de consulta para aquellos alumnos que cursan los módulos de Microbiología.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un libro electrónico sobre microorganismos de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica como material didáctico para los módulos de Microbiología, integrando fotografías de la siembra e identificación de las bacterias de interés.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Recopilar información relevante sobre los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*.
- ✓ Corroborar la identificación de las cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.
- ✓ Tomar fotografías a la parte experimental para incorporarlas al libro electrónico.
- ✓ Pasar el archivo de Word a formato PDF y digitalizar a libro electrónico.

DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODO

- 1- Buscar información referente a los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* en diferentes fuentes como: revistas y libros tanto impresos como electrónicos.
- 2- Luego se realizó la revisión y selección de información relevante.
- 3- Siguiendo las instrucciones del marbete se preparó medios de cultivo de Agar Sangre de Carnero al 5%, Agar Sal y Manitol, Agar Soya Trypticaseina, Agar Estreptosel, Agar S-110, Agar Chocolate, Agar Sangre de Caballo (Casman) y Agar Chapman.
- 4- Por estría cruzada se sembró y aisló las bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.
- 5- Los medios de cultivo se incubaron a 37 °C por 24 horas.
- 6- Posteriormente se realizó la lectura de morfología colonial.
- 7- Para la tinción de Gram se tomó una colonia aislada de cada microorganismo.
- 8- Siguiendo las instrucciones del marbete se prepararon las pruebas bioquímicas de TSI, MIO, SIM, LIA, Citrato de Simmons, Urea, RM-VP, y Carbohidratos con Campanas de Durham.
- 9- Se realizó la siembra de pruebas bioquímicas.
- 10- Se incubaron a 37 °C por 24 horas.
- 11- Realización de la lectura de los resultados obtenidos del metabolismo bacteriano.
- 12- Cada prueba se realizó por triplicado y se eligió el mejor resultado para la toma de fotografías, con el propósito de ser incorporadas al libro electrónico.

13- La información teórica y la parte experimental se integró en formato de Word.

14- La revisión final se llevó acabo en formato de Word.

15- El documento de Word se pasó a PDF.

16- Se digitalizó a libro electrónico.

RESULTADOS

Se elaboró un libro electrónico sobre *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica en formato PDF el cual se encuentra estructurado de la siguiente manera:

- ✓ Capítulo 1: Introducción a la Microbiología
- ✓ Capítulo 2: *Staphylococcus* de importancia clínica
- ✓ Capítulo 3: Familia *Streptococcaceae*
- ✓ Capítulo 4: Siembra e identificación de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica
- ✓ Anexos

Los capítulos del libro electrónico se encuentran integrados en CD-ROM y a continuación se presentan las imágenes de portadas de cada capítulo:

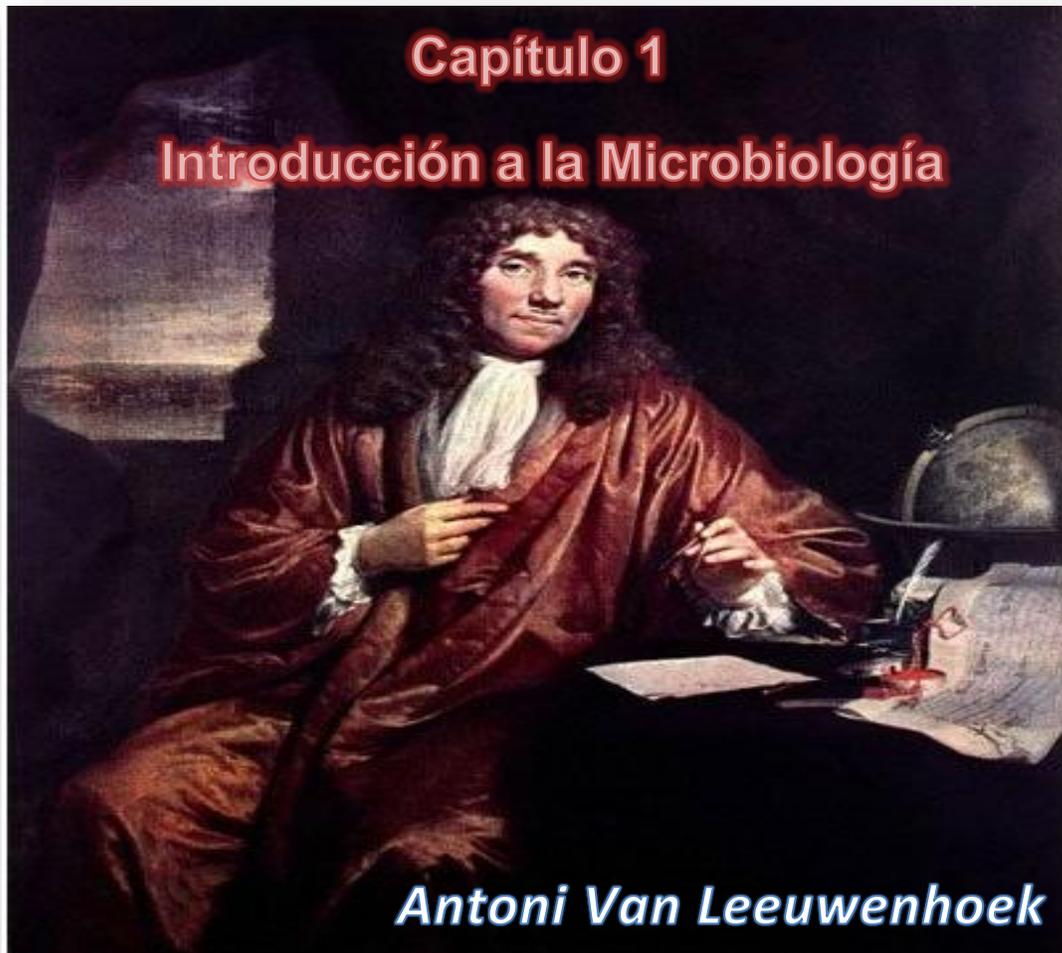


Figura 2. Capítulo 1 Introducción a la Microbiología²

En este apartado el alumno encontrara información sobre la microbiologia basándose en su historia, la importancia en el hombre, características generales de la célula procariota, requerimientos para el crecimiento microbiano, clasificación de medios de cultivo, tipos de siembra, morfología colonial, tinciones, tipos de esterilización, clasificación de antimicrobianos, métodos de sistemas comerciales manuales y automatizados, entre otros temas de importancia.

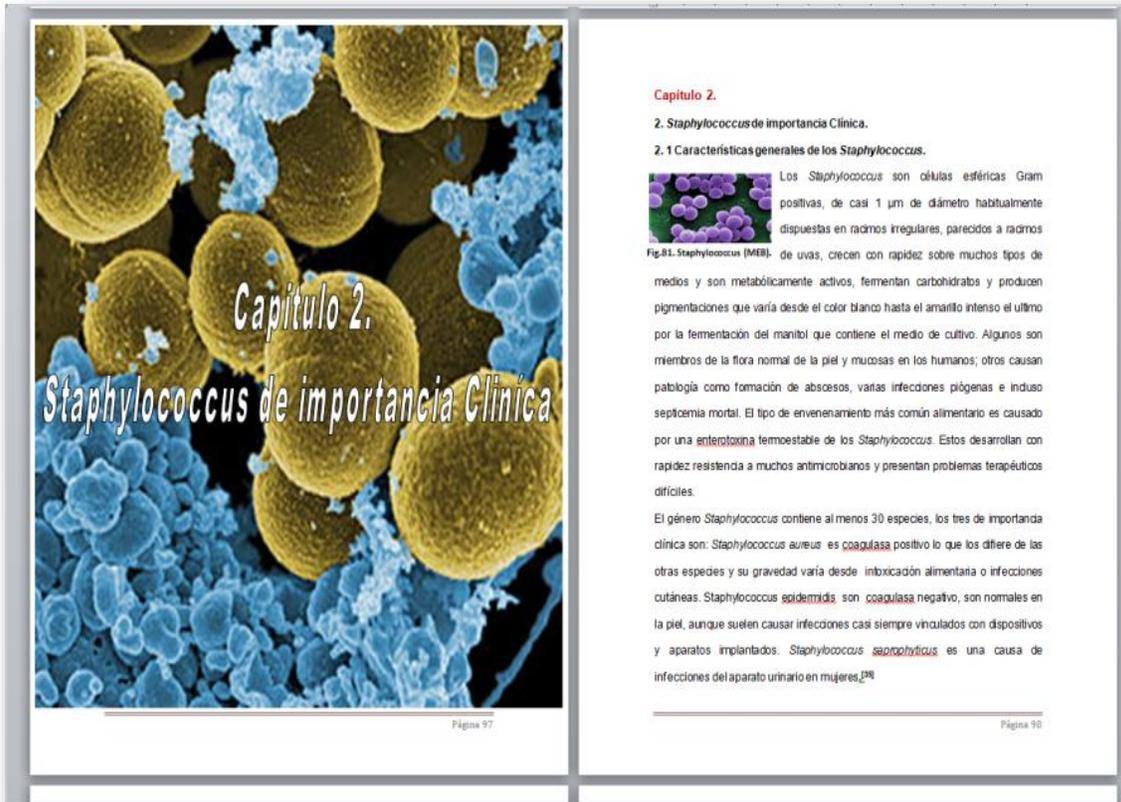


Figura 3. Capítulo 2 *Staphylococcus* de importancia clínica³

En capítulo 2, el alumno tendrá acceso a información sobre *Staphylococcus* de importancia clínica encontrando características generales, estructura antigénica, mecanismos de acción, factores de patogenicidad y virulencia de las especies.

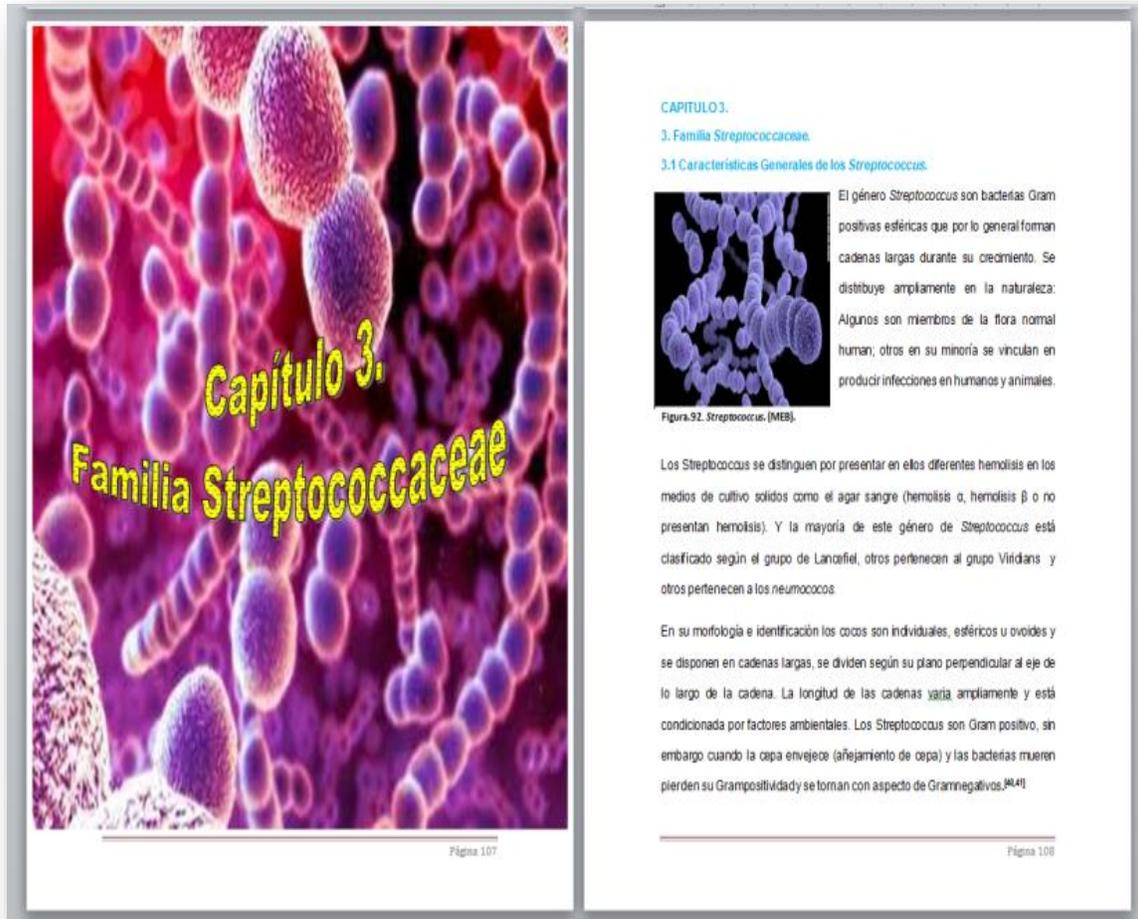


Figura 4. Capítulo 3 Familia *Streptococcaceae*⁴

Capítulo 3. Este capítulo contiene información sobre la familia *Streptococcaceae*, características generales del género *Streptococcus*, estructura antigénica, factores de patogenicidad y manifestación clínica, además de la clasificación de Lancefield.

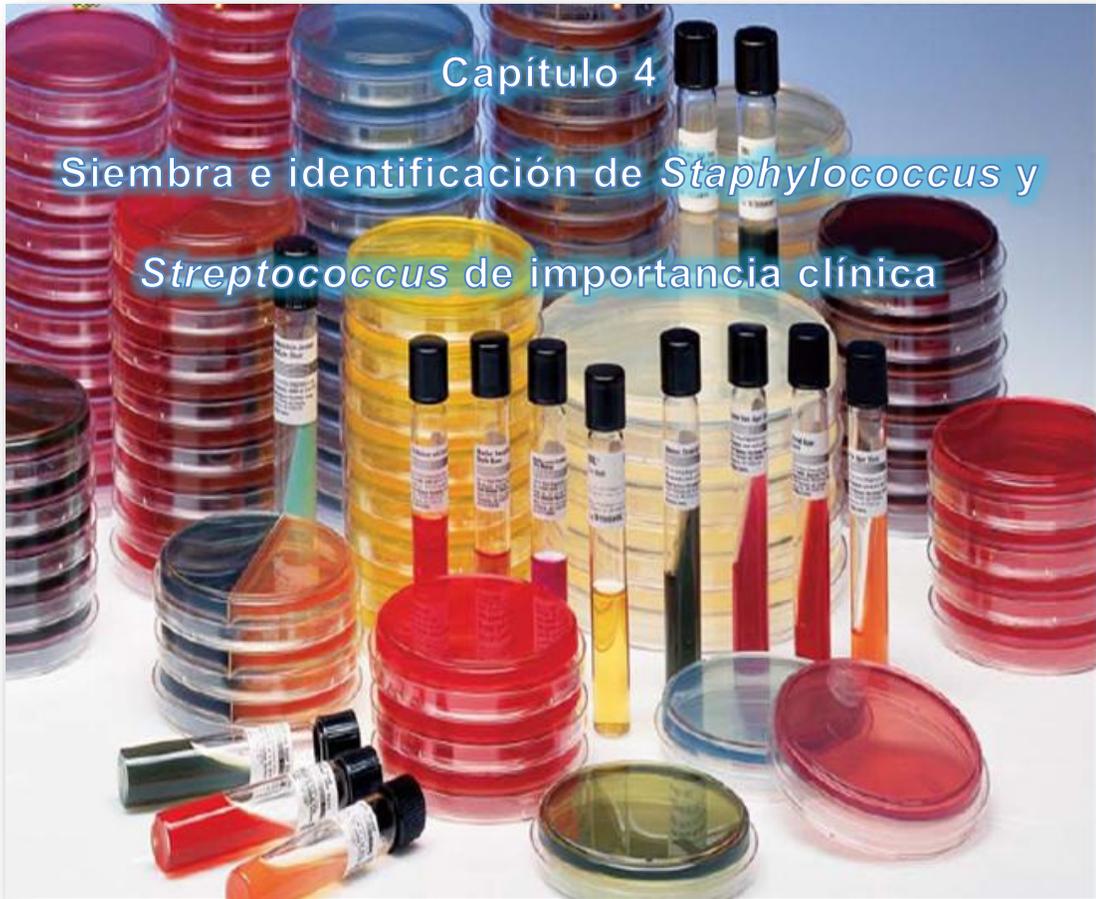


Figura 5. Capítulo 4 Siembra e identificación de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica⁵

Capítulo 4. En este capítulo se visualizarán las fotografías de los resultados que se obtuvieron de la parte experimental como lo fue la siembra por estría cruzada y aislamiento de colonias en diferentes medios de cultivo, morfología colonial, morfología microscópica, pruebas bioquímicas y pruebas especiales que nos permiten identificar bacterias de importancia clínica como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.



Figura 6. Anexos de Pruebas bioquímicas y pruebas especiales⁶

En anexo se encontrará información sobre fundamentos y técnicas de cómo llevar a cabo paso a paso una tinción de Gram, siembra y esterilización de pruebas bioquímicas, además de pruebas especiales ya que cada técnica cuenta con imágenes de resultados de referencia.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El presente libro electrónico se elaboró sobre microorganismos de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica, el cual debe ser utilizado como material didáctico para los módulos de microbiología del área de la salud ya que contiene información que fue extraída de diferentes fuentes electrónicas confiables con el propósito de integrar la información en un sólo documento y con la finalidad de tener un material didáctico más práctico. Para la parte experimental se realizó la siembra e identificación de bacterias de importancia clínica como son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* y en los resultados obtenidos se observó diferencias entre las especies de *Staphylococcus* que se trabajaron, ya que para *S. aureus* al aislar en Agar Sangre de Carnero al 5 % presentó β - hemólisis, en Agar Sal y Manitol fermento el componente manitol y por lo tanto se observaron colonias de color dorado. En la tinción de Gram se visualizó cocos en racimo de uva, Gram positivos; Mientras que en *Staphylococcus epidermidis* en el medio de Agar Sangre de Carnero al 5 % fue γ - hemolítico, en Agar Sal y Manitol no fue capaz de fermentar el manitol y por lo tanto las colonias pigmentaron a blanco, en la tinción de Gram se observó diplococos Gram positivos, para las pruebas bioquímicas ambas especies de *Staphylococcus* son catalasa positivo, prueba que también diferencia del género *Streptococcus* por ser catalasa negativo, en TSI ambas fermentaron carbohidratos de glucosa, lactosa y sacarosa, no produjeron gas y H₂S, en la prueba de MIO, CS, y SIM resultaron negativo, en la prueba de LIA solo fermentaron glucosa en la capa profunda, en caldo Urea *S. aureus* resulto

ser positivo y en *S. epidermidis* se observó que metabolizó la Urea lentamente permitiendo ver una alcalinidad tenue, en RM-VP ambas cepas resultaron positivas, para la fermentación de RF + carbohidratos el principal carbohidrato que diferenció *S. aureus* de *S. epidermidis* fue el manitol dando ácidos solo la bacteria de *S. aureus*. En la prueba de coagulasa se observó que solo *S. aureus* es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina del plasma debido a que solo *S. aureus* posee la enzima de coagulasa, por el contrario *S. epidermidis* no es capaz de formar coágulo en el plasma debido a que no posee la enzima coagulasa. Por otra parte en los microorganismos de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* al sembrar en medios de cultivo como el Agar Sangre de Carnero al 5 % y Agar Casman produjeron β -hemólisis, para la tinción de Gram ambas cepas resultaron ser cadenas largas, Gram positivas. En las pruebas bioquímicas *S. pyogenes* y *S. agalactiae* resultaron ser catalasa negativo, en la prueba de TSI fermentaron carbohidratos de glucosa, lactosa y sacarosa, no produjeron gas, en la prueba de SIM, LIA, UREA, CS y RM resultaron negativo, para la prueba de VP solo *S. agalactiae* fue capaz de producir acetilmetilcarbinol (acetoína). Para una mejor identificación se utilizaron pruebas especiales como la determinación de sensibilidad a Bacitracina y Optoquina lo cual resultó ser que *S. pyogenes* es sensible a Bacitracina y resistente a Optoquina, mientras que *S. agalactiae* resultó ser resistente a ambos antibióticos. En la prueba de CAMP se utilizó el medio de cultivo Agar Sangre de Carnero al 5 % y al sembrar el *S. agalactiae* con *S. aureus*, se observó que el *Streptococcus del grupo B*, fue capaz de aumentar la β -hemólisis de *S. aureus* para formar en la siembra una punta de flecha (sinergismo).

Por otra parte para la estructuración del libro electrónico se organizó la información por capítulos en formato PDF para después digitalizarse a libro electrónico; cada capítulo contiene imágenes y esquemas que lo hace más atractivo para el estudiante. En anexos se encontrara información de fundamentos, técnicas y resultados de referencia de tinción de Gram, pruebas bioquímicas y pruebas especiales para que el estudiante consulte y compare sus resultados obtenidos con los del libro electrónico y así facilitar su aprendizaje para la identificación de microorganismos de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica.

CONCLUSIÓN.

Se realizó un libro electrónico con información de fuentes confiables como revistas electrónicas, libros electrónicos e impresos, además cuenta con fotografías que ilustran cómo se debe realizar desde un cultivo hasta la identificación de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

Este proyecto pretende ser un material didáctico para que sea utilizado por los alumnos de la licenciatura de Química Farmacéutico Biológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

RECOMENDACIONES

- ✓ Poner a prueba el libro electrónico a los alumnos que cursan los módulos de Microbiología de la carrera de QFB.
- ✓ Facilitar el libro electrónico en portales virtuales creados por la UNAM para que los alumnos ingresen a la información electrónica.
- ✓ Mantener el libro electrónico en bibliotecas de la FES Zaragoza, de Ciudad Universitaria, así como las demás facultades e instituciones que tengan interés por el material didáctico, para que los alumnos que cursan el módulo de microbiología de las diferentes licenciaturas tengan acceso a la información electrónica.

REFERENCIAS

1. Gutenberg. La revolución de los libros electrónicos. 2ª ed. España: Editorial Trea; 2015.
2. Torres T. Libro electrónico. [Libro digital en línea]. [Citada 3 de agosto del 2015]. Disponible en: <http://www.libros-electronicos-digitales.html.com>.
3. Díaz P. Diseño de los libros electrónicos educativos. [e-Book on the internet]. [Citada 25 de abril del 2012]. Disponible en: <http://www.casadellibro.com/ebook-ebooks-creacion-y-diseno-de-libros-electronicos-ebook>.
4. Cavaliere A. El libro impreso y el libro digital. 3ª ed. España: Editorial milenio; 2014.
5. Jerry J. Libros electrónicos. [e-Book, PDF on the internet]. [Citada 10 de junio del 2013]. Disponible en: <http://www.coaching-tecnologico.com/ventajas-y-desventajas-del-libro-electronico-o-ebook>.
6. Watson K. e-Books. 1ª ed. Canadá: Editorial panamericana; 2015.
7. Tello S. Tecnología educativa para el aprendizaje. 4ª ed. México: Editorial trillas; 2015.
8. Espinoza. El texto electrónico. ¿la desaparición de lo impreso o la aparición de una nueva fuente de lectura?. [text electronic on the internet]. [Citada 3 de octubre del 2009]. Disponible en: http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/texto-electronico-desaparicion-impreso-aparicion-nueva-fuente-lectura.
9. Fonseca Q. Las fuentes de aprendizaje en ambientes virtuales educativos. [Educación virtual en el internet], [Citada en 14 de octubre del 2008].

Disponible en: <http://educacionvirtuallatinoamericana.blogspot.mx/2012/08/las-fuentes-del-aprendizaje-en.html>.

10. Keilor H. Libro electrónico como herramienta en la enseñanza y aprendizaje. 1ª ed. Londres. Editorial Elsevier; 2015.
11. Paul de Kruif. Los cazadores de microbios. 1ª ed. México: Editorial Panamericana; 2007.
12. Hernández B, Arrieta R. Microbiología Industrial. 6ª ed. México: Editorial panamericana; 2010.
13. Tortora. Introducción a la microbiología. 9 ed. España: Editorial Médica panamericana; 2006.
14. Murray. Microbiología médica. 6ª. ed. Madrid: Editorial Elsevier; 2010.
15. Lewis. Microbiología. [Microbial world on the internet]. [Citada 14 de febrero del 2004]. Disponible en: <http://www.solociencia.com/biologia/microbiologia>.
16. Romero C. Microbiología y parasitología humana. 3ª ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2012.
17. Baker F. Microbiología experimental. [Microbiology basic on the internet]. [Citada 3 de agosto del 2014]. Disponible en: <https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus>.
18. Terry K. *Streptococcus* de importancia clínica. 2ª ed. E.U.A: Editorial Lemus; 2014.

19. Zarate R y Gonzales. G. Enfermedad severa invasiva por *Streptococcus* del grupo Lancefield. 5ª ed. México: Editorial interamericana; 2010.
20. Pumarola A y Rodríguez J. Microbiología y parasitología. 2ª. España: Editorial Médica panamericana; 2009.
21. Rulas P. Tratado del género *Streptococcus*. 1ª ed. México. Editorial Interamericana; 2015.
22. Fábregas B. Tratado de la Microbiología. [The microbial on the internet]. [Citada 15 de abril del 2013]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=Nxb3iETuwplC&pg=PR7&lpg=PR7&dq=articulos+de+libros+de+tratados+de+la+microbiologia>.
23. Garrot O. *Staphylococcus aureus*. [Microbiology on the internet]. [Citada 8 de marzo del 2012]. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcus aureus17365.pdf>.
24. Perea P. Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica. Vol. I y vol. II. Madrid: Editorial Doyma; 2013.
25. Madigan R. Biología de los microbios. 10 ed. México: Editorial Terry; 2009.
26. Sting L. Microbiología. [Microbes on the internet]. [Citada 16 de abril del 2010]. Disponible en: <https://quimicoclinico.wordpress.com/2008/04/19/articulo-sobre-cocos-gram-positivos-estafilococo-y-estreptococo>.

- 27.**Brock. Tratados de la microbiología. 5ª ed. EU.A.: Editorial Interamericana; 2010.
- 28.**Delatt. Microbiología Medica 4ª ed. España: Editorial interamericana; 2013
- 29.**Mc. Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3ª ed. México: Editorial Médica panamericana; 2011.
- 30.**Koneman. Microbiología Diagnóstica. 4ª ed. E.U.A.: Editorial Médica panamericana; 2008.

REFERENCIAS DE FIGURAS

Figura 1. Libro electrónico. Disponible en:

<http://aldeahost.info/libro-tradicional-frente-al-libro-electronico>.

Figura 2. Capítulo 1. Introducción a la Microbiología. Disponible en:

<http://Biologiaverde.blogspot.mx/2013/12/anton-van-leeuwenhoek.html>.

Figura 3. Capítulo 2. *Staphylococcus* de importancia clínica. Disponible en:

<https://www.creativecrash.com/3d-model/staphylococcus-bacteria.html.com>

Figura 4. Capítulo 3. Familia *Streptococcaceae*. Disponible en:

<http://www.bacteria.cz/streptococcus-pyogenes-infections.html.com>

Figura 5. Capítulo 4. Importancia clínica e identificación. Disponible en:

<http://www.ciencias.com/laboratorio-quimico>.

Figura 6. Anexos. Pruebas bioquímicas y pruebas especiales. Disponible en:

<https://www.Microbioslab.com.mx/search=laboratorio+de+microbiologia>



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Libro electrónico sobre microorganismos
de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de
importancia clínica

Director. Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Asesor. Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Luis Fernando Hernández Santos

Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIME, PE202716

Contenido

Capítulo 1	5
1.1 El mundo microbiano y su importancia para el hombre.....	6
1.2. Estructura Bacteriana.....	9
1.2.1 Célula procariota.....	9
1.2.2 Capsula:	9
1.2.3 Citoplasma.....	10
1.2.4 Pared Celular.	12
1.2.5 Estructuras externas de La pared celular	13
1.2.6 Fimbrias y Pili.....	15
1.2.7 Núcleoide.....	16
1.2.8 Membrana Citoplasmática.	16
1.2.9 Endosporas.	18
1.3 Requerimientos para el crecimiento microbiano.....	19
1.3.1 Temperatura.....	19
1.3.2 Necesidad osmótica y Fuerza Iónica.	22
1.3.3 Nutrición gaseosa.....	23
1.4 Medios de Cultivo.	25
1.5 Tipos de siembra bacteriana.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1 El mundo microbiano y su importancia para el hombre.....	6
1.5.1 Morfología Colonial	37
2.2 Estructura antigénica	81
3.2 Clasificación de lancefield	91
3.4.1. Toxinas Y Enzimas.....	99
1.6 Tinciones.	41
1.7. Sistemas Comerciales Manuales.....	51
1.7.1 Sistemas Comerciales Automatizados.....	52
1.8 Control Microbiológico.....	54
1.8.1 Métodos Físicos.....	54
1.8.2 Factores Químicos.	62
1.9 Genética Bacteriana.....	65
1.10. Antibióticos	71

CAPÍTULO 2	78
2. <i>Staphylococcus</i> de importancia Clínica.....	79
2.1 Características generales de los <i>Staphylococcus</i>	79
2.2 Estructura antigénica.....	81
2.3 Factores de Patogenicidad y manifestación clínica.	83
2.3.1 Enzimas y Toxinas.	83
CAPÍTULO 3	89
3. Familia Streptococcacea.....	89
3.1 Características Generales de los <i>Streptococcus</i>	90
3.2 Clasificación de lancefield	¡Error! Marcador no definido.
3.3 Estructura antigénica.....	96
3.4 Factores de patogenicidad y manifestación clínica	99
3.4.1. Toxinas Y Enzimas.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO 4	103
4. Identificación de <i>Staphylococcus</i> y <i>Streptococcus</i> de importancia clínica	104
4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	¡Error! Marcador no definido.
4.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	118
4.3 <i>Streptococcus Pyogenes</i>	130
4.4. <i>Streptococcus agalactiae</i>	145
ANEXOS	158
Tinción de Gram.	159
Prueba de Coagulasa.	162
Prueba de sensibilidad a Bacitracina.	163
Prueba de Optoquina.....	163
Prueba de CAMP.....	164
Pruebas Bioquímicas.	165
Catalasa.....	165
TSI.	166
MIO.....	169
SIM.....	171
LIA.....	172
Citrato de Simmons.....	174

Caldo Urea.	175
Rojo de Metilo-Vogues-Proskauer. (RM-VP).	176
Fermentación de Carbohidratos con campanas de Durham.....	179

REFERENCIAS **¡Error! Marcador no definido.**

REFERENCIAS DE FIGURAS..... **¡Error! Marcador no definido.**

Fotografías de la siembra e identificación de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica..... **¡Error! Marcador no definido.**

Capítulo 1

Introducción a la Microbiología



Antoni Van Leeuwenhoek

Capítulo 1

1.1 El mundo microbiano y su importancia para el hombre

Historia



Figura 1.1 Antoni Van Leeuwenhoek.
(1632-1723)¹

Antoni van Leeuwenhoek nació el 24 de octubre de 1632, originario de Holanda, realizó sus estudios en Ámsterdam y fue el primer cazador de microbios por aportar descripción de seres diminutos que no se pueden ver a simple. Con la ayuda de su invento, un microscopio relativamente burdo Leeuwenhoek examinó objetos animáculados que encontró en agua de lluvia, heces y material de raspado dental; Además con el apoyo de su microscopio analizó espermatozoos de seres humanos e insectos. Leeuwenhoek

demostró que los gorgojos, pulgas y mejillones se desarrollaban en huevecillo; Por estos y otros hallazgos tiempo después se le mencionó como el padre de la microbiología^{1,2}

La importancia de la microbiología en la vida del hombre es fundamental para su supervivencia, por ejemplo algunos microorganismos pueden proporcionar al

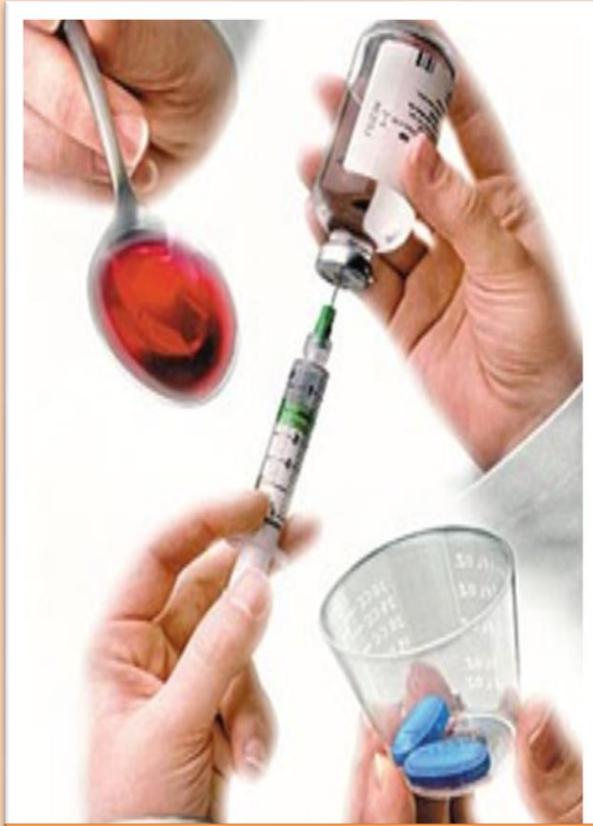


Figura 1.2. Antibióticos²

hombre una fuente económica de vitaminas como la vitamina B12 que es producida por especies de *Pseudomonas* y *Propionibacterium*, la riboflavina es otra vitamina producida por fermentación sobre todo por hongos como *Ashbya gossypii*. La vitamina C (ácido ascórbico) se produce por una modificación complicada de glucosa que es elaborada por especies de *Acetobacter*. Originalmente todos los antibióticos eran productos del

metabolismo microbiano, actualmente se sabe que muchos de los antibióticos se producen de forma sintética, semisintética y por síntesis química.^{3,4}

Para la producción de vacunas se presentan varias etapas:

- ✓ Inactivación: Se preparan los antígenos atenuados
- ✓ Purificación: Los antígenos aislados son purificados
- ✓ Formulación: Los antígenos purificados se combinan con adyuvantes estabilizantes y conservantes para formar la preparación de la vacuna

En las bebidas alcohólicas los microorganismos intervienen en la producción de casi todas las bebidas alcohólicas, la cerveza y el vino son elaborados con la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de fondo). El método de preparación de la cerveza consiste en utilizar cebada germinada que libera almidones y enzimas amilasas (malteado), las enzimas de la malta hidrolizan el almidón o azúcares fermentables (maceración); el líquido se esteriliza y se agregan lúpulos para el sabor, luego se agrega la levadura y se incuba de 3-10 °C. La función de la levadura es convertir azúcares en alcohol y CO₂ ya que la levadura crece en el fondo del recipiente de fermentación. En la preparación de vinos como el Ron, el Coñac y Wiski también se utiliza la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* por convertir los azúcares de la uva en alcohol de un 50-95 %.^{6,7}



Figura 1.3. Industria Cervecera y vinatera³

Cabe mencionar que la microbiología industrial ha sido sumamente útil para la humanidad, actualmente sigue evolucionando y además se considera parte esencial de varias tecnologías básicas para la obtención de muchos productos comerciales ya que la microbiología industrial ha aportado grandes beneficios a nivel mundial.⁸

1.2. Estructura Bacteriana

1.2.1. Célula procariota

Las características de las células procariotas es su tamaño relativamente pequeño, miden en μm de diámetro. Presentan estructuras subcelulares delimitadas por membranas que tienen funciones especializadas ya que tales estructuras las diferencian de las células eucariotas. Una célula procariota cualquiera tiene relativamente pocos genes que permiten la adaptación fisiológica de un

microorganismo en su ambiente.

Su intervalo para los posibles ambientes de esta célula es muy amplio y se adapta al nicho ecológico. Además tiene la capacidad de intercambiar porciones de información genética esta información puede transportarse en plásmidos. La célula procariota no presenta

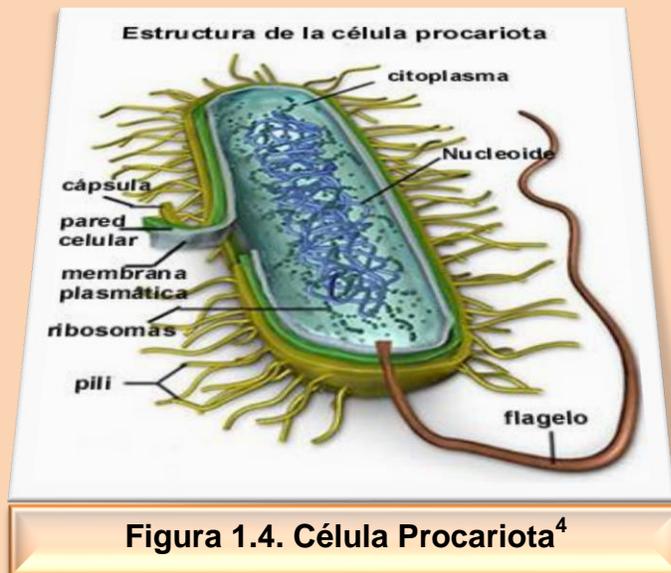


Figura 1.4. Célula Procariota⁴

núcleo definido debido a que su material genético se encuentra disperso en su citoplasma. Por otra parte las estructuras de las células procariotas se pueden observar en un microscopio electrónico de barrido y se encuentran divididas de la siguiente manera:

1.2.2 Capsula:

Contribuye a la capacidad de invasión de la bacteria patógena en organismos; las

Células encapsuladas están protegidas de la fagocitosis por las células del huésped; la capsula y la capa mucilaginosa con frecuencia se utiliza para describir capas de polisacáridos. La composición química del glucocáliz bacteriano es un polímero viscoso (adherente) y gelatinoso, se encuentra localizado por fuera de la pared celular y está compuesto por polisacáridos, polipéptidos o ambas sustancias. La composición química del glucocáliz varía en las distintas especies. Si la sustancia que lo compone está organizada y se adhiere firmemente a la pared celular el glucocáliz recibe el nombre de capsula. La presencia de la capsula la presentan principalmente Neumococos (*Streptococcus pneumoniae*) y *Klebsiella pneumoniae*.

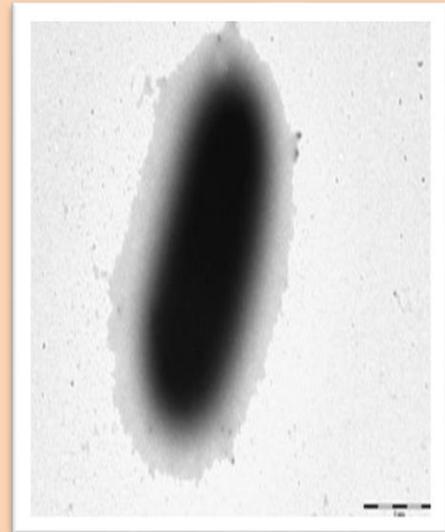
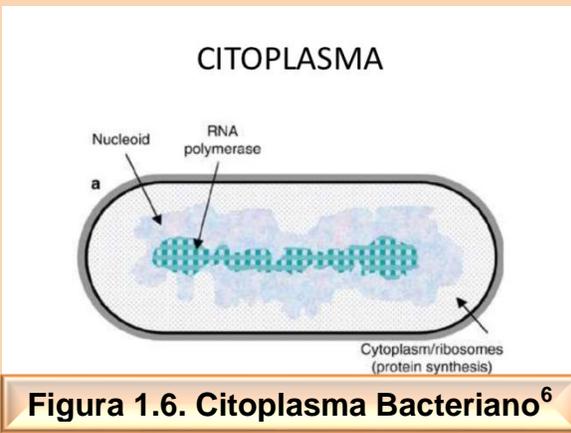


Figura 1.5. Capsula⁵

1.2.3 Citoplasma

Es la sustancia celular limitada por la membrana plasmática. El citoplasma está compuesto por alrededor de un 80% de agua y contiene sobre todo proteínas (enzimas), hidratos de carbono, lípidos, iones orgánicos, y numerosos compuestos de bajo peso molecular, el citoplasma es espeso, acuoso, semitransparente, elástico, es comprendido de una zona nuclear ya que presenta el ADN, partículas llamadas ribosomas y tiene depósitos de reserva llamadas inclusiones. Es muy probable que los filamentos proteicos presentes en el citoplasma quizás sean los



responsables de las configuraciones bacilar y helicoidal de las bacterias. Las bacterias a menudo almacenan materiales de reserva en la forma de gránulos insolubles, que tienen el aspecto de cuerpos refringentes en el citoplasma.

Los ribosomas se encuentran en el interior del citoplasma, las cuales actúan como sitio de síntesis de proteínas, Los ribosomas se encuentran en decenas de millares de estructuras sumamente pequeñas lo que confiere un aspecto granular.

- Inclusiones.

En el interior del citoplasma de las células procariotas existen diversos tipos de depósitos de reserva denominados inclusiones, los gránulos Metacrómicos son inclusiones de gran tamaño y son característicos de *Corinebacterium difteriae* ; las vacuolas gaseosas se encuentran presentes en numerosas células procariontes acuáticas como las cianobacterias y bacterias fotosintéticas; otras como Magnetosomas son inclusiones producidas por bacterias Gram negativas como *Magnetospirillum magnetotacticum* que actúan como imanes; Las inclusiones lipídicas se observan en varias especies como en el interior de su citoplasma de los géneros de *Micobacterium*, y *Bacillus*, también estas bacterias presentan ácido-poli-beta-hidroxi-butírico como reserva en su citoplasma. Por lo tanto las inclusiones mencionadas que se encuentran en el interior del citoplasma bacteriano se pueden detectar utilizando colorantes liposolubles como el colorante de Sudan.

1.2.4 Pared Celular

La pared celular bacteriana es una estructura compleja y semirrígida responsable de la configuración de la célula. La pared celular rodea a la frágil membrana plasmática y protege a esta membrana y al interior de la célula de los cambios adversos del medio externo. Casi todas las células procariotas poseen pared celular y la función principal de la pared celular consiste en evitar la ruptura de la célula bacteriana cuando la presión hidrostática intracelular es mayor que la presión hidrostática extracelular. La pared celular también contribuye al mantenimiento de la forma de una bacteria y sirve como sitio de anclaje para los flagelos. A medida que aumenta el volumen de la célula bacteriana, la membrana plasmática y la pared celular se expanden según la necesidad, esta estructura por lo regular es el sitio de acción de algunos antibióticos.

La pared celular está compuesta por una red macromolecular llamada peptidoglucano (mureína) que puede ser una estructura solitaria o estar combinadas con otras sustancias. El peptidoglucano a su vez está compuesto por un disacárido repetitivo unido por polipéptidos que rodea y protege en totalidad a la célula.

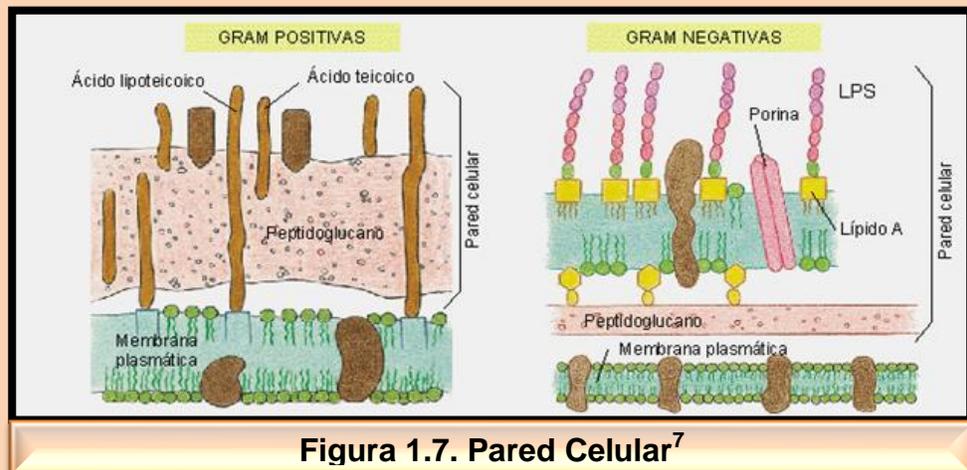


Figura 1.7. Pared Celular⁷

1.2.5 Estructuras externas de la pared celular

Glicocáliz

Es una sustancia superficial de las células procariotas y esta sustancia rodea a la célula; el glucocáliz es un compuesto gelatinoso compuesto de polisacáridos, de polipéptidos o de ambos. Su complejidad varía entre las distintas especies bacterianas. El material glucocáliz es viscoso (pegajoso) y en su mayoría se forma en el interior de las células para ser excretados a la superficie.

Si esta sustancia se encuentra organizada y firmemente unida a la pared celular al glucocáliz se le denominara capsula. Otra función del glucocáliz pegajoso es la adhesión de la bacteria en distintas superficies con el fin de sobrevivir en su ambiente natural.

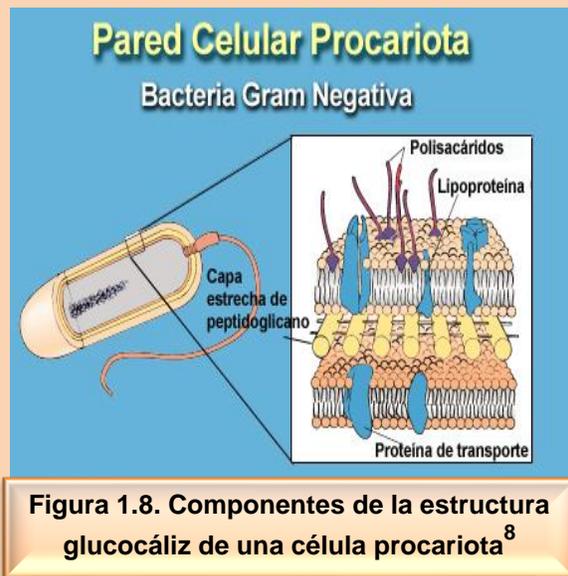


Figura 1.8. Componentes de la estructura glucocáliz de una célula procariota⁸

Flagelos

Uno de los componentes estructurales externos de las bacterias son los flagelos (palabra que significa látigo), son largos apéndices de filamentos que utilizan las bacterias para impulsarse y desplazarse. Las bacterias flageladas son móviles ya que tienen la capacidad de moverse por sí mismas, cada flagelo procariótico es un rotor helicoidal, semirrígido, que empuja la célula al girar a partir del cuerpo basal. La rotación del flagelo puede ser en el sentido de las agujas o en el contrario; a lo largo de su eje. Las células bacterianas pueden alterar la velocidad y dirección de

rotación de sus flagelos y son por lo tanto capaces de exhibir distintas formas de motilidad. Algunas especies de bacterias dotadas de un gran número de flagelos como *Proteus* pueden “invadir “un medio de cultivo, exhibiendo un crecimiento rápido en forma de ondas a este fenómeno se denomina movimiento de swarmig

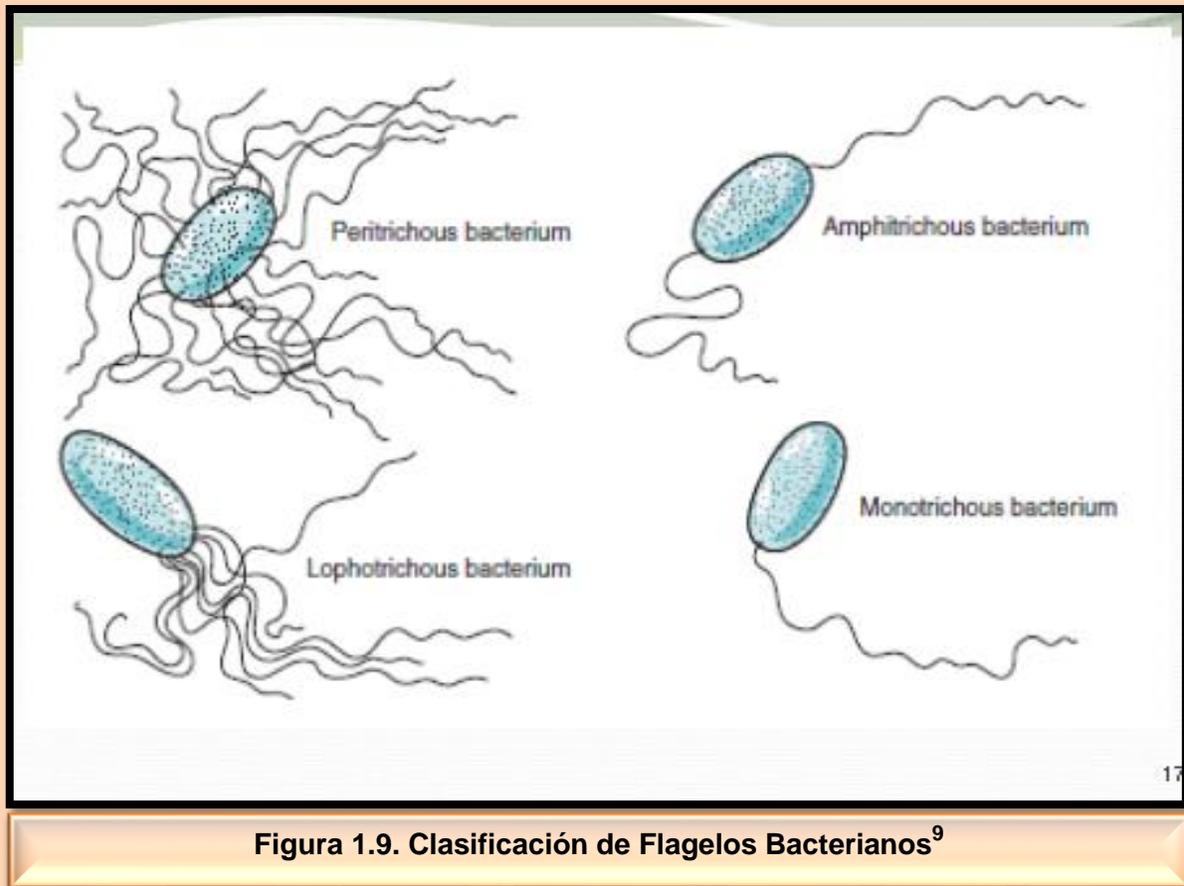


Figura 1.9. Clasificación de Flagelos Bacterianos⁹

Los flagelos se clasifican de la siguiente manera:

Atricos: No poseen flagelos en sus extremos de la pared externa de la bacteria

Monotricos: Poseen un solo flagelo polar en el extremo de su pared celular

Anfitricos: Presenta flagelos en cada extremo de la pared celular

Lofotricos: Tienen dos o más flagelos, en uno o ambos extremos de la pared

Peritricos: Flagelos Distribuidos en toda la extensión de la célula bacteriana

1.2.6 Fimbrias y Pili

Muchas bacterias Gram negativas contienen apéndices pilosos que son mucho más cortos, más rectos y delgados que los flagelos y cumplen funciones de fijación y transferencia de ADN más que una función de motilidad. Estas estructuras compuestas por una proteína llamada pilina le dan a la bacteria un trayecto helicoidal alrededor del núcleo y sus funciones son muy distintas a las fimbrias y pili

Las fimbrias pueden nacer en polos de la célula bacteriana o estar distribuidas en forma regular en toda la superficie. El número de fimbrias puede ser incrementado a miles de fimbrias por célula. Al igual que el glucocáliz las fimbrias permiten que la célula se adhiera a distintas superficies incluidas las de otras células como las fimbrias de la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* el agente causal de la gonorrea

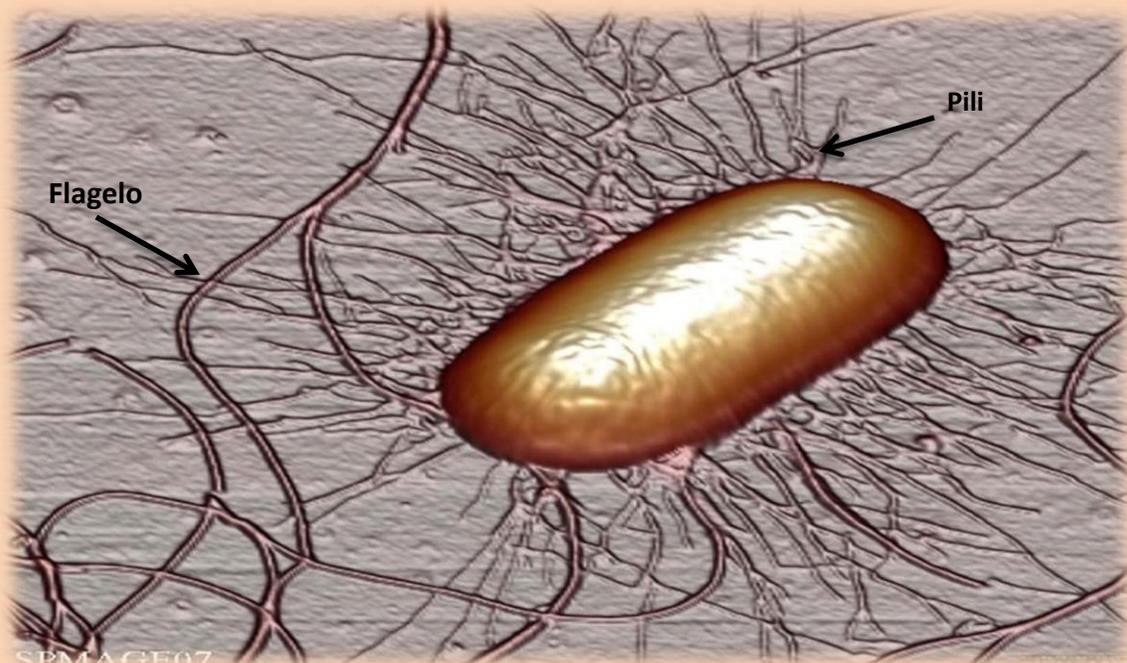


Figura 1.10. Flagelos peritricos de *Escherichiae coli*¹⁰

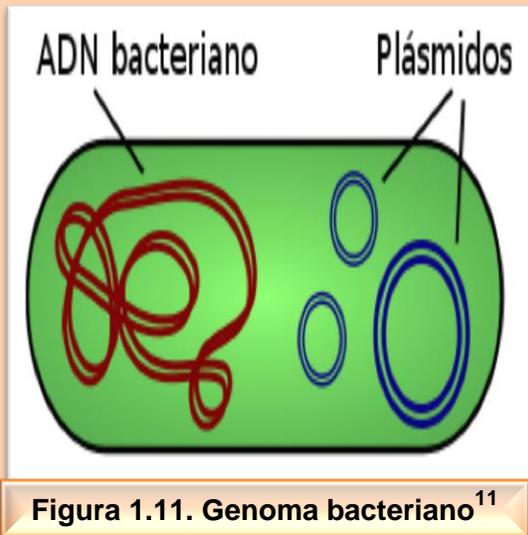


Figura 1.11. Genoma bacteriano¹¹

1.2.7 Nucleoide

Las células procariotas no tienen un núcleo verdadero, almacenan su ADN en una estructura conocida como nucleoide que consiste en una molécula circular única y continúa, que varía en tamaño de 0.58 a casi 10 millones de pares de bases

y su región nuclear está llena de fibrillas de ADN. Sin embargo unas cuantas bacterias han mostrado poseer dos, tres, o incluso cuatro cromosomas diferentes como es el caso de *Vibrio cólera* y *Brucella melitensis*

1.2.8 Membrana Citoplasmática

Es una delgada estructura que se extiende por dentro de la pared celular encerrando el citoplasma de la célula. La membrana citoplasmática procariota está formada principalmente por fosfolípidos y proteínas estas moléculas se pueden observar a través de un microscopio electrónico de barrido ya que se encuentran dispersas formando dos líneas paralelas a través de la membrana celular.

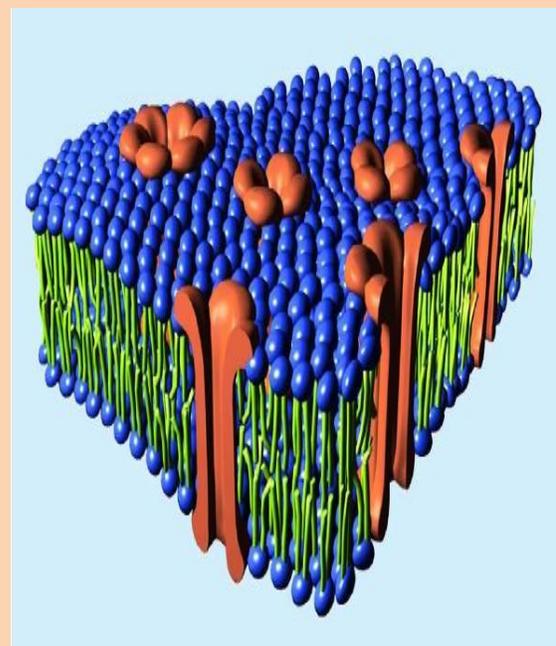


Figura 1.12. Membrana citoplasmática de célula procariota¹²

La función más importante de la membrana citoplasmática es actuar como barrera selectiva a través del cual entran y salen sustancias de la célula; en esta tarea las membranas son muy selectivamente permeables (también se les denomina semipermeables). Esto indica que determinadas moléculas e iones atraviesan la membrana mientras que otros no pueden.

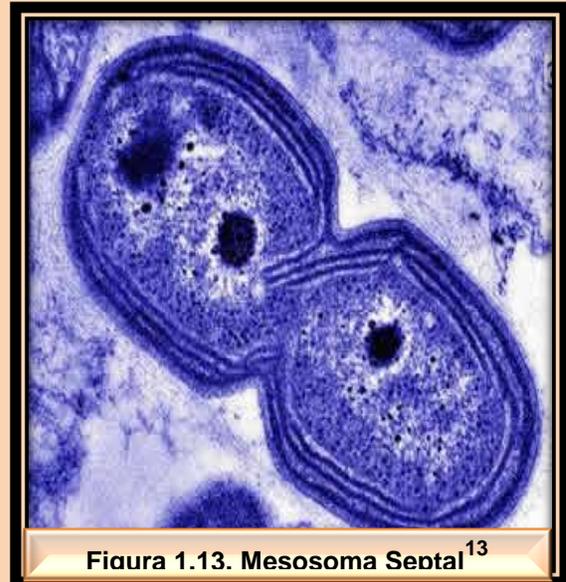


Figura 1.13. Mesosoma Septal¹³

La membrana citoplasmática es importante en la degradación de nutrientes y en la producción de energía. Las membranas citoplasmáticas de las bacterias contienen enzimas capaces de catalizar las reacciones químicas que rompen las sustancias nutritivas y producen ATP. En algunas bacterias se encuentran pigmentos y enzimas implicadas en la fotosíntesis (La conversión de energía luminosa en energía química).

Las membranas citoplasmáticas de las bacterias contienen a menudo uno o más plegamientos grandes, irregulares, denominados mesosomas, generalmente estos se ven asociados a una zona nuclear o próxima al lugar de división celular. Aunque la función exacta de los mesosomas es desconocida podrían jugar un papel en la reproducción y el metabolismo. Cuando se divide una célula bacteria (fisión binaria) se forma una pared llamada septotransverso y el material genético de la célula parental se reparte entre dos células hijas idénticas.

1.2.9 Endosporas

Las esporas son muy resistentes a la desecación y al calor y a los compuestos químicos, cuando se encuentran en condiciones nutricionales favorables y se por lo tanto se activa. Miembros de varios géneros bacterianos son capaces de formar endosporas los más comunes son los bacilos Gram positivos, los anaerobios obligados del género *Bacillus* y los anaerobios obligados del género *Clostridium*. Dichos microorganismos sufren un ciclo de diferenciación en respuesta en condiciones ambientales como el proceso denominado esporulación; es desencadenado por el casi agotamiento de varios nutrientes (Carbono, Nitrógeno o Fosforo). Cada célula bacteriana forma una espora interna única que es liberada cuando la célula madre sufre autólisis.^{9,10.}

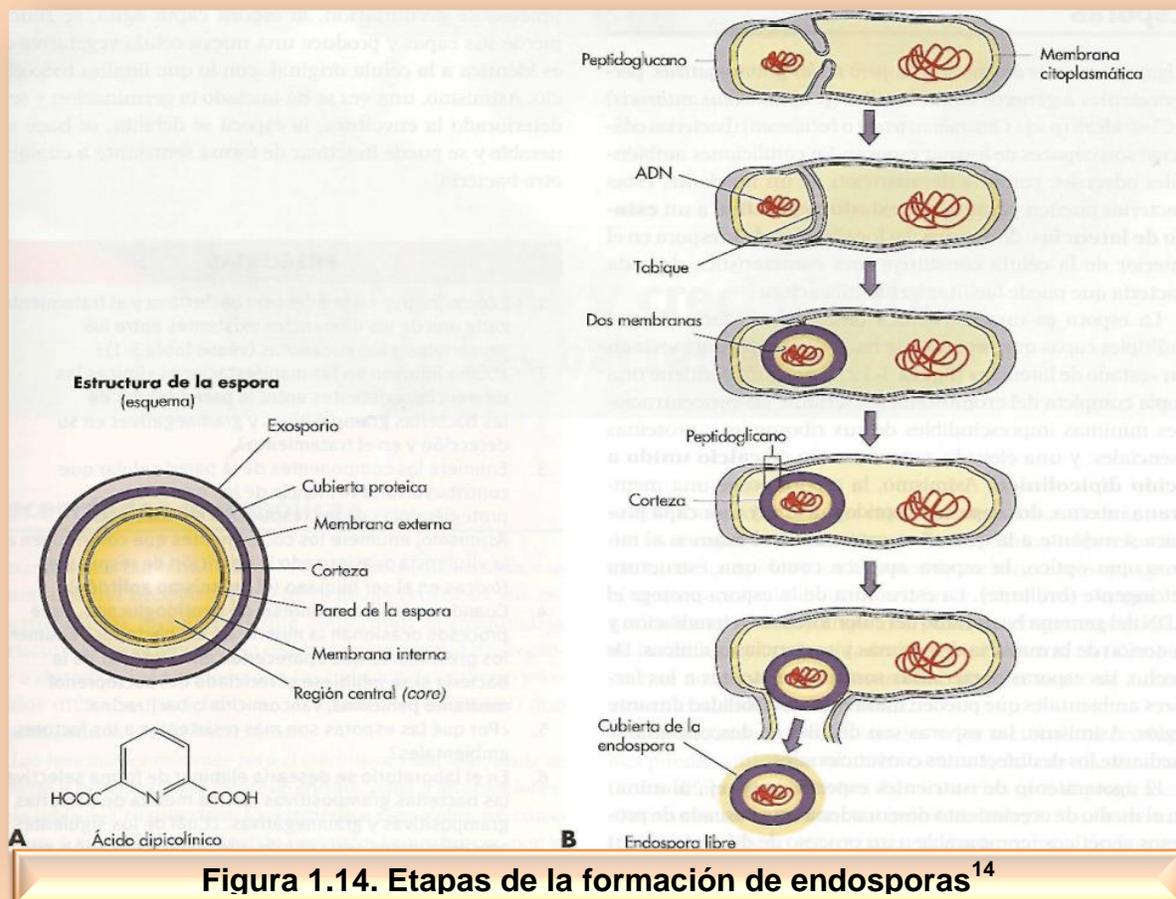


Figura 1.14. Etapas de la formación de endosporas¹⁴

1.3 Requerimientos para el crecimiento microbiano

Los requerimientos que necesitan los microorganismos para llevar un crecimiento y desarrollo adecuado se obtienen a través de factores físicos y factores químicos los cuales se dividen de la siguiente manera:

1.3.1 Temperatura

La mayor parte de los microorganismos crecen bien a la temperatura de 37 °C el cual es integral para los seres humanos. Sin embargo, ciertas bacterias pueden desarrollarse en temperaturas extremas que impedirían la supervivencia de casi todos los organismos eucariontes. Cada especie bacteriana crece en temperaturas mínima, óptima y máxima en particular. Los microorganismos se clasifican en tres grupos principales sobre la base de sus límites como son los *psicrófilos* (microbios por afinidad al frío), *Mesófilos* (Microbios con afinidad a la temperatura ambiente) y *termófilos* (Microbios con afinidad por el calor). La mayoría de las bacterias crecen solo dentro de un espectro limitado de temperatura y las temperaturas de crecimiento máxima y mínima solo están separadas por 30 °C. Su crecimiento es deficiente a las temperaturas alta y baja extremas, dentro de su espectro.¹¹

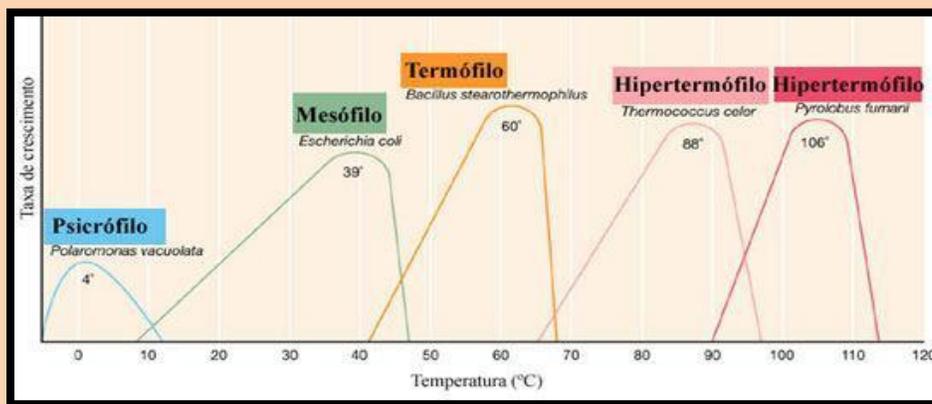


Figura 1.15. Gráfica. Tasa de crecimiento a diferente Temperatura¹⁵

Las bacterias se clasifican según su temperatura en:

- ✓ **Psicrófilas:** Son bacterias que crecen mejor a temperaturas bajas de 0 a 5 °C.
- ✓ **Psicrófilas Estrictos:** son las bacterias que llegan a resistir la temperatura de la antártica y mueren si se exponen a temperatura ambiente y tardan en crecer de 2-3 semanas.
- ✓ **Psicrófilas Facultativas:** Son aquellos microorganismos que pueden crecer a 0 °C, pero crecen mejor a una temperatura de 20 a 30 °C.
- ✓ **Mesófilos:** Crecen a temperaturas que rodean entre los 25 a 40 °C. Estas especies corresponden a la mayoría de bacterias patógenas y de microflora normal.
- ✓ **Termófilos:** Son bacterias que crecen a una temperatura optima sobre los 45 °C. La región del crecimiento de muchos termófilos se extienden a la región de los mesófilos a estos se le conocen como termófilos facultativos y crecen de 50-60 °C
- ✓ **Termófilos Extremos:** Crecen a una temperatura mayor de 90 °C. ^{12,13.}

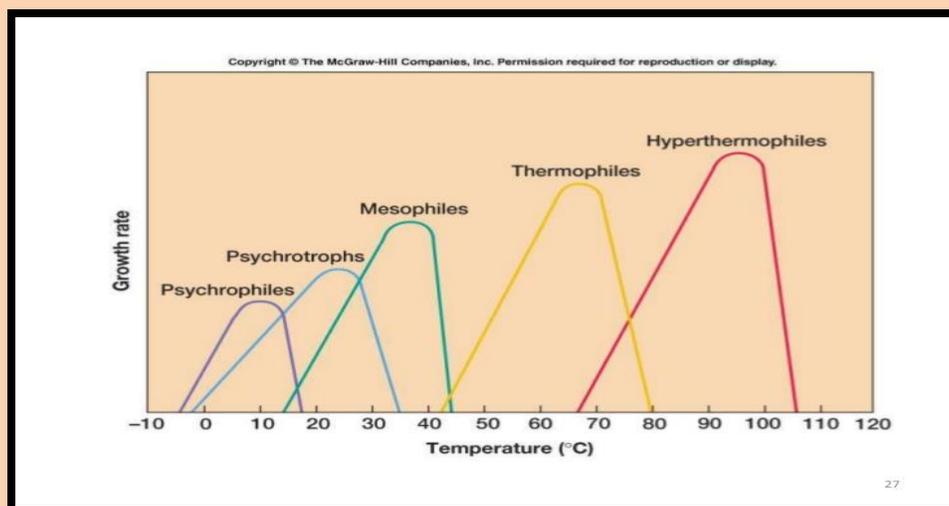


Figura 1.16. Tasa de crecimiento en respuesta a la temperatura¹⁶

Concentración de Iones Hidrógeno pH

La mayoría de los microorganismos tiene un pH muy estrecho debido a que el pH es determinado empíricamente para cada especie. La mayor parte de los microorganismos crece a un pH de 6-8; Algunas bacterias denominadas acidófilas toleran notablemente la acidez soportando los rangos de pH de 2-5; Por otra parte los hongos filamentosos y las levaduras crecen con valores de pH por lo general cerca de 5 a 6.

Cuando las bacterias se cultivan en el laboratorio a menudo producen ácidos que al final interfieren sobre su propio crecimiento. Para neutralizar los ácidos y mantener un pH adecuado se agregan al medio de cultivo sustancias químicas que actúan como buffers. En algunos medios las peptonas y aminoácidos actúan como buffers y muchos medios también contienen sales de fosfato. Estas últimas tienen la ventaja de mostrar su efecto buffers en los límites de pH del crecimiento de la mayoría de las bacterias y no son tóxicas; de hecho proveen fósforo, un nutriente esencial. Los microorganismos regulan su pH interno pese a la amplia gama de cifras de su pH externo mediante su bombeo de protones hacia el interior al exterior de la célula, El sistema de intercambio de K^+/H^+ contribuye a la regulación del pH interno en los microorganismos.

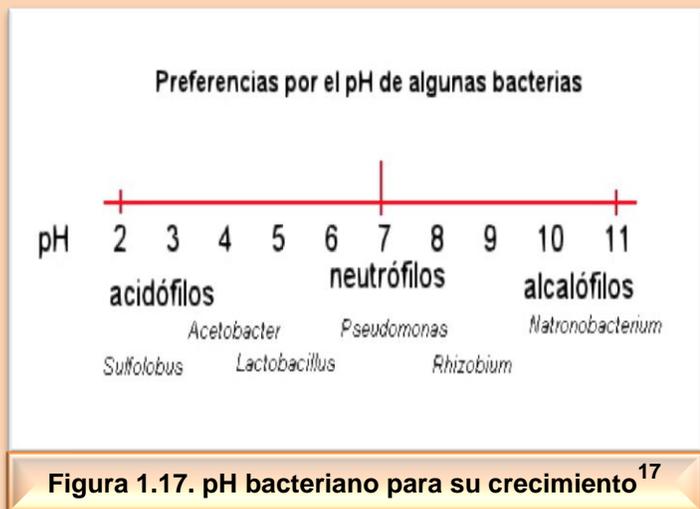


Figura 1.17. pH bacteriano para su crecimiento¹⁷

1.3.2 Necesidad osmótica y Fuerza Iónica

Casi todos los nutrientes que obtienen los microorganismos se encuentran disueltos en el agua. Por ende los microorganismos requieren agua para crecer ya que están constituidos por un 80-90% de agua. Los microorganismos que requieren altas concentraciones de sales se les denomina halófilos como por ejemplo la bacteria de *Staphylococcus aureus* que crece y se adapta mejor en condiciones elevadas si se aísla en un medio salino como el de Agar sal y manitol o agar Chapman (ASM modificado). También están las bacterias que necesitan de presiones osmóticas se les denomina osmófilas. La mayor parte de las bacterias pueden tolerar una amplia variedad de presiones osmóticas y fuerzas iónicas externas, debido a su capacidad de regular la osmolaridad interna y concentración iónica. La osmolaridad está regulada por el transporte activo de los iones K^+ al interior de la célula; la fuerza iónica interna se conserva constante por una excreción compensadora de putresina, una poliamida orgánica cargada positivamente debido a que la putresina porta varias cargas positivas por molécula se produce un gran descenso en la fuerza iónica con un costo pequeño en la fuerza osmótica.

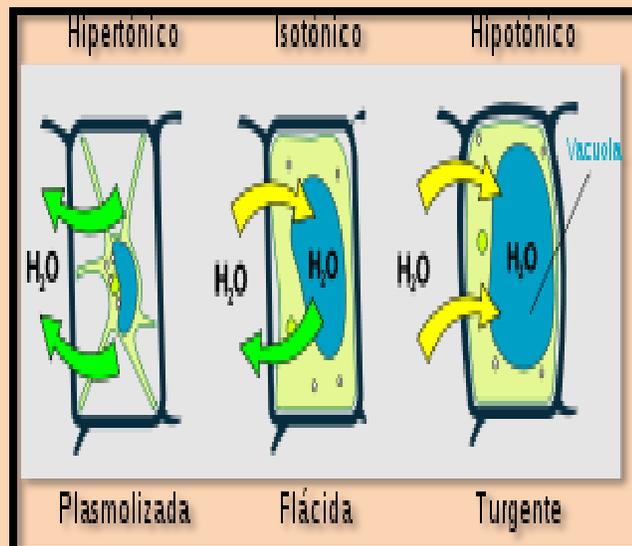


Figura 1.18. a) Células procariotas en Solución Hipertónica, Solución Isotónica y Solución Hipotónica¹⁸

1.3.3. Nutrición gaseosa

Los nutrimentos en el medio de cultivo deben contener todos los elementos necesarios para la síntesis biológica de nuevos microorganismos.

– Fuentes de Carbono

Las plantas y algunas bacterias pueden usar energía fotosintética para reducir al dióxido de carbono (CO_2) a expensas del H_2O . Estos microorganismos pertenecen al grupo de los autótrofos. Existen otros autótrofos son los quimiolitotrofos, microorganismos que utilizan sustratos inorgánicos, como el Hidrógeno o el tiosulfato en calidad de reductor y el CO_2 como fuente de carbono. Es importante que se proporcionen los sustratos del crecimiento en concentraciones adecuadas para la cepa microbiana en desarrollo, las concentraciones que apoyan el crecimiento de un microorganismo pueden inhibir el de otros.

– Fuentes de Nitrógeno

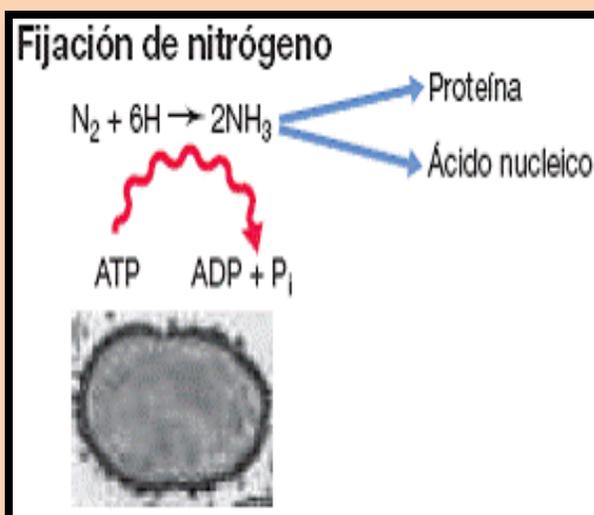


Figura 1.19. Fijación del N_2 en célula bacteriana¹⁹

El N_2 es un componente importante de las proteínas y de los ácidos nucleicos, constituye casi el 10% del peso seco de la célula bacteriana, por lo cual la bacteria puede realizar una fijación de nitrógeno convirtiendo el ATP en ADP + fosforo.^{14,15.}

La capacidad para fijar el nitrógeno se encuentra en bacterias ampliamente divergentes las cuales han desarrollado estrategias bioquímicas para proteger a sus enzimas fijadoras de nitrógeno del efecto del O_2 . La mayor parte de los microorganismos pueden recurrir al amoníaco (NH_4^+) como fuente única de N_2 y muchos de ellos pueden producir este ion a partir de aminas ($R-NH_2$) o de los aminoácidos.

– Fuentes de Azufre

Al igual que N_2 el azufre es un componente de muchas sustancias celulares orgánicas. El azufre en su forma elemental no puede ser utilizado por plantas o los animales sin embargo algunas bacterias autótrofas pueden oxidarlo a sulfato (SO_4^{2-}) La mayor parte de los microorganismos puede utilizar el sulfato como fuente de azufre mediante la reducción al nivel del H_2S .; Algunos microorganismos pueden asimilar el ácido sulfhídrico directamente del medio de cultivo, Pero este compuesto puede ser tóxico para muchos de los microorganismos.

– Fuentes de minerales

Tanto el Mg^{2+} como el K^+ son esenciales para la función e integridad del crecimiento microbiano ya que también utilizan Ca^{2+} como constituyente esencial Ca^{2+} como constituyente de las paredes celulares de las bacterias Gram Positivas, aun que es necesario en las bacterias Gram negativas. Al formular un medio de cultivo es necesario brindarles a los microorganismos fuentes de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} pero también se requieren de otros minerales como por ejemplo Mn^{2+} , Mo^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y de la captación de Fe^{2+} .¹⁷

Cuadro 1. Efecto del oxígeno sobre el crecimiento de diferentes tipos de bacteria. ¹⁸

Condiciones	Aerobios Estrictos	Anaerobios Facultativos	Anaerobios Estrictos	Anaerobios Aerotolerantes	Microaerófilos
Efecto del O₂ sobre el crecimiento	Solo crecen los aerobios que requieren el O ₂	Crecen aerobios y anaerobios; el crecimiento es mayor en presencia de O ₂	El crecimiento cesa en presencia de O ₂	Solo crecen los anaerobios pero el crecimiento continua en presencia de O ₂	Solo crecen los aerobios; requieren O ₂ en bajas concentraciones
Explicación de los patrones de crecimiento	El crecimiento sucede solo donde se difundieron concentraciones elevadas de O ₂ en el medio	El crecimiento es mejor donde hay mayor cantidad de oxígeno pero se produce en el tubo	El crecimiento ocurre solo donde no hay O ₂	El crecimiento sucede de manera uniforme; el O ₂ no tiene efecto.	El crecimiento sucede solo donde se difunde concentraciones bajas de O ₂ en el medio
Explicación de los efectos del O₂	La presencia de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa neutraliza las formas toxicas de O ₂ , puede utilizar oxígeno	La presencia de las enzimas catalasa y Superóxido dismutasa netraliza formas toxicas de O ₂	Carecen de enzimas neutralizan las formas lesivas del O ₂ , no pueden tolerar oxígeno	La presencia de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa neutralizar en parte las formas toxicas del O ₂ ; toleran el oxígeno	Produce Cantidades letales de formas toxicas del O ₂ si se exponen al oxígeno atmosférico normal

1.4 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo se elaboran con una mezcla de nutrientes esenciales, que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas permiten el crecimiento de microorganismos. Los medios de cultivo pueden clasificarse en sólidos, semisólidos y líquidos y estos son necesarios para el laboratorio de

microbiología para ello se necesita llevar a cabo un buen control para su fabricación, conservación y uso.

El agar

Es un polisacárido que se extrae de las algas marinas y posee algunas propiedades muy importantes que lo convierten en valioso para la microbiología ya que proporciona al medio su consistencia sólida cuando se emplea en un porcentaje de 1.5% aprox. Se utiliza peptona en



Figura 1.20. Medios de cultivo deshidratados²⁰

la mayoría de los medios de cultivo para definir un producto soluble en agua este es obtenido por la hidrólisis de proteínas. Las proteínas son hidrolizadas por enzimas para dar origen a los aminoácidos y péptidos que pueden ser utilizados por las bacterias para obtener los aminoácidos y nitrógeno necesario para su metabolismo. El fosfato di potásico forma un sistema de buffer cuya función es proporcionar un pH estable para el óptimo crecimiento de los microorganismos.

Los medios de cultivo se preparan en cajas de Petri, también puede permitirse que se solidifiquen en tubos de ensayo dejando solidificar en posición inclinada o posición erecta. El medio de cultivo debe guardarse en una atmósfera fresca y húmeda para evitar la evaporización utilizando refrigeradores a una temperatura de 4 °C. Sin embargo no se recomienda que se guarden por un periodo prolongado y en los medios líquidos estériles se recomienda mantenerlos en una gradilla en posición vertical para que estos no se contaminen con la superficie del

tapón de rosca. La mayoría de los medios de cultivo comúnmente utilizados se encuentran en el comercio en forma de polvos secos, estos productos deshidratados se transforman fácilmente en medios de cultivo, por adición de agua destilada para su rehidratación. [17,18]

Medios de cultivo según su origen:

a) NATURALES: son medios preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como ser extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.

b) SINTÉTICOS: son medios que contienen una composición química definida cualitativa y cuantitativamente

c) SEMISINTÉTICOS son medios sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura.



Figura 1.21. Medios de Cultivo según su origen²¹

Según su consistencia

a) **LÍQUIDOS:** se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa.

b) **SOLIDOS:** se preparan añadiendo un agar a un medio líquido (caldo) a razón de 15 g/Litro. El agar es una sustancia inerte polisacárido (hidrato de carbono) que se extrae de las algas marinas. Como esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye ningún elemento nutritivo; Este conjunto convenientemente esterilizado puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo tener la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias, "procesos que antes no eran posibles en medio líquido".

c) **SEMISOLIDOS:** contienen 7.5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies bacterianas por lo que actualmente se encuentran disponibles comercialmente con el agregado de agar.¹⁹



Por su composición de Medios De Cultivo.

✓ **Medios de Cultivo Complejos**
(Sintéticos y Semisintéticos).

Casi todas las bacterias heterótrofas y los hongos que se trabaja en un laboratorio se cultivan de modo sistemático en medios complejos, compuestos por nutrientes como extractos de levadura, plantas, carne y digerido proteico y otras fuentes ya que entre los diferentes lotes del medio puede haber leves variaciones de la composición química.



Figura 1.23. Compuesto principal de un medio de cultivo complejo²³

En los medios complejos se requiere energía, Carbono, Nitrógeno y Azufre de los



Figura 1.24. Componente un medio de cultivo complejo²⁴

microorganismos son aportados sobre todo en por las proteínas ya que estas pueden ser utilizados de forma directa por parte de los microbios. Si bien por una digestión parcial por ácidos o enzimas las reducen a cadenas más cortas de aminoácidos denominados peptonas; la mayoría de las bacterias pueden degradar las peptonas para poder continuar con su metabolismo.

Los extractos de carne o de levadura le proporcionan al medio las vitaminas y otros factores de crecimiento orgánicos. Los extractos de levadura tienen contenidos particularmente elevados de vitaminas del complejo B; Si un medio complejo se halla en forma líquida se denomina caldo nutritivo y si se le adiciona el polisacárido agar al 1.5% el medio solidificara y se le denominara agar nutritivo.

✓ **Medios de cultivo Selectivos.**

Se categorizan como medios de cultivo selectos porque están diseñados para



Figura 1.25. Medio selectivo, Agar Sal Y manitol. Estría Cruzada, colonias de *S. aureus*²⁵

suprimir el crecimiento de bacterias no deseadas y por lo tanto solo deberá crecer el microorganismo deseado. Estos medios sus componentes son los que se encargan de inhibir el crecimiento de los *Enterosapofitos* debido al alto contenido de sales biliares.

Sin embargo en algunas ocasiones encontraremos saprobios en estos medios de cultivo que resisten las concentraciones altas de sales biliares; ejemplos de estos son el Agar *Salmonella–Shigella*; Agar Desoxicolato-Citrato, Agar xilosa Lisina Desoxicolato y especialmente el Agar Sal y Manitol el cual por sus altas concentraciones de sal al 7.5 y 10% y solo crecerán microorganismos del género *Staphylococcus* debido a que son bacterias halófilas denominadas así por tener alta afinidad a la salinidad. Para el crecimiento de hongos patógenos el agar

dextrosa sabouroud que tiene un pH ácido de 5.6 se utiliza como medio de cultivo selectivo por poseer altas concentraciones de dextrosa y antibióticos.

✓ **Medios de Cultivo Diferenciales.**

Estos medios de cultivo permiten distinguir con mayor facilidad las colonias del microorganismo deseado de otras colonias que crecen en la misma placa. Estos medios de cultivo por lo regular contienen componentes como lactosa, sales biliares y principalmente un indicador que ayude a diferenciar por la coloración que producen las colonias de cada microorganismo. Los indicadores más utilizados son: Azul de Metileno, el rojo neutro, rojo de fenol, cristal violeta o púrpura de bromocresol, además de estos ingredientes el medio contiene nutrientes esenciales para el crecimiento bacteriano.

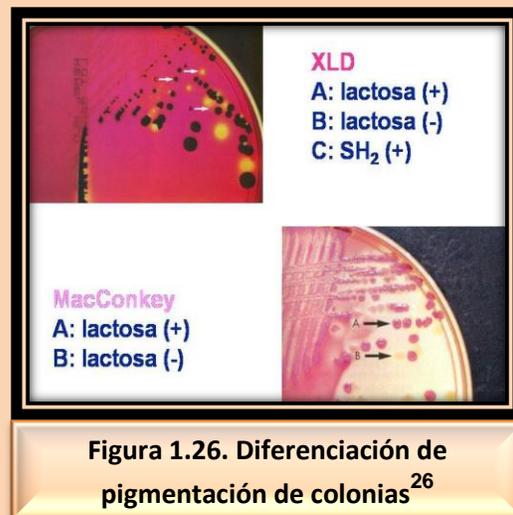


Figura 1.26. Diferenciación de pigmentación de colonias²⁶

Se sabe que por lo general las *enterobacterias* no fermentan la lactosa, por lo tanto no habrá viraje del color del medio, en tanto los la mayoría de los Gram positivos si fermentan la lactosa produciendo ácido y por lo tanto se observara el viraje del color. Un medio diferencial que contiene eritrocitos como agar sangre de carnero al 5% se puede ver la diferenciación de especies patógenas por la lisis de eritrocitos del medio de cultivo. Ejemplo de medios de cultivo Diferenciales son:

- Agar Mac Conkey
- Agar EMB
- Agar Sangre
- Agar XLD
- Agar Sal y Manitol
- S-110

1.5 Tipos de siembra bacteriana

Para estudiar las propiedades de un microorganismo es necesario sembrar en un cultivo puro libre de otros microorganismos. Para obtenerse debe aislarse de una sola célula bacteriana y cultivarse de tal manera que su progenie también permanezca aislada. Para esto se dispone de varios métodos:

✓ Sembrado en placa

Las células que crecen sobre o dentro de medios sólidos se encuentran inmóviles; por consiguiente, si unas cuantas células se colocan en o sobre un medio gelificado, esta célula crece y da una colonia aislada. Los tipos de siembras que se realizan sobre la superficie de un medio de cultivo en placa sólido son por estría cruzada, estría masiva y estría abierta a partir de una cepa pura.

La siembra por estría: En medios de cultivo con agar en su superficie se realiza la inoculación primaria con un asa o hisopo para desaminar la muestra en las 4

bandas realizadas. El inóculo se desamina con un movimiento hacia atrás y hacia adelante en cada cuadrante girando la placa a 90 °C. El asa se debe esterilizar en un mechero al rojo vivo y se debe enfriar en la superficie del agar cada vez que se realice un cuadrante.

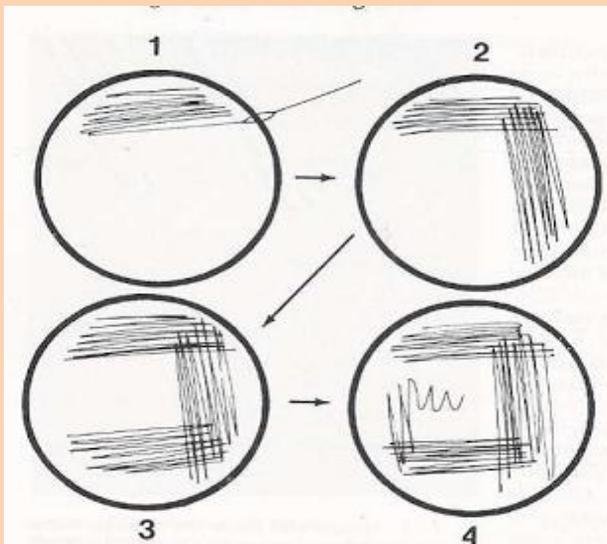


Figura 1.27. Siembra por Estría Cruzada²⁷

Vaciado en placa

En este método se mezcla una suspensión de células con agar fundido a 50 °C y se vacía en caja de Petri cuando el agar solidifica, las células se inmovilizan en este y crecen las colonias. Si la suspensión de células estaba suficientemente diluida, las colonias estarán bien aisladas, de tal suerte que cada una tiene una gran posibilidad de haber derivado de una célula única. Sin embargo para estar seguros, se toma una colonia del tipo deseado, se suspende en solución salina estéril y se vuelve a sembrar en placa. La repetición de este procedimiento varias veces asegura la obtención de un cultivo puro.

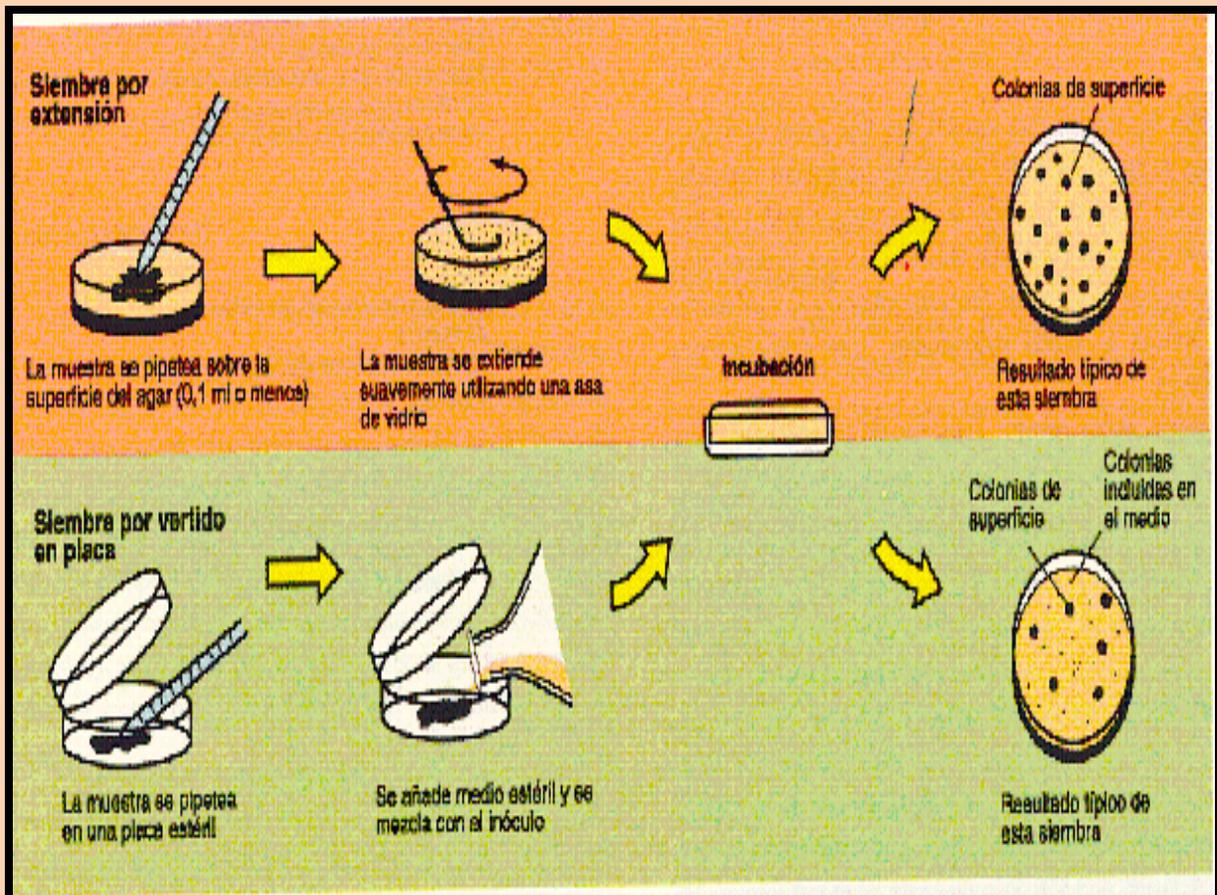


Figura 1.28. Método de Vaciado en placa²⁸

✓ Método por dilución

Un método menos seguro es el método de dilución por extensión. Al diluir cultivos mixtos en caldo, se obtendrá una dilución final que solo contendrá al microorganismo más predominante en la muestra inicial. Posteriormente se aplica el procedimiento al vaciado en placa agregando primeramente 1 mL de la dilución y enseguida el medio de cultivo fundido a 50 °C, para después mezclar en movimiento en forma de ocho suavemente en la caja Petri sobre la base de la mesa. Este proceso es importante para que la bacteria que se intenta aislar esté presente en cantidades mayores que las otras que se encuentran mezcladas.

Siembra en tubo

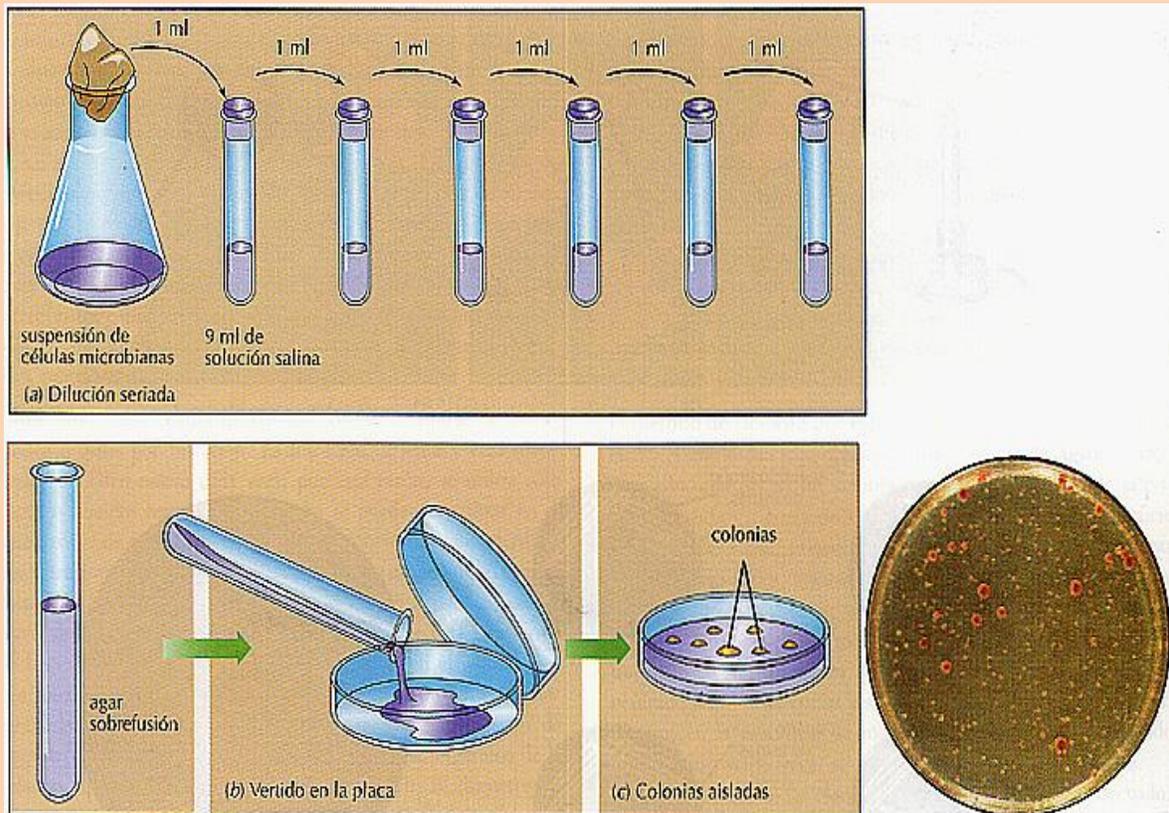


Figura 1.29. Método por dilución para obtención de colonias aisladas²⁹

En las siembras con tubos de ensaye, los medios de cultivo son principalmente líquidos, además se puede realizar en semisólidos (0.3-0.5% de agar) o sólidos (1-2% de agar) y estos pueden ser inoculados con alambre de nicho. ²⁵

1- Medio Sólido en pico flauta

Los pico flauta o picos inclinados en agar se inoculan de la siguiente forma: Primero se atraviesa el fondo del agar hasta las tres cuartas partes con el alambre de inoculación y posteriormente este se retira siguiendo el mismo camino de punción y después al llegar a la superficie se desamina el inoculo sobre la superficie del pico flauta formando una estría en forma de S. Este método se puede realizar en pruebas bioquímicas de TSI, KIA, LIA, y CS.



Figura 1.30. Siembra por picadura $\frac{3}{4}$ partes del medio sólido y estría abierta en superficie³⁰

✓ **Medio semisólido**

Los tubos con agar semisólido en los cuales pueden detectarse la prueba de motilidad, se inoculan puncionando el agar con el alambre recto hasta las tres cuartas partes, el cual debe retirarse a lo largo del mismo camino que se usó para atravesar inicialmente el medio de cultivo, ya que es importante que se evite un movimiento en forma de abanico porque puede dar como resultado un patrón de crecimiento a lo largo de la línea de entrada que puede interpretarse erróneamente como motilidad bacteriana. Los medios semisólidos en los cuales se puede realizar la detección de motilidad son en MIO Y SIM.

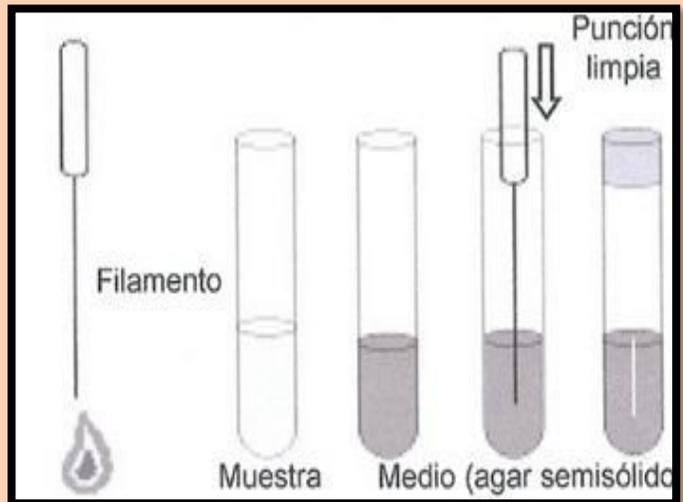


Figura 1.31. Inoculación por punción con asa recta. Medio Semisólido³¹

2- Medio Líquido

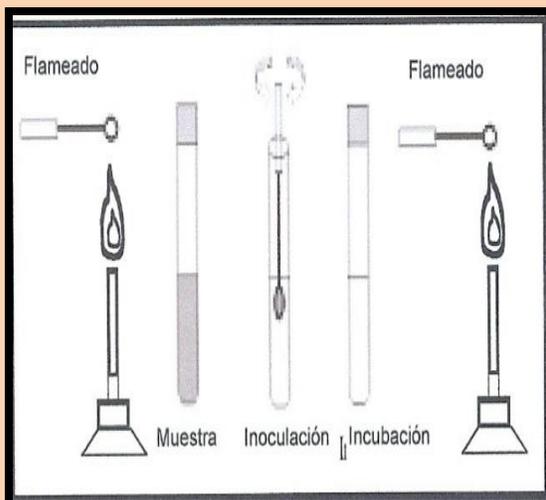


Figura 1.32. Inoculación por agitación³²

Los medios líquidos en tubo pueden inocularse colocando al tubo inclinado en un ángulo de aproximadamente 30°, posteriormente con un asa de inoculación se coloca la muestra tocando la superficie interna del vidrio, exactamente por encima del

punto donde la superficie del medio forma un ángulo agudo cuando el tubo se vuelve a colocar en posición vertical., el área de inoculación queda sumergida en el medio. Otra forma de **inoculación por agitación** es depositando la muestra en un asa bacteriológica, luego introducir el asa al tubo que contiene el medio líquido y posteriormente agitar suavemente. Realizar la siembra con los métodos anteriores cerca de la flama de un mechero, para evitar contaminación.^{26,27}



Figura 1.33. Crecimiento de colonias aisladas en la superficie de Agar Sangre³³

1.5.1 Morfología Colonial

Cuando las bacterias crecen en la superficie de un medio de cultivo solidificado, las células bacterianas que proliferan quedan prácticamente en posición fija y forman colonias de millones y millones de células aglomeradas que se observan a simple vista para poder ser diferenciadas por morfología colonial.

Las Colonias formadas por aglomeración tienen dimensiones apenas visibles, son masas de varios milímetros de diámetro, las colonias presentan características no solo de volumen, sino también de forma y textura. En algunos casos hay pigmentación de colonias, que si bien hasta cierto punto, esto va depender del indicador que contenga el medio de cultivo, en circunstancias son de gran valor

diferencial, por lo tanto la morfología de las colonias bacterianas son de mayor importancia para la diferenciación de especies.

La dimensión de las colonias bacterianas, en condiciones favorables para el cultivo son uniformes para cada tipo de especie.

Algunas características tomadas en cuenta para la morfología colonial son las siguientes:

Cuadro 2. Tipos de morfología colonial.			
Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme	Entero	Plana	Lisa o rugosa
Circular	Ondulado	Elevada	Mate o brillante
Rizoides	Lobulado	Convexa	Seca o cremosa
Irregular		Crateriforme	Invasiva o superficial
Filamentosa	Filamentoso	Acuminada	

Figura 1.34. Morfología Colonial³⁴

Diámetro:

Las colonias que se forman en la superficie de un medio de cultivo sólido en placa se debe medir el diámetro de una colonia aislada en mm, por ejemplo las colonias del género *Streptococcus* son relativamente pequeñas de 0-1mm de diámetro, mientras que las colonias de *Staphylococcus* y bacilos entéricos son algo mayores.

Borde:

Las formas de la colonia dependen de sus bordes y de su espesor. El borde puede ser liso o regular en mayor o menor grado, el espesor puede ser mucho mayor en el centro de la colonia. En ocasiones las podemos encontrar a las colonias con borde entero, ondulado, lobular, filamentosas, dentada o enrollada.

Color:

Depende del indicador que se utilice en cada medio de cultivo y de las condiciones de incubación; en algunos casos las colonias presentan pigmentación propia como resultado del metabolismo bacteriano.

Forma:

La forma de una colonia bacteriana puede presentarse como puntiforme, irregular, circular. Filamentosa, rizoide y fusiforme.

Elevación:

La elevación de las colonias bacterianas se pueden apreciar tomando el agar en placa y acercar a la vista las colonias para observar si se presentan con elevación plana, elevada, convexa, cóncava, pulvinada y umbilicada.

Luz Reflejada:

Se puede observar las colonias como:

- a) Brillantes
- b) Mate

Luz Transmitida:

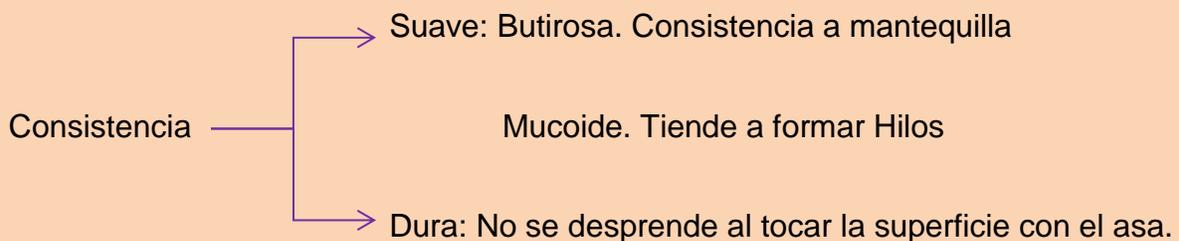
- Se observan las colonias levantando la placa y colocándose a contra luz.
- Opacos: Cuando no permite el paso de la luz.
- Traslucidas: Cuando permite levemente el paso de la luz
- Transparentes: Permiten el paso de la luz

Superficie:

Las colonias se observan en su superficie lisa, reluciente, estirada y radial. En características se reportan como Lisa, Rugosa o Granular.

Consistencia:

Encontramos colonias secas, friables como las colonias que al ser tocadas con un asa estéril no pueden desplazarse fácilmente de la superficie del medio de cultivo.



Hemólisis:

Hemólisis alfa: Las colonias se encuentran rodeadas de una zona verde debido a la oxidación de la hemoglobina.

Hemólisis Beta: Las colonias se encuentran rodeadas de una zona transparente debido a la destrucción total de eritrocitos

Hemólisis Gamma: Las colonias no presentan ningún cambio de color alrededor de la colonia.

Alfa prima: un pequeño halo de eritrocitos de carnero intactos o parcialmente lisados permanecen adyacentes a la colonia. [28,29]



Figura 1.35. Tipos de hemólisis en agar sangre de carnero al 5 %³⁵

1.6. Tinciones

Las tinciones son técnicas que nos permiten observar con la ayuda de un microscopio óptico las estructuras bacterianas ya que las bacterias sin la ayuda de los colorantes no se alcanzan apreciar. Las tinciones se combinan químicamente con las estructuras que posee la célula procariota pero para ello se utilizan colorantes específicos que nos ayudaran a teñir a los microorganismos para que puedan ser observados en vivo y a todo color sus estructuras. Es por ello que las tinciones se clasifican en simples, tinciones diferenciales y tinciones especiales. Las tinciones Básicas consisten en un catión coloreado unido a un anión incoloro, mientras que los ácidos constituyen exactamente lo contrario.

Las células bacterianas son abundantes en ácidos nucleicos, las cuales portan cargas negativas en formas de grupo fosfato; estos se combinan con colorantes básicos con carga positiva. Los colorantes ácidos no tiñen a la célula bacteriana y por lo tanto, pueden utilizarse para teñir el fondo con un colorante de contraste (Safranina) Las tinciones básicas tiñen uniformemente a las células bacterianas, a menos que se destruya el RNA citoplasmático.



Figura 1.36. Colorantes Ácidos y Básicos³⁶

✓ **Tinción simple:**

Se utiliza para observar las forma y estructuras básica de un microorganismo, utilizando un soló colorante que sea de tipo básico y que contenga un cromógeno con carga positiva ya que la pared celular de las bacterias posee componentes con carga negativa que atraen y enlazan al cromógeno. Los colorantes básicos que más se utilizan son el azul de metileno, fucsina y Cristal Violeta.

✓ **Tinción diferencial:**

Estas reaccionan de modo diferente con las distintas clases de bacterias y por lo tanto son empleadas para establecer una distinción entre ellas. Las más utilizadas son la tinción de Gram y la tinción de BAAR (Bacilos Ácido Alcohol Resistentes) ya que se utiliza más de un solo colorante para teñir las estructuras microbianas.

✓ Tinción de Gram



Figura 1.37. Tinción de Gram. Cocos (Color morado) y Bacilos (Color rosa)³⁷

La tinción de Gram se basa en las diferencias que hay entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, la pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglucano, además de ácidos teicoicos anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática se encuentra el ácido lipoteicoico.

Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípidos y lipopolisacáridos, la clave es el peptidoglucano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana ya que las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas, la diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas por ser soluble en solventes orgánicos como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona.

La capa de peptidoglicano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta- yodo de lugol que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros, cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, para mantener así la coloración azul-violácea.

✓ Tinción BAAR (Bacilos Ácido Alcohol Resistentes)

Fue descubierta por el medico Franz Zielh y el bacteriólogo friedrich Neelsen. La tinción se basa en que las paredes celulares de ciertos ciertos parasitos y bacterias contienen ácido micólico de cadena larga de 50 a 90 átomos de carbono que les confiere la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido esto después de la tinción con colorantes básicos. Por ello a los bacilos que se tiñen con esta técnica de Zielh-Neelsen se les denomina Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR). Las bacterias acido resistentes como *Micobacterium tuberculosis* y algunos *actinomicas* se tiñen de color rojo, mientras que los BAAR negativos se tiñen de color azul intenso.

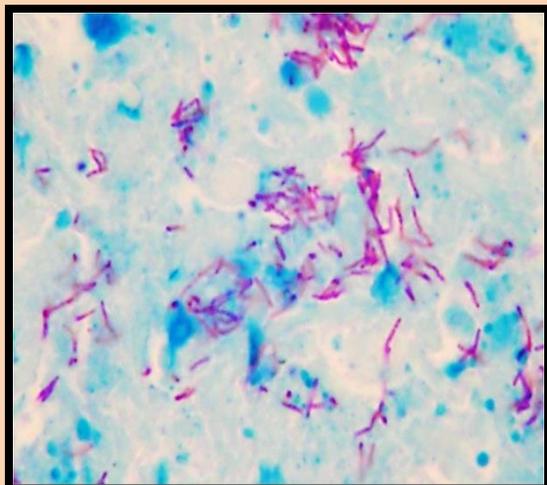


Figura 1.38. Tinción de BAAR (Bacilos Ácido Alcohol Resistentes)³⁸

✓ Tinción Negativa.

En este procedimiento consiste en la tinción de fondo con un colorante ácido para dejar a las células incoloras en contraste. Por lo general se utiliza el colorante negro de nigrúsina este método sirve para observar bacterias o estructuras que difícilmente se tiñen como las esporas y capsula.



Tinción de tinta china.

Se usa ampliamente para poder llevar a cabo la observación de la presencia de capsula, principalmente este tipo de tinciones se lleva a cabo en microorganismos como *S. pneumoniae* y *K. pneumoniae*. Ya que el color de la tinta china es negro esto nos va permitir observar la capsula después, el alto contenido de lípidos que contiene no va a permitir la penetración del colorante en ella, así, que será la única parte del microorganismo NO teñido.

Técnica:

- 1) En un portaobjetos colocar una asada del cultivo y agregar una gota pequeña de tinta china y un cubreobjetos
- 2) Observar a seco fuerte y lente de inmersión.

Interpretación: Capsula se observa como una zona transparente alrededor del microorganismo que se teñirá de negro.

✓ Tinción de Capsula

Se pone de manifiesto mediante una coloración negativa o una modificación de ella. La tinción de Rojo Congo es utilizada para lograr la identificación de *K. Pneumoniae* ya que al igual que la tinción de tinta china, el colorante Rojo Congo será el único que pueda penetrar al cuerpo del bacilo sin lograr teñir la capsula que cubre a este.

Técnica.

- 1) Colocar una gota de Rojo Congo en el portaobjetos
- 2) Hacer una suspensión de la cepa. Fijar
- 3) Adicionar mordiente de Capsula por 3 minutos.
- 4) Secar y observar a microscopio óptico a 40x y 100x

Interpretación: El bacilo se observara de color rojo y la capsula como un halo transparente.

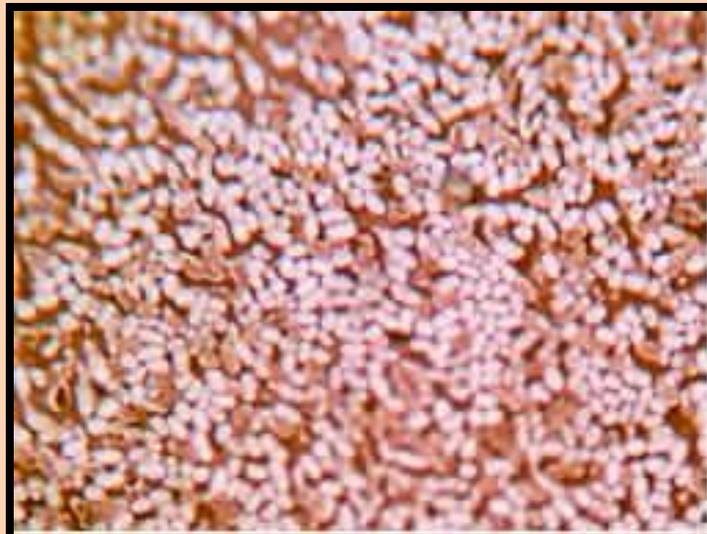


Figura 1.40. Capsula. Tinción de Rojo Congo⁴⁰

✓ Tinción de Flagelos. (Leifson)

Los flagelos son estructuras demasiado finas (12 a 30 nm de diámetro) para ser visibles en el microscopio de luz sin embargo si se tratan con una sustancia coloidal inestable de sales de ácido tánico para formar un precipitado denso en la pared celular y en los flagelos, se pueden poner de manifiesto su presencia y disposición en las células. En las bacterias peritricas los flagelos se agrupan en forma de manojo durante el movimiento y pueden ser suficientemente gruesos como para observarse en las células vivas.

Técnica:

- 1) Hacer un círculo en un portaobjetos perfectamente limpio, previamente este debió de ser sumergido en mezcla crómica por 24 horas. Y lavar con agua destilada, enjuagar con alcohol y secar con tela limpia portaobjetos.
- 2) Colocar dentro del círculo una gotita de la suspensión coloidal e inclinar el portaobjetos para extender la muestra
- 3) Fijar la preparación al aire libre
- 4) Humedecer la preparación con el colorante de Leifson y dejar a temperatura ambiente por 10 min.
- 5) Lavar con agua corriente.
- 6) Secar y observar con el objetivo de inmersión.

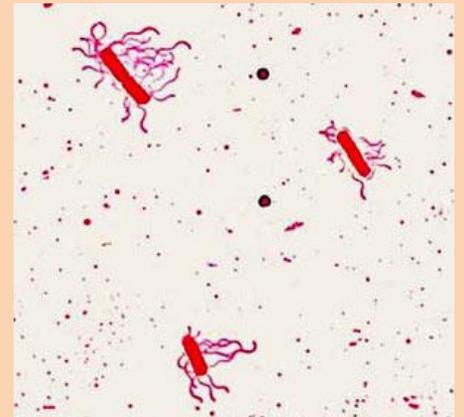


Figura 1.41. Flagelos Peritricos teñidos con T. Leifson. *Bacillus Cereus*⁴¹

Interpretación: Los flagelos en general se tiñen de color rojo en aquellas bacterias que NO presentan flagelos extremadamente delicados.

✓ Tinción de Esporas. (Shaeffer- Fulton)

Las esporas se observan de la manera más simple como cuerpos refringentes intracelulares en suspensiones bacterianas sin teñir o como zonas incoloras dentro de las células bacterianas teñidas con los métodos habituales. Las esporas comúnmente se tiñen con el colorante verde de Malaquita y Carbofucina.

La composición de la spora en relación con la de la célula originaria varía principalmente por su menor contenido de agua y la presencia característica de ácido dipicolínico. La resistencia a las condiciones físicas desfavorables se debe al compuesto formado por el ácido dipicolínico y sales de calcio, formando un dicalciato de calcio.

Técnica:

- 1) Cubrir la preparación con verde de malaquita y calentar a emisión de vapores por un minuto sin dejar secar el colorante.
- 2) Lavar con H₂O corriente.
- 3) Cubrir la preparación con safranina durante 15 minutos.
- 4) Lavar con H₂O corriente y dejar secar al aire.

Interpretación: Las esporas aparecen de color verde y el citoplasma de color rojo.

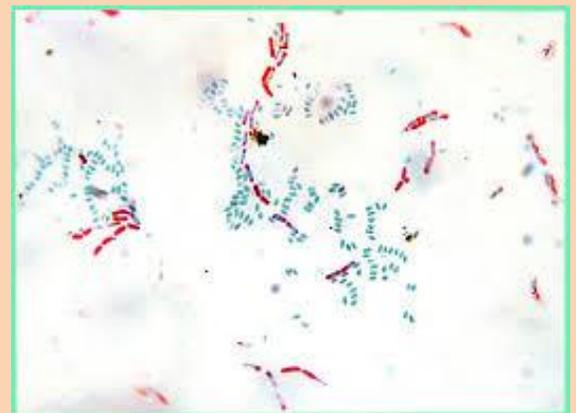


Figura 1.42. Esporas. T. de Shaeffer-
Fulton⁴²

✓ Tinción de Gránulos metacrómaticos

Se utiliza para la identificación del género *Corynebacterium* el cual presenta la estructura de gránulos metacrómaticos que lo caracterizan; lo cual se pueden identificar por medio de la tinción de Albert y la tinción de Loeffler.

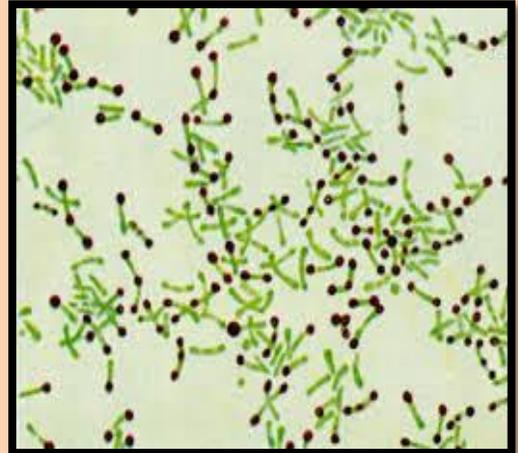


Figura 1.43. *Corynebacterium*
Gránulos Metacrómaticos⁴³

Tinción de Albert:

- 1) Teñir con el colorante de Albert por 3 a 5 min.
- 2) Lavar con H₂O corriente
- 3) Cubrir con solución
- 4) Lavar con H₂O y dejar secar al aire.

Interpretación: El citoplasma aparece de color verde y los gránulos de color azul intenso

Tinción de Loeffler:

Se lleva a cabo esta tinción para diferenciación del género *corynebacterium* para la observación de gránulos metacrómaticos. Utilizando el colorante de Loeffler.

- 1) Cubrir el frotis de colorante de Loeffler y dejar actuar por 1 min.
- 2) Lavar con agua corriente; observar la preparación a 40x y 100x

Interpretación: Los gránulos toman el colorante rápidamente y aparecen de color azul intenso y el citoplasma verde.²⁸

- **Morfología Microscópica**

La morfología de las células procariontas bacteriana son: esféricas llamadas cocos y en bastoncillos llamadas bacilos. Una bacteria en forma de bastoncillo se le llama bacilos. Las células tienen muchas otras formas como *cocobacilos*, un bastoncillo curvado corto o en forma de coma se le llama *vibriones*, mientras que un bastoncillo curvo lo suficientemente largo para formar espirales se le llama espirilo. Una célula helicoidal larga con pared flexible y un mecanismo único de motilidad se le llama espiroqueta. Las bacterias que varían en su forma se les llaman pleomórficas.

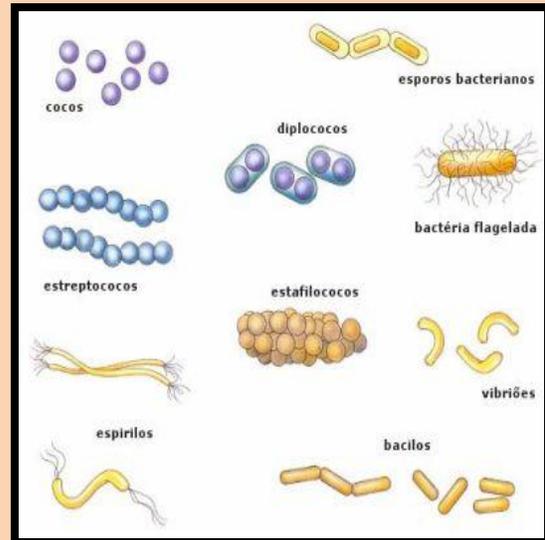


Figura 1.44. Morfología Bacteriana⁴⁴

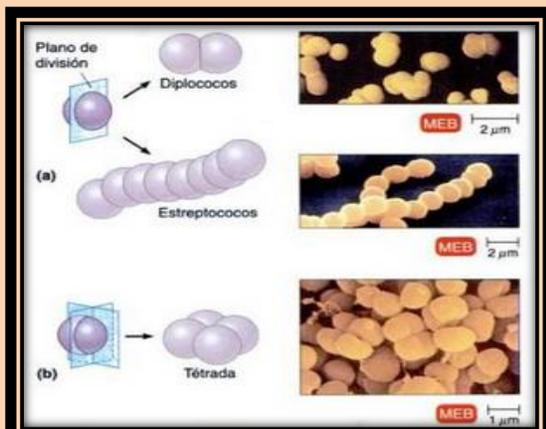


Figura 1.45. Agrupación de cocos⁴⁵

En las agrupaciones la mayoría de las células procariontas esto se ve en especial en los cocos porque se pueden dividir en más de un plano. Las células se dividen en un plano pueden formar cadenas de longitud variable, algunos cocos forman cadenas largas, estos son típicos del género *Streptococcus*, los cocos que se dividen en 2 a 3 planos perpendiculares uno a otro forman paquetes cúbicos como las sarcinas, los cocos se dividen en planos al azar que pueden formar racimo de uvas tales como los *Staphylococcus*.

1.7. Sistemas Comerciales Manuales



Son celdas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se

expresan de forma numérica y se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trio de pruebas queda reducido a un dígito. Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la decodificación de las reacciones de las pruebas que se utilizaron. Para codificar el dígito de un trio de pruebas se establece el siguiente sistema:

- Si una prueba cualquiera es negativa, se le asigna un valor de cero
- Si la primera prueba es positiva, se le asigna el valor de 1
- Si la segunda prueba es positiva, se le asigna un valor de 2
- Si la tercera prueba es positiva, se le asigna un valor de 3

Ante un microorganismo problema, se busca el código numérico y se comprueba a qué bacteria pertenece. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: **API** (bioMérieux), Enterotube (**BBL**), Oxi/Ferm Tube (BD), systems.MicroID (Remel). Y Biochemical ID systems (Microgen)

1.7.1 Sistemas Comerciales Automatizados

En el mercado hay varias compañías que fabrican y distribuyen equipos automatizados siendo los más utilizados: MicroScan (Siemens), Vitek I y II (BioMerieux) y Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic System) ya que el sistema de base de datos es asistido por computadoras para identificar los microorganismos. Todos los fabricantes utilizan metodologías diferentes para el mismo fin y brindan información de la identificación bacteriana en tiempos cercanos a las 4 horas. Los equipos, también pueden tipificar y realizar la sensibilidad antibacteriana, antifúngica de levaduras dependiendo del microorganismo en estudio.

Los equipos automatizados, representan una gran ayuda para los integrantes de los laboratorios de microbiología, pero no pueden sustituir al personal entrenado, capacitado y actualizado en esta área. A modo de ejemplo sería el caso de la susceptibilidad a organismos fastidiosos como *Neisseria ssp.* y *Haemophilus spp.*, algunos bacilos Gram negativo no fermentadores y bacilos Gram positivos, perfiles de resistencia específicos para determinados organismos de la familia *Enterobacteriaceae*, así como antibióticos que no se encuentren dentro de los dispositivos (tarjetas o paneles según fabricante) del equipo automatizados.²⁹



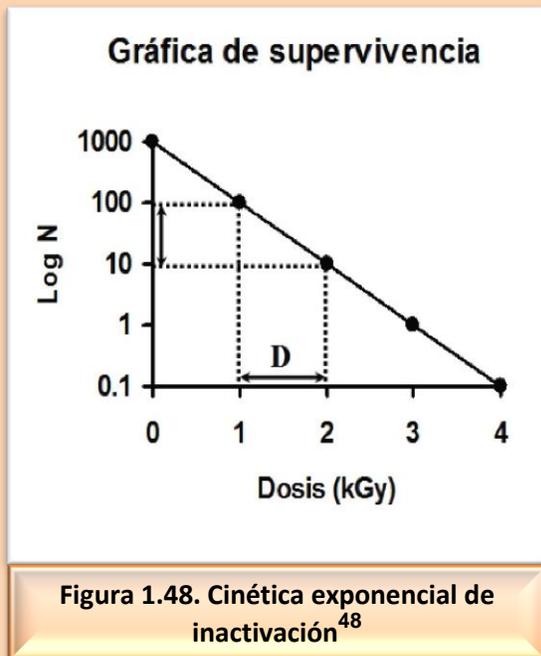
Figura 1.47. Sistema Automatizado microbiológico (MicroScan) marca. Walk Away 96. PLUS⁴⁷

1.8. Control Microbiológico.

El control microbiano comenzó alrededor de casi 100 años de los cuales se dividen en métodos físicos y métodos químicos que se utilizan para destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos que se encuentran en el medio ambiente o fómites que contaminen la población humana y animal. Ya que estos métodos utilizados no solo han revolucionado la asepsia de las industrias alimentarias si no también ayudan a mantener un mejor control de calidad en cuanto a la sanitización de productos comerciales que llegan hacer blanco fácil por parte de los microorganismos. Por lo tanto el control de crecimiento microbiano se debe de tomar muy en cuenta para eliminar principalmente las esporas que resisten a la desecación.

1.8.1 Métodos Físicos

Cuando se seleccionan métodos para el control microbiano deben considerarse



sus efectos sobre otros elementos además de los microbios. Por ejemplo. Ciertas vitaminas o algunos antibióticos en solución podrían ser inactivados por el calor. Muchos materiales de laboratorio u hospitalarios, como sondas de goma y látex, se alteran por el calentamiento repetido. También hay consideraciones económicas; por ejemplo, puede ser

menos costoso utilizar material de plástico desechable y preesterilizado a comparación de estar lavando y esterilizando repetidamente el material de vidrio.

- **CALOR**

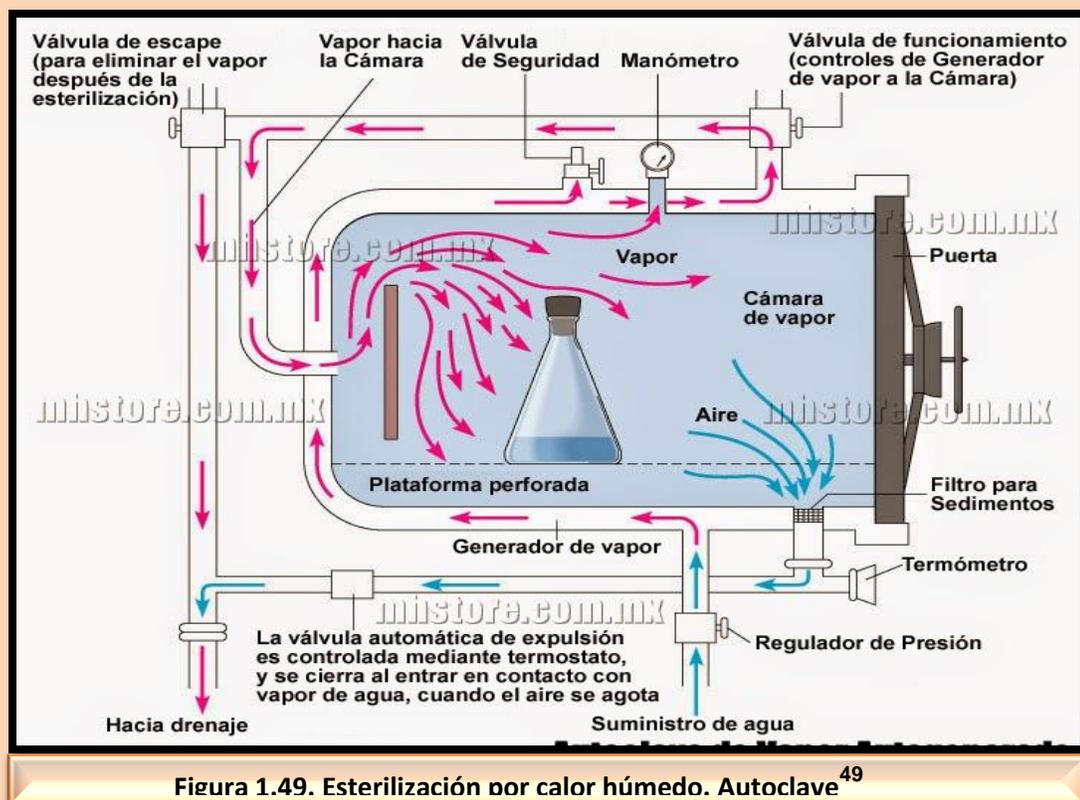
Este método físico se utiliza para destruir microorganismos mediante la desnaturalización de enzimas, es decir los cambios resultantes de la estructura tridimensional de proteínas produce su inactivación. La resistencia al calor varía entre los diferentes microbios, esta diferencia puede expresarse a través del concepto de **punto térmico mortal** (PTM) que es la temperatura más baja necesaria para causar la muerte de todas las bacterias en suspensión líquida particular en 10 min.

Otro factor que se debe considerar en la esterilización es el tiempo requerido, que se expresa como **tiempo de muerte térmica** (TMT) que es el menor tiempo necesario para que todas las bacterias de un cultivo líquido mueran a una temperatura determinada. Tanto el PMT como el TMT son guías útiles que indican la intensidad del tratamiento requerido para destruir a una población dada de bacterias; El Tiempo de reducción decimal (TRD o valor D) está relacionado con el grado de resistencia bacteriana al calor.

- **CALOR HÚMEDO**

Este método destruye a los microorganismos sobre todo por la coagulación de las proteínas (desnaturalización), que es causada por la rotura de los enlaces de hidrógeno que mantienen la estructura tridimensional. Este tipo de esterilización por calor húmedo es la ebullición, que causa la muerte de las

formas vegetativas de las bacterias patógenas, de casi todos los virus y de los hongos y sus esporas principalmente en unos 10 a 15 minutos o por lo general mucho antes si el vapor fluye sin presión a una temperatura equivalente a la del agua hirviendo; en cambio las endosporas y algunos virus no se destruyen con tanta facilidad. La esterilización confiable por calor húmedo requiere temperaturas superiores a la ebullición del agua estas temperaturas elevadas se alcanzan con más frecuencia mediante vapor bajo presión en autoclave. La colocación de la autoclave es el método preferido de la esterilización a menos que el material que se desea esterilizar pueda ser dañado por el calor o la humedad, La autoclave se utiliza para la esterilización de medios de cultivo, instrumentos, ropas, jeringas, soluciones, equipos de transfusión, y muchos otros artículos que puedan soportar temperaturas y presiones altas.



- **Pasteurización**

En la microbiología hace más de 100 años el químico francés Louis Pasteur descubrió un método práctico para prevenir el deterioro de la cerveza y del vino. Pasteur utilizaba un calentamiento leve que resultaba eficiente para destruir microorganismos; aunque más tarde se aplicó el mismo principio a la leche para



Figura 1.50. Ultrapasteurización industrial⁵⁰

producir leche pasteurizada.

El objetivo de la pasteurización de la leche era eliminar los microbios patógenos, también disminuir la cantidad de microorganismos, lo que prolonga la buena calidad de leche en condiciones de refrigeración.

Muchas bacterias relativamente resistentes al calor (termodúricas) sobreviven a la pasteurización pero es poco probable que causen enfermedades o el deterioro de la leche refrigerada. El tratamiento de la pasteurización clásico de la leche esta se exponía a una temperatura de unos 63 °C durante 30 min. La mayoría de los procedimientos de pasteurización utilizados en la actualidad emplean temperaturas mayores al menos de 72 °C, pero solo 15 segundos. La leche también se puede esterilizar mediante temperaturas ultraelevadas (Ultrapasteurización) esta sirve para poder conservar la leche sin refrigeración. Este tratamiento consiste en calentar la leche a 140 °C durante 1 a 3 segundos.³⁰

- Esterilización por calor Seco

Este proceso se aplica a todo material cuya resistencia térmica sea superior a los



Figura 1.51. Estufa para esterilización por calor seco⁵¹

150 °C por ejemplo material de vidrio o metales con cierre hermético, además de la esterilización de ceras, vaselina, aceite, talco, etc. Todo material a tratar de forma individual o conjunta debe colocarse en recipientes de acero inoxidable ya que al final del proceso se debe dejar enfriar el material dentro de la estufa.

Otra forma de esterilización por este método es la esterilización por aire caliente. Los objetos por lo que se van a esterilizar por este método se colocan en una estufa a una temperatura de aprox. 180 °C durante cerca de 2 horas asegura una buena esterilización en instrumentos dentales, quirúrgicos.

Filtración

Es el pasaje de un líquido, o de un gas a través de un material poroso lo suficientemente pequeños como para retener microorganismos, se crea un vacío en el frasco receptor; la presión del aire ejerce fuerza sobre líquido a través del filtro. La filtración se utiliza para la esterilización de materiales termosensibles, cultivos líquidos, enzimas, vacunas y soluciones de antibióticos.

Los filtros de membrana compuestos por sustancias como esteres de celulosa o polímeros de plásticos, se han convertido en una herramienta de uso frecuente en la industria y en el laboratorio. Estos filtros tienen solo 0.1 mm de espesor. Los poros de los filtros de membrana incluyen por ejemplo tamaños de 0.22 μm y 0.45 μm , diseñados para retener bacterias. Sin embargo algunas bacterias muy flexibles, como las *espiroquetas* y las *micoplasmas* sin paredes celulares, a veces atraviesan esos filtros debido a que las bacterias son más pequeñas que los poros utilizados. Se dispone de poros con apenas de 0.01 μm , un tamaño que puede retener los virus e incluso algunas moléculas proteicas grandes.

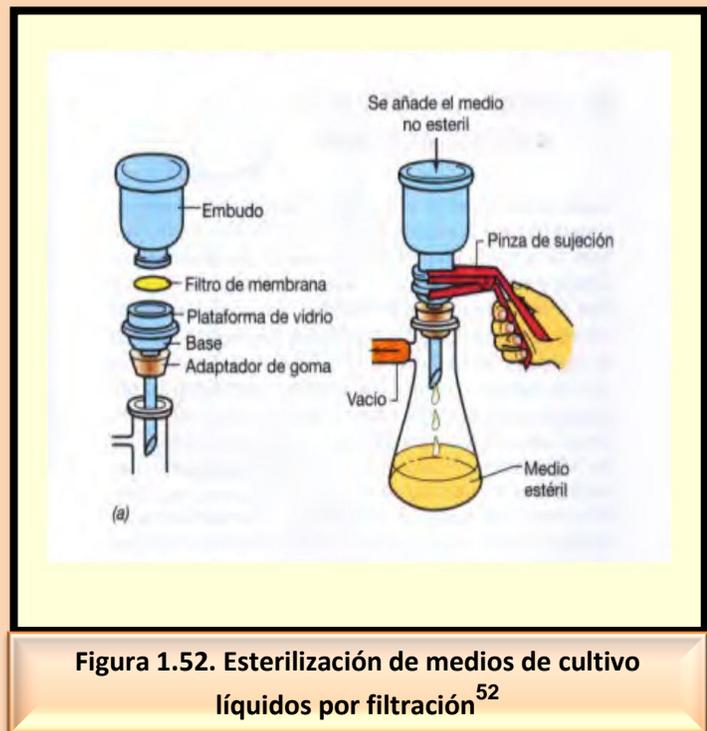


Figura 1.52. Esterilización de medios de cultivo líquidos por filtración⁵²

- **Bajas Temperaturas**

El efecto de las bajas temperaturas sobre los microorganismos depende del microorganismo en particular y de la intensidad de la aplicación. La temperatura habitual de refrigeración es de 0 a 7 °C, la actividad metabólica de la mayoría de los microorganismos es tan reducida que no pueden reproducirse ni elaborar toxinas. Ya que la refrigeración tiene un efecto bacteriostático sin embargo las bacterias *psicrófilas* crecen lentamente a temperatura del refrigerador que pueden alterar el aspecto y sabor de los

alimentos después de tiempo. La congelación lenta es más perjudicial para las bacterias, los cristales de hielo que se forman y crecen rompen las estructuras celulares y moleculares. Muchos parásitos eucariontes como el *nematodo* que produce la *triquinelosis* humana son destruidos por varios días a temperaturas de congelación.

- **Desección**

En la ausencia de agua los microorganismos no pueden crecer ni reproducirse pero pueden permanecer viables durante varios años. Después si disponen de agua pueden recuperar su capacidad de crecimiento y división. Esta propiedad se utiliza en el laboratorio cuando se conservan los microorganismos durante la liofilización, o congelación.

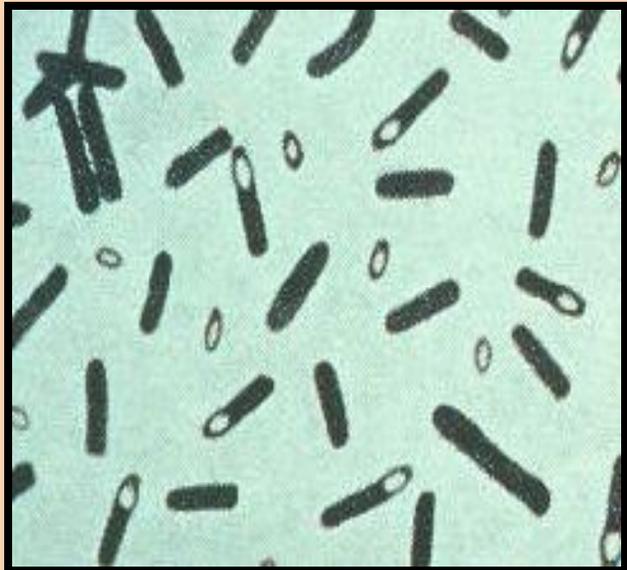


Figura 1.53. Endosporas de *Clostridium*⁵³

La resistencia de las células vegetativas a la desecación varía según la especie y el ambiente que rodea al microorganismo. Los virus suelen ser más resistentes a la desecación pero no tanto como las endosporas bacterianas, algunas de las cuales han sobrevivido durante siglos.

- **Presión Osmótica**

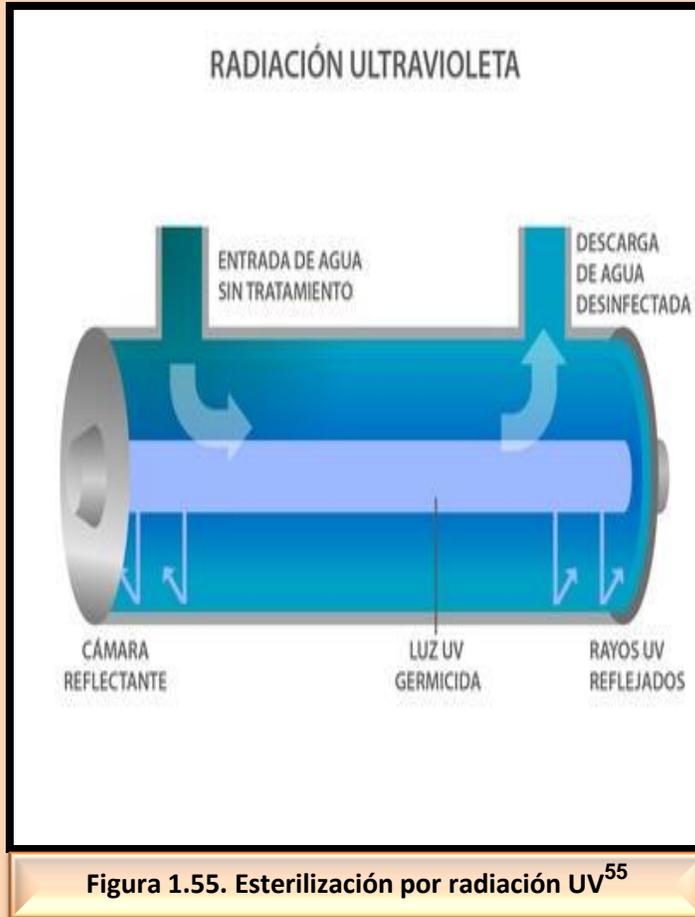
La utilización de altas concentraciones de azúcares y de sales para conservar los alimentos se basa en los efectos de la presión osmótica. Las altas concentraciones de ciertas sustancias crean un ambiente hipertónico que determinan que el agua abandone la célula microbiana. Este proceso se asemeja a la desecación porque ambos métodos privan a la célula de la humedad necesaria para su desarrollo. El principio de la presión osmótica se utiliza en la conservación de alimentos por ejemplo se utilizan soluciones concentradas de sal para curar carnes comestibles y soluciones concentradas de azúcar para conservar frutas. Como regla general los hongos filamentosos y las levaduras son más capaces que las bacterias en crecer en materiales con baja humedad.

Radiación

Tiene varios efectos sobre la célula, esto depende de la longitud de onda utilizada, de su intensidad y de su duración. La radiación que causa la muerte de los microorganismos (radiación esterilizante) es de dos tipos ionizante y no ionizante. La primera son rayos gamma, rayos X o haces de electrones de alta energía esta se utiliza para la esterilización de productos farmacéuticos y materiales dentales y médicos desechables como guantes de cirugía, jeringas, materiales de sutura y catéteres.



Figura 1.54. Esterilización ionizante⁵⁴



La radiación no ionizante tiene una longitud de onda mayor que las ionizantes por lo general superior a 1 nm, la luz ultravioleta lesiona el ADN de las células expuestas, porque forma enlaces entre las bases de piridina por lo general en timinas que se encuentra en las cadenas de ADN.

1.8.2 Factores Químicos

Los agentes químicos se utilizan para el control del crecimiento microbiano tanto en tejidos vivos como objetos animaculados. Lamentablemente son pocos los agentes químicos que logran la esterilidad; la mayor parte de ellos solo reducen las poblaciones microbianas a niveles seguros o eliminan las formas vegetativas de los patógenos. Un problema frecuente es la desinfección es la selección de un agente. No existe un desinfectante único que sea apropiado para todas las circunstancias ³¹

Cuadro 3. Agentes químicos utilizados para el crecimiento microbiano ³²

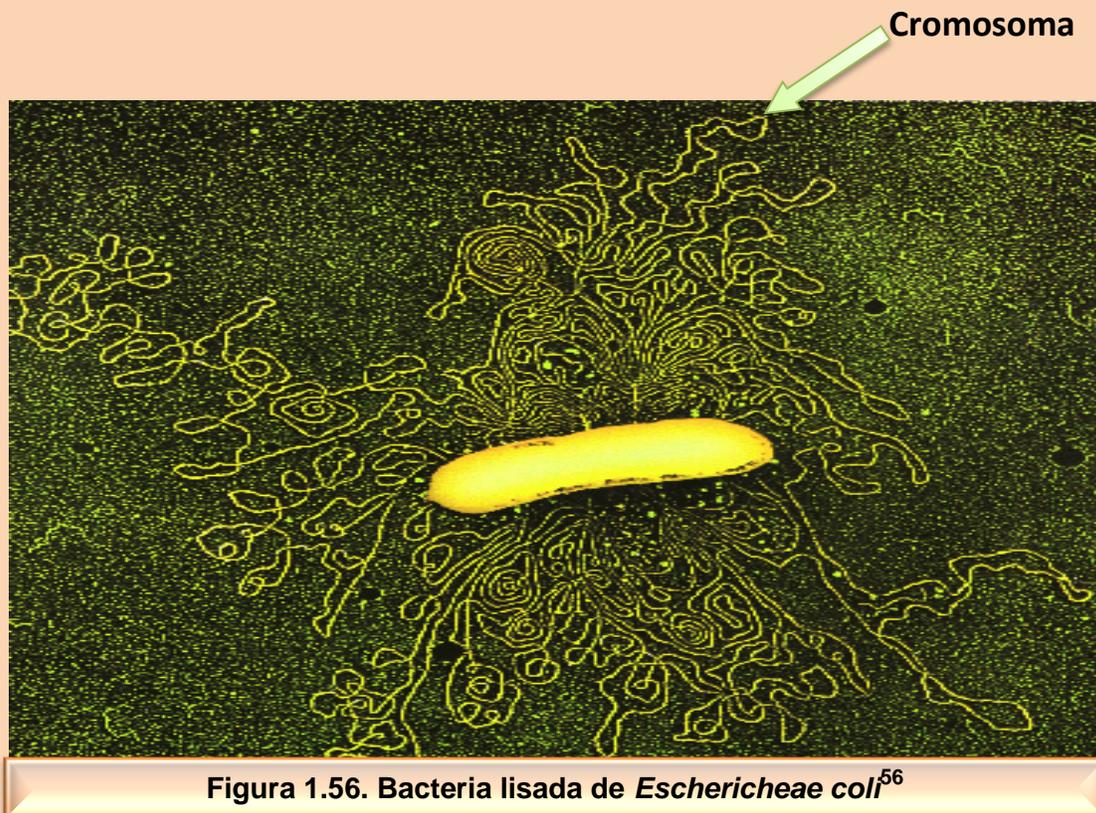
Agentes Tensoactivos	Eliminación mecánica de microorganismos a través de lavados	De germinación de la piel y eliminación de detritos	Jabones antibacterianos
1- Fenol y sus derivados	Rotura de la membrana citoplasmática, desnaturalización de enzimas	Se utiliza rara vez, salvo como estándar de preparación	Se utiliza como desinfectante o antiséptico rara la vez debido a sus propiedades irritantes y su olor desagradable
2-Fenólicos	Rotura de la membrana citoplasmática y desnaturalización de enzimas	Superficies ambientales, instrumentos; superficies cutáneas y mucosas	Derivados de fenol que reaccionan incluso en presencia de materia orgánica; como el ortofenol
3-Bisfenoles	Probablemente la rotura de la membrana citoplasmática	Jabones de manos, desinfectantes y lociones cutáneas	El triclosan es de amplio espectro y es eficaz contra Gram positivas
Biguanidas (Ciclohexidina)	Rotura de la membrana citoplasmática	Desinfección cutánea, en especial por el lavado quirúrgico	Bactericida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, no toxico y persistente
Halógenos	El yodo inhibe la función de las proteínas y es un fuerte agente oxidante ácido hipocloroso que altera componentes celulares	Yodo es un antiséptico eficaz disponible con tintura de yodo, el cloro gaseoso es para desinfectar el agua	El yodo y el cloro pueden actuar solo como componentes de compuestos inorgánicos y orgánicos
Alcoholes	Desnaturaliza las proteínas y disolución de los lípidos.	Termómetros y otros instrumentos en el frotado de la piel con alcohol etílico antes de una inyección	Bactericidas y fungicidas pero no es eficaz contra endosporas o virus sin envoltura, los alcoholes utilizados con frecuencia son el etanol y el isopropanol
Metales pesados	Desnaturalización de enzimas y otras proteínas esenciales	El nitrato de plata se utiliza en R/N evitar la oftalmía neonatal gonocócica, sulfadiazina como crema tópica para quemaduras.	Los metales pesados como la plata y el mercurio son biocidas

1- Compuestos de amonio Cuaternario (Detergentes Catiónicos)	Inhibición de enzimas, desnaturalización de proteínas y alteración de la membrana citoplasmática	Antiséptico para piel, instrumentos, utensilios, elementos de goma	Bactericida, bacteriostático, fungicida, y viricida contra virus que poseen envoltura
Conservantes químicos de alimentos. 1-Ácidos Orgánicos	Inhibición metabólica, afecta sobre todo a los hongos filamentosos; su acción no se relaciona con su acidez	El ácido sórbico y el ácido benzoico son eficaces a pH bajo, los parabenos se utilizan más en cosméticos y champús; el propionato de calcio en pan	Ampliamente utilizado para cosméticos, bacterias de alimentos y hongos filamentosos
2- Nitratos y Nitritos	El componente activo es el nitrito; producido por la acción bacteriana sobre el nitrato. El nitrito inhibe ciertas enzimas de microorganismos anaerobios que contiene hierro	Productos cárnicos como el tocino, embutido y salchichas	Previene el crecimiento de <i>Clostridium botulinum</i> en los alimentos, también imparten un color rojo en el producto cárnico
Aldehídos	Desnaturalización de proteínas	El glutaraldehido es menos irritante que el formaldehido y se utiliza para esterilizar instrumentos médicos	Antimicrobiano muy eficaz.
Esterilizantes químicos gaseosos	Desnaturalización de proteínas	Excelente agente esterilizante, en especial para objetos que podría ser dañado por el calor como guantes de látex, jeringas, instrumentación médica	El óxido de etileno se utiliza con mayor frecuencia.
Peróxidos (agentes oxidantes)	Oxidación	Superficies contaminadas, algunas heridas profundas	El O ₃ es un buen oxidante y el H ₂ O ₂ es un mal antiséptico pero un buen desinfectante

1.9 Genética Bacteriana

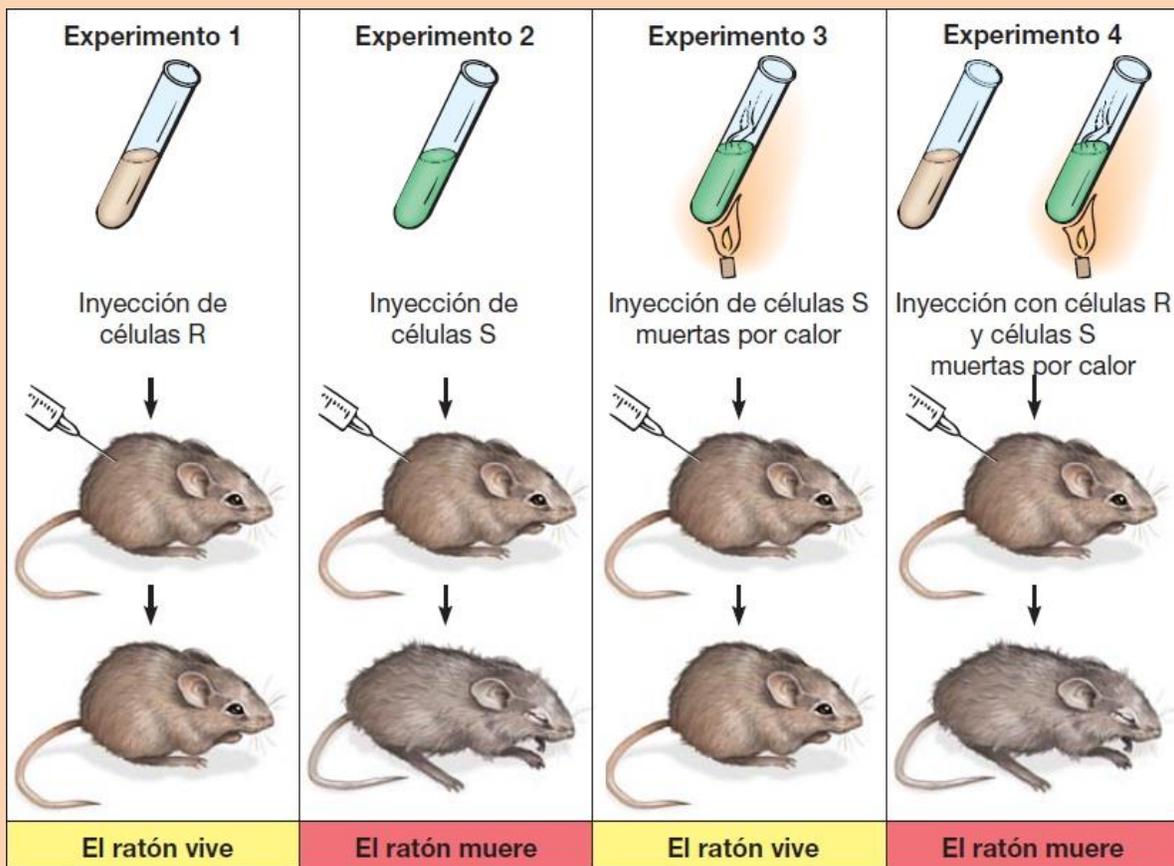
La genética es la ciencia de la herencia que estudia que son los genes, como transportan la información, como se replican y como se transmite de generación en generación la información genética del ADN. La información genética contenida en una célula se denomina genoma.

Las bacterias tienen un cromosoma circular único formado por una sola molécula circular de ADN asociada con proteínas. El cromosoma forma un bucle pegado y adherido en uno o varios puntos en la membrana citoplasmática. El ADN de *E. coli* la bacteria más estudiada tiene alrededor de 4.6 millones de pares de bases y casi 1 mm de longitud, ósea que es 1000 veces más largo que una célula completa. La ubicación de los genes sobre un cromosoma bacteriano se determina por transferencia de genes de una célula a otra.



- **Transformación Bacteriana**

Durante el proceso de transformación los genes se transfieren de una bacteria a otra como ADN “desnudo” en solución”. Este proceso se demostró por primera vez gracias al experimento realizado por Frederick Griffith el cual trabajo con dos cepas *Streptococcus pneumoniae* marcada como (R) esta es una cepa virulenta ya que cuenta con una capsula polisacarida que impide la fagocitosis, La otra cepa marcada como (S) utilizada fue avirulenta, carece de capsula y no causa enfermedad.



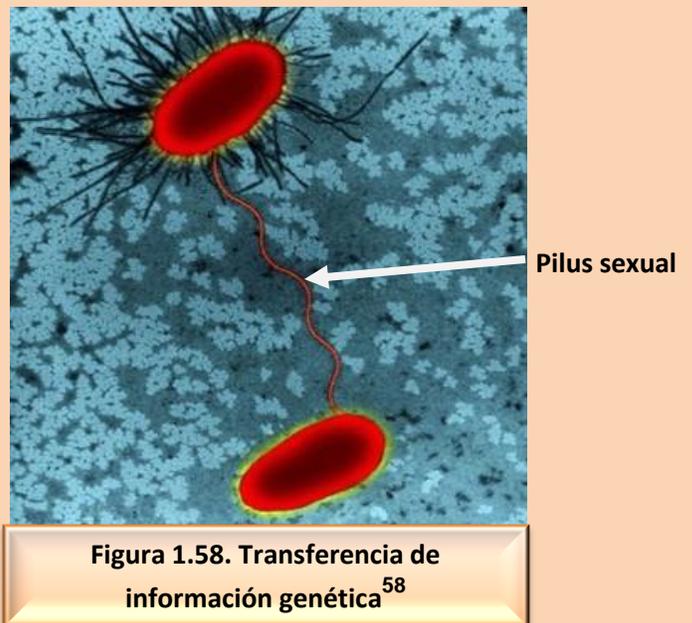
RESULTADOS Y CONCLUSIÓN: Aunque ni la cepa rugosa ni la cepa lisa muerta mediante el calor podrían causar la muerte de un ratón, una combinación de las dos cepas lo hizo. La autopsia del ratón muerto mostró la presencia de una cepa S de neumococo viva. Estos resultados indicaron que alguna sustancia en las células S muertas debido al calor, había sido capaz de transformar las bacterias R vivas en una forma virulenta.

Figura 1.57. Experimento de Frederick Griffith⁵⁷

El experimento de Griffith demostró la transformación genética para ello se utilizó bacterias vivas encapsuladas que causaban enfermedad y muerte cuando se les inyectaba al ratón. Las bacterias vivas no encapsuladas eran destruidas fácilmente por los mecanismos de defensa del huésped y el ratón permanecía sano después de la inyección. Luego de ser destruidas por el calor las bacterias encapsuladas perdían la capacidad de causar enfermedad, sin embargo la combinación de bacterias vivas no encapsuladas y bacterias muertas por calor encapsuladas provocaba enfermedad. De algún modo las bacterias vivas no encapsuladas fueron transformadas por las bacterias muertas encapsuladas de modo que adquirieron la capacidad de formar una capsula y por consiguiente de causar enfermedad.

- **Conjugación**

Otro mecanismo por el cual se transfiere el material genético de una bacteria a otra se conoce como conjugación. La conjugación es llevada a cabo por una clase de plásmido, un fragmento principal de ADN que se replica independientemente del cromosoma de la célula. Sin embargo los plásmidos difieren de los cromosomas bacterianos en que los genes que poseen no suelen ser esenciales para el crecimiento de la célula bacteriana en condiciones normales.



Para llevar a cabo la conjugación en primer se requiere que haya contacto directo entre células, en segundo lugar las células que se conjugan deben de ser de tipo sexual opuesto; las células donantes deben portar el plásmido y las receptoras no. En las bacterias Gram negativas el plásmido contiene genes que codifican las síntesis de los pilis sexuales. Las bacterias Gram positivas producen moléculas de superficie cohesivas que determinan que las células se mantengan en contacto directo.

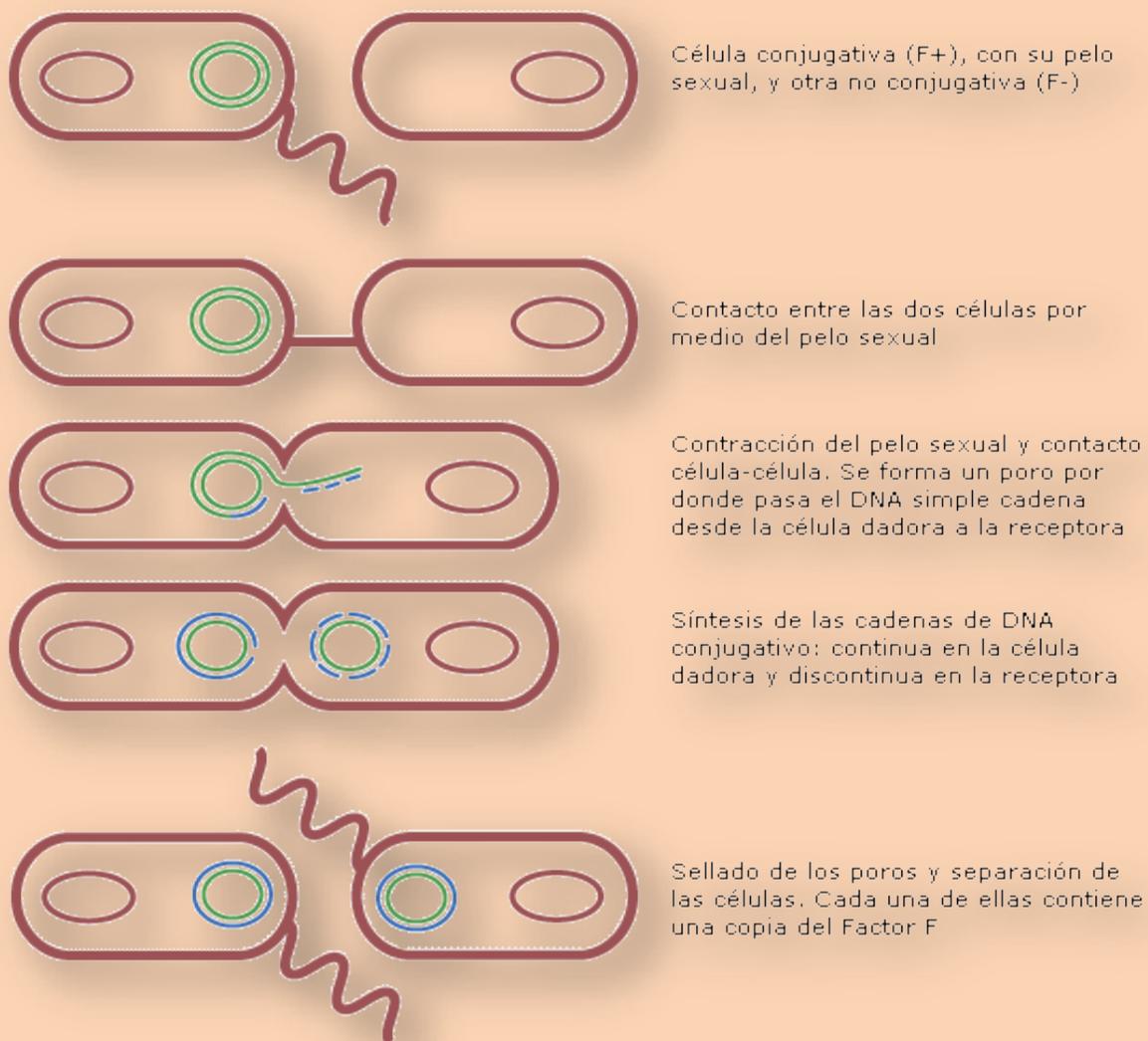
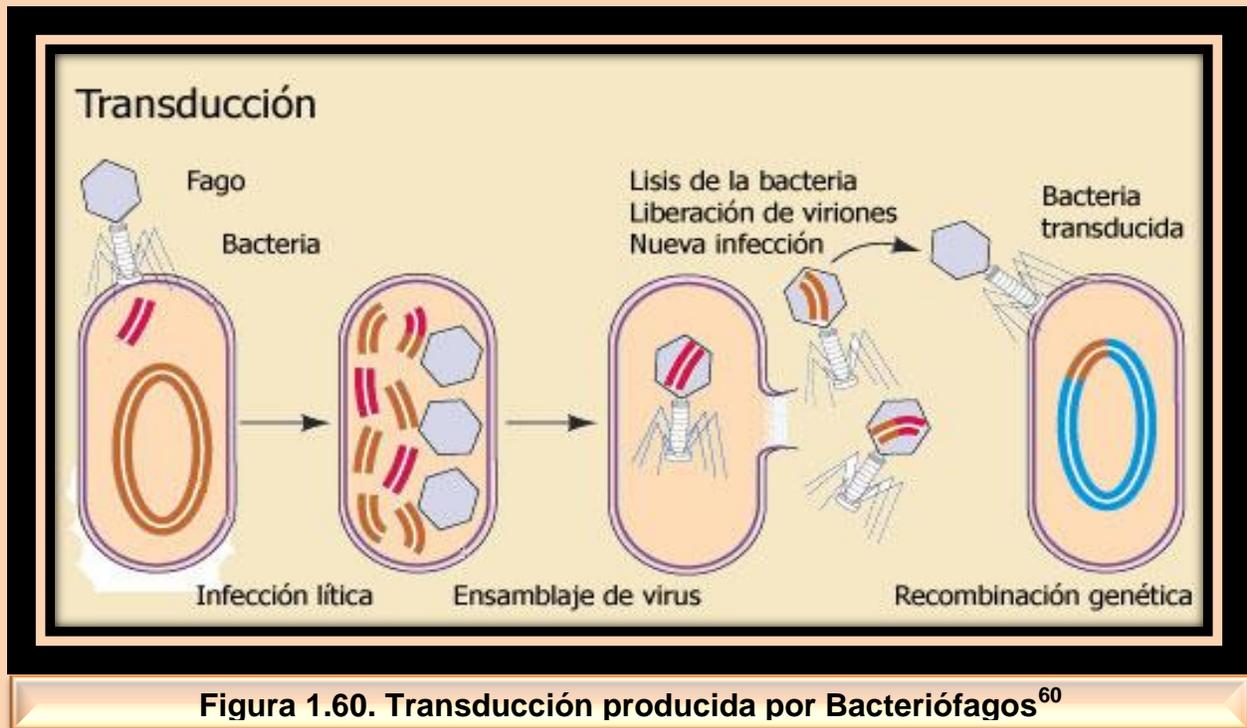


Figura 1.59. Conjugación Bacteriana⁵⁹

Transducción Bacteriana

Es un tercer mecanismo de transferencia genética entre las bacterias. En este proceso el ADN bacteriano se transfiere de una célula donante a una célula receptora dentro de un virus que infecta a las bacterias denominados Bacteriófagos o Fago. Todos los genes contenidos dentro de una bacteria infectada por un fago capaz de realizar una transducción generalizada tiene la misma probabilidad de ser empaquetados dentro de una cubierta de un fago para ser transferidos.



En la transducción especializada sólo se transfieren ciertos genes bacterianos en un tipo de transducción especializada de un fago que codifica ciertas toxinas producidas por sus huéspedes bacterianos como la toxina diftérica por

Corinebacterium diphtheriae, la toxina eritrogenica por *Streptococcus pyogenes* y la toxina de shiga por *E. Coli*.

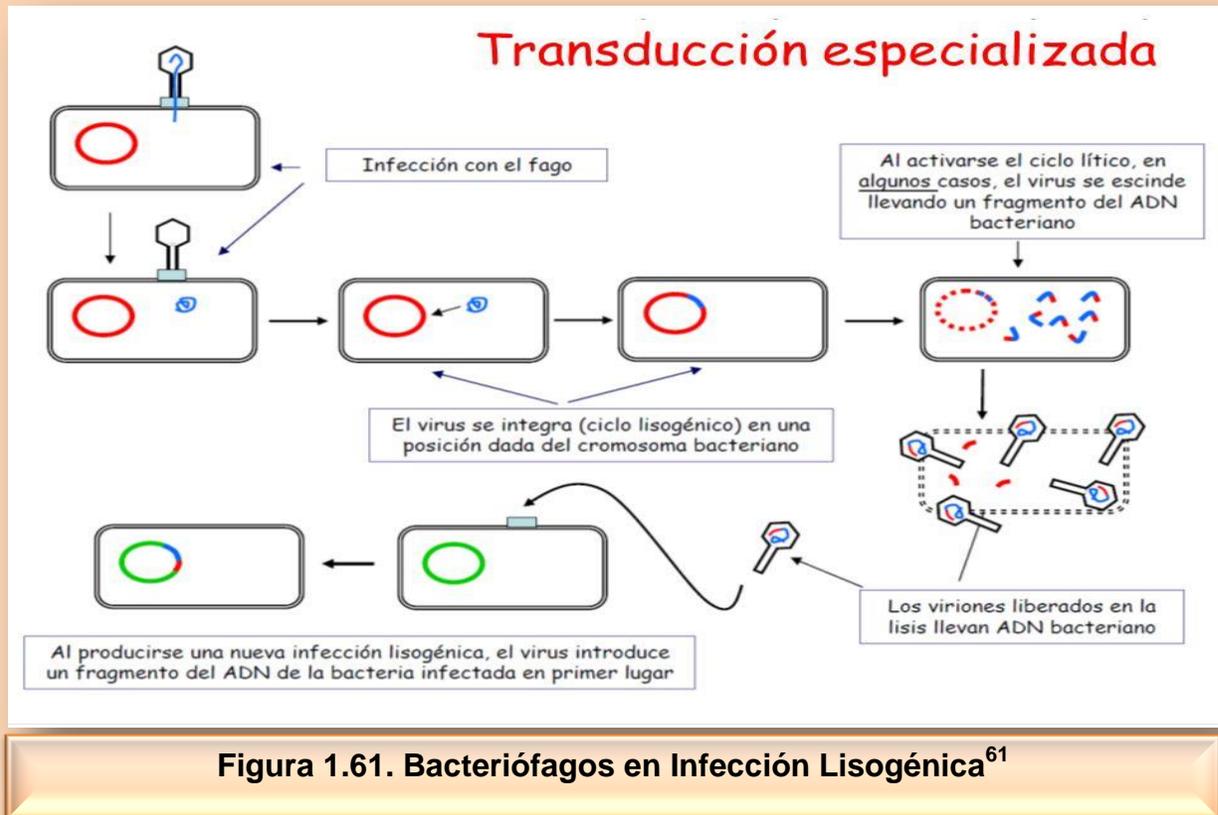


Figura 1.61. Bacteriófagos en Infección Lisogénica⁶¹

Plásmidos

Un factor F es un plásmido conjugativo que transporta los genes para los pili sexuales y para la transferencia de los plásmidos a otra célula. Los factores de resistencia R son plásmidos que poseen genes que confieren resistencia al huésped contra los antibióticos, los metales pesados o las toxinas celulares; Además este factor plantea problemas muy graves para el tratamiento de infecciones con antibióticos. Otros plásmidos codifican proteínas que aumentan la patogenicidad de una bacteria.³²

1.10. Antibióticos

La era de los antibióticos se inició en 1935, con el descubrimiento de las sulfonamidas. En 1940 se demostró que la penicilina descubierta en 1929 por Alexander Fleming, podía ser una sustancia terapéutica eficaz.

La investigación de agentes quimioterapéuticos se centró principalmente alrededor de las sustancias de origen microbiano denominados antibióticos.

El aislamiento, la concentración, la purificación y la producción masiva de penicilina fueron seguidas por el desarrollo de la estreptomina, las tetraciclinas, el Cloranfenicol y muchos otros agentes.



Figura 1.62. Antibióticos⁶²

Un antimicrobiano ideal debe mostrar baja toxicidad, el fármaco debe ser nocivo si se trata de atacar a un microorganismo sin dañar al huésped. La toxicidad selectiva casi siempre es relativa y no absoluta; esto significa que un fármaco en concentración tolerada por el huésped puede dañar un microorganismo infectante. La toxicidad puede ser función de algún receptor específico necesario para la adhesión del fármaco; pero a veces depende de la inhibición de eventos bioquímicos indispensables para el microorganismo, pero no para el huésped.

Los mecanismos de acción de la mayor parte de los antimicrobianos aún no se comprenden en su totalidad. Sin embargo estos mecanismos se pueden clasificar bajo 4 inhibiciones:

- 1) La inhibición de la síntesis de Ácidos nucleicos
- 2) Inhibición de las funciones de la membrana celular
- 3) Inhibición de la síntesis de proteínas (o sea inhibición de la traducción y de la transcripción del material genético)
- 4) Inhibición de la síntesis de la pared Celular

1.8.1 Los antibióticos se clasifican según su efecto antibacteriano.

Bacteriostático: Impiden el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas, por lo que su efecto es reversible, cuando se retira el antibiótico, la bacteria se multiplica de nuevo.

Bactericidas: Su acción es total produciendo lisis bacteriana, con efectos irreversibles, el prototipo del agente bactericida es actuar en la pared celular o de la membrana citoplasmática de la bacteria.

Cuadro 4. Clasificación de bactericidas y bacteriostáticos

BACTERICIDAS	BACTERIOSTÁTICOS
- Aminoglucósidos	- Cloranfenicol
- Bacitracina	- Clindamicina
- Carbapenemos	- Eritromicina
- Cefalosporinas	- Lincomicina
- Fosfomicina	- Nitrofurantoína
- Monobactámicos	- Sulfonamidas
- Penicilinas y demás betalactámicos	- Tetraciclinas
- Polimixina B y demás antibióticos polipeptídicos	- Trimetoprim
- Quinolonas	
- Rifampicina	
- Vancomicina	

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos y que poseen acción antibactericida y un **quimioterapéutico** son compuesto obtenidos por síntesis químicas y con características antibacterianas.

➤ **Por su espectro**

- I. **De amplio espectro:** Se consideran los antibióticos que son activos sobre un número amplio de especies bacterianas como: la tetraciclina (antibiótico)
- II. **De espectro Intermedio:** Presentan su acción sobre un número ilimitado de especies bacterianas por ejemplo los macrólidos (Antimicrobiano)
- III. **Espectro reducido:** Solamente son activos sobre un número reducido de especies bacterianas, por ejemplo los glucopeptidos.

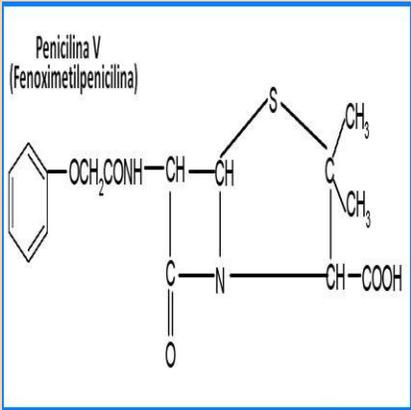
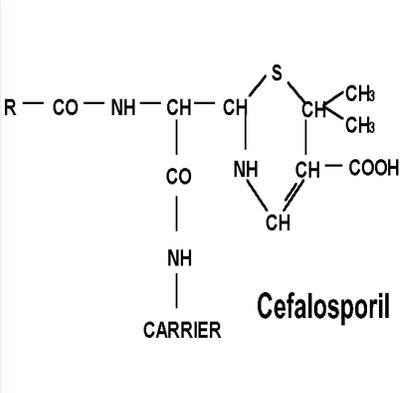
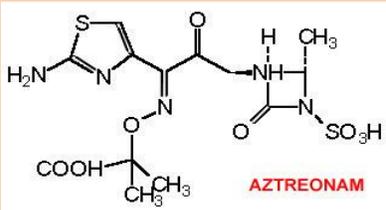
La combinación de antibióticos en los pacientes hospitalizados o ambulatorios reciben más de un agente antibacteriano de los cuales interactúan entre si y también con otros fármacos, como los diuréticos ya que las combinaciones de antibióticos pueden ser:

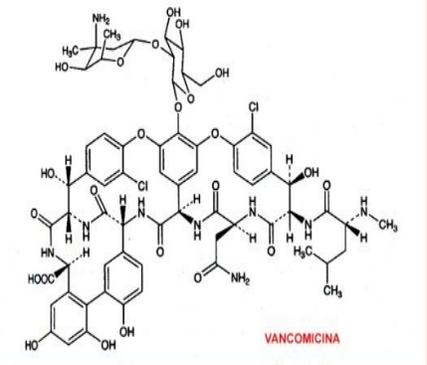
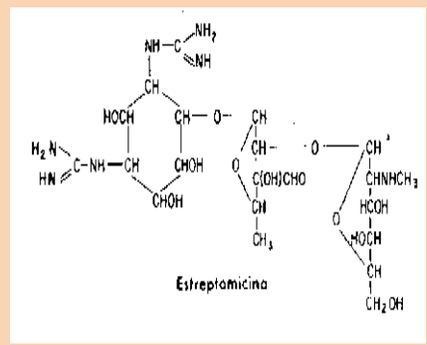
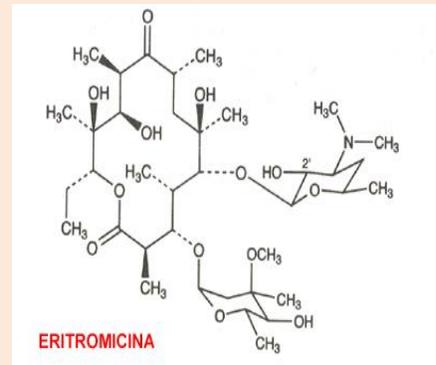
Cuadro 5. Efecto ante la combinación de antibióticos.	
Combinación de antibióticos	Efecto del antibiótico
Sinergismo	Se presenta cuando la actividad es mayor a la suma de las actividades individuales de cada antibiótico.
Antagónico	Se presenta si la actividad de un fármaco se ve reducida por la presencia de otro.
Aditivo	Se presenta si el efecto de ambos antibióticos combinados, es igual a la suma de los efectos individuales.

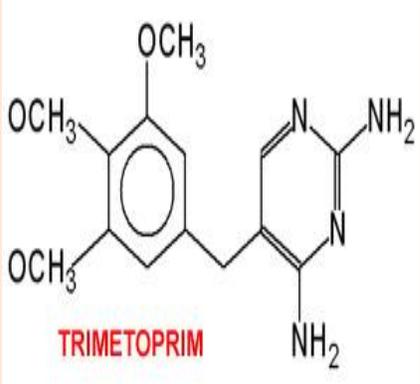
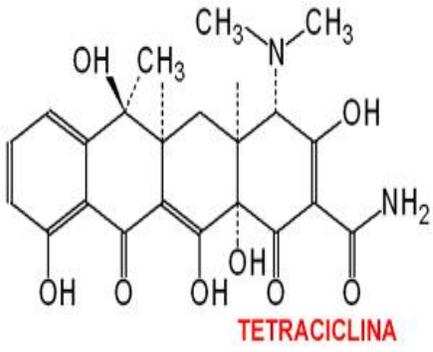
Es importante la clasificación de antibióticos debido a la acción que presentan en cada una de las estructuras del microorganismo principalmente en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de las funciones de la membrana celular, inhibición de la síntesis de proteínas y la inhibición de la síntesis de pared celular.

- En la Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: la acción antibacteriana se da principalmente por los grupos como las quinolonas, pirimentamina, rifampicina, sulfonamidas, trimetropim entre otros. Estos antibióticos y quimioterapéuticos se encargan de inhibir principalmente la síntesis del ADN microbiano al bloquear la ADN girasa.
- En la inhibición de las funciones de la membrana celular: la acción es la salida de compuestos a su exterior de compuestos intracelulares que son indispensables para la supervivencia del microorganismo. Entre los antibióticos se encuentran la anfotericina B, nistatina, polienos y polimixinas.
- En la inhibición de la síntesis de proteínas: Al no sintetizar las proteínas los microorganismos no crecen, ni se reproducen, ejemplos el cloranfenicol, las tetraciclinas, eritromicinas, aminoglucocidos.
- En la inhibición de la síntesis de Pared Celular Todos los fármacos β -lactámicos son inhibidores selectivos de la síntesis de pared celular bacteriana y por lo tanto son activos contra las bacterias en crecimiento. Esta inhibición solo es una de las diferentes actividades de los fármacos antimicrobianos.³³

Cuadro 6. Clasificación de antibióticos por grupo.³⁴

Grupo	Antibiótico	Estructura
<p>Penicilinas</p>	<p>Naturales: penicilina procaínica, penicilina benzatínica, penicilina V.</p> <p>Resistentes a penicilinasas: oxaciclina, meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina.</p> <p>Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/clavulánico.</p> <p>Espectro extendido: ticarcilina, piperacilina, mezlocilina, carbenicilina.</p>	 <p>Penicilina V (Fenoximetilpenicilina)</p>
<p>Cefalosporinas</p>	<p>1^a generación: cefalexina, cefadroxilo, cefradina, cefapirina, cefalotina.</p> <p>2^a generación: cefuroxima, cefaclor, cefonicida, cefoxitin, cefotetán.</p> <p>3^a generación: cefixima, ceftibutén, cefnidir, ceftriaxona, ceftizoxima, cefnidir, cefoperazona/sulbactam.</p> <p>4^a generación: cefepima, cefpiroma</p>	 <p>Cefalosporil</p>
<p>Monobactámicos</p>	<p>Aztreonam</p>	 <p>AZTREONAM</p>

<p>Glucopéptidos</p>	<p>Vancomicina, teicoplanina, daptomicina, ramoplanina</p>	 <p>VANCOMICINA</p>
<p>Aminoglucósidos</p>	<p>Amikacina, tobramicina, metilmicina, kanamicina, estreptomicina.</p>	 <p>Estreptomina</p>
<p>Macrólidos</p>	<p>Eritromicina, claritromicina, azitromicina, diritromicina, miocamicina, losamicina.</p>	 <p>ERITROMICINA</p>
<p>Quinolonas</p>	<p>1^a generación: ácido nalidíxico 2^a generación: ofloxacina, enoxacina, ciprofloxacina, pefloxacina. 3^a generación: levofloxacina, tosufloxacina.</p>	 <p>ÁCIDO NALIDÍXICO</p>

	4 ^a generación: moxifloxacina	
Diaminopirimidina + sulfonamidas	Trimetoprim/ Sulfametoxazol	 <p>The image shows the chemical structure of Trimetoprim. It consists of a 3,4,5-trimethoxyphenyl ring connected via a methylene group to a 2,4-diaminopyrimidin-5-yl ring. The name "TRIMETOPRIM" is written in red below the structure.</p>
Tetraciclinas	Doxiciclina, Minociclina, Tigeciclina.	 <p>The image shows the chemical structure of Tetracycline. It features a tetracyclic core with a dimethylamino group, a methyl group, and several hydroxyl groups. The name "TETRACICLINA" is written in red below the structure.</p>

A scanning electron micrograph (SEM) showing two types of bacteria. The larger, golden-yellow, spherical bacteria are Staphylococcus aureus, which are arranged in clusters. The smaller, blue, irregularly shaped bacteria are Staphylococcus epidermidis, which are also arranged in clusters. The background is dark, making the bacteria stand out.

Capítulo 2

Staphylococcus de importancia clínica

Capítulo 2

Staphylococcus de importancia Clínica

2.1 Características generales de los *Staphylococcus*

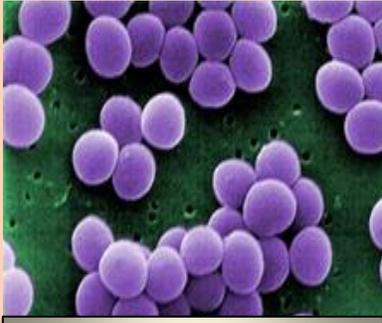


Figura 2.1 *Staphylococcus*
(MEB)⁶³

El género *Staphylococcus* se encuentran en diplococos o racimos de uva, llegan a medir 1 μm de diámetro, son inmóviles, no esporulados, Gram positivos, son metabólicamente activos, fermentan carbohidratos y producen pigmentaciones que varía desde el color blanco hasta el amarillo intenso el último por la fermentación del manitol que es un componente que contiene el medio de cultivo. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y mucosas en los humanos; otros causan patología como formación de abscesos, impétigo, furúnculos, toxina exfoliativa, infecciones piógenas, septicemia mortal entre otros. El tipo de envenenamiento alimentario más común es causado por una enterotoxina termoestable de los *Staphylococcus*. Estos microorganismos llegan a desarrollar con rapidez resistencia a muchos antimicrobianos y presentan problemas terapéuticos difíciles de tratar. El género *Staphylococcus* contiene al menos 30 especies, pero los tres de importancia clínica son: *Staphylococcus aureus* que es coagulasa positivo lo que los difiere de las otras especies y su gravedad varía desde intoxicación alimentaria a infecciones cutáneas. *Staphylococcus epidermidis* son coagulasa negativo, son normales en la piel, aunque suelen causar infecciones casi siempre vinculados con dispositivos y

catéteres implantados en el corazón. Por otra parte *Staphylococcus saprophyticus* es una causa de infecciones del aparato urinario en mujeres.³⁵

En cultivo de los *Staphylococcus* crecen con facilidad sobre casi todos los medios bacteriológicos en condiciones aerobias microaerofílicas crecen con mayor rapidez a 37 °C y en medios sólidos las colonias son redondas, lisas, convexas y brillantes. El *Staphylococcus aureus* forma colonias de color amarillo o dorado intenso, son β - hemolíticos en agar sangre y son coagulasa positivo, *Staphylococcus epidermidis* sus colonias son de color gris o blanco, en agar sangre son α -Hemolíticos y son coagulasa negativo. El *Staphylococcus saprophyticus* sus colonias por lo general son de color grisáceo, en agar sangre son no hemolíticos y son coagulasa negativo.

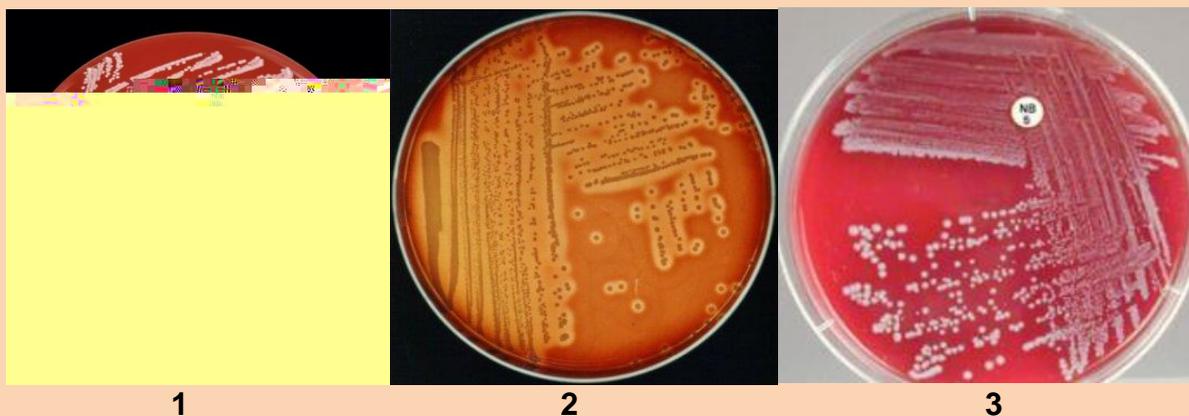


Figura 2.2. Agar sangre de carnero al 5%. 1- Colonias de *S. epidermidis* α - Hemolisis, 2-Colonias de *S. aureus* β - Hemolisis, 3- Colonias de *S. Saprophyticus*. α -Hemolisis⁶⁴

Los *Staphylococcus* son relativamente resistentes a la desecación por calor pero se inhiben con facilidad a ciertas sustancias como por ejemplo el hexaclorofeno al 3%.

2.2 Estructura antigénica

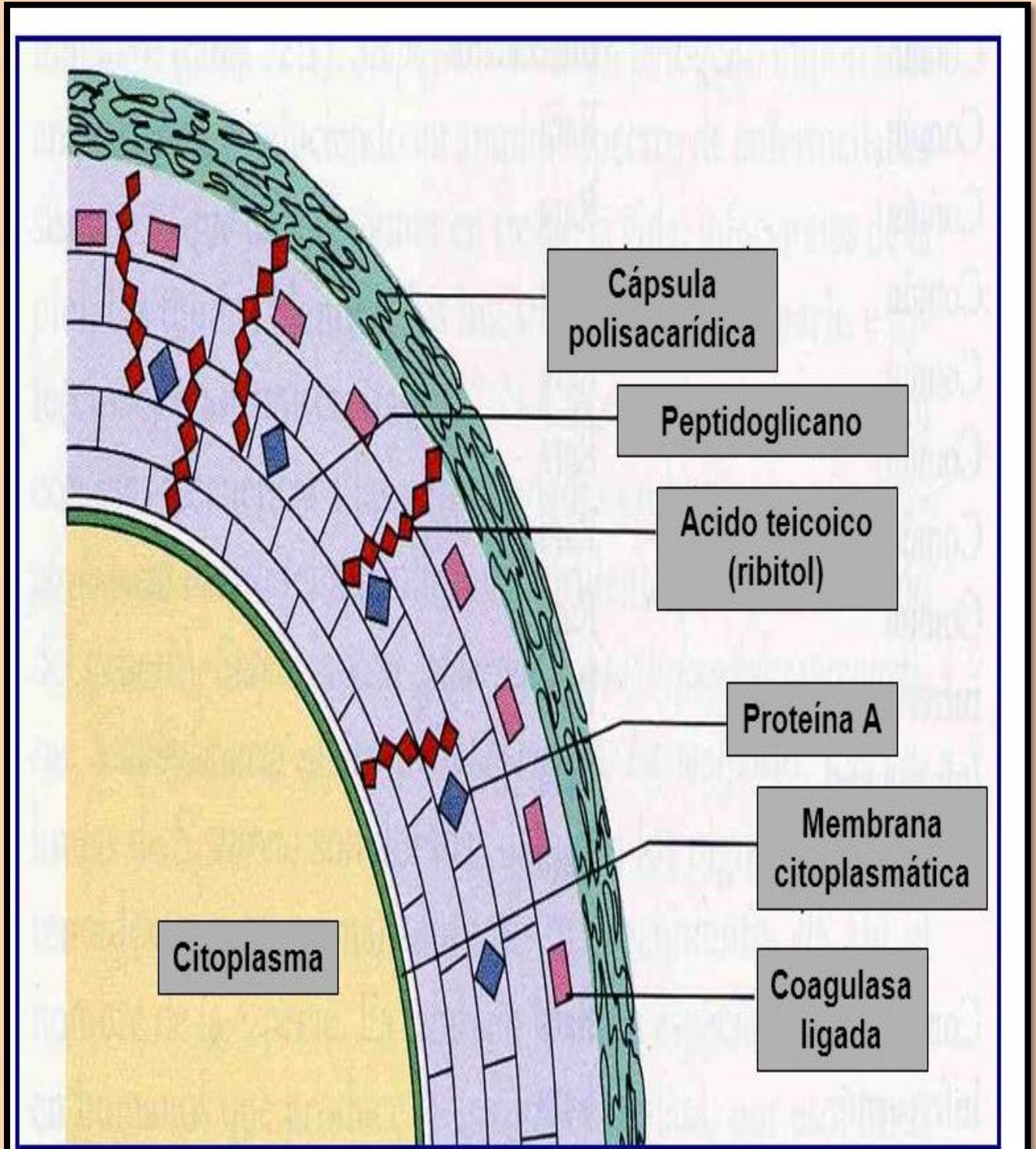


Figura 2.3. Estructura antigénica de *Staphylococcus*⁶⁵

La proteína A es un componente de la pared celular que se une a la porción Fc de las moléculas de IgG excepto IgG3, la porción Fab e IgG unida a la proteína A es libre de combinarse con un antígeno específico. La proteína A se ha convertido en un reactivo importante en la tecnología del laboratorio de inmunología; por ejemplo la proteína A unida a las moléculas de IgG dirigida contra antígenos bacterianos específicos forma una conglutinación.³⁶

FACTORES DE PATOGENICIDAD: ESTRUCTURA CELULAR

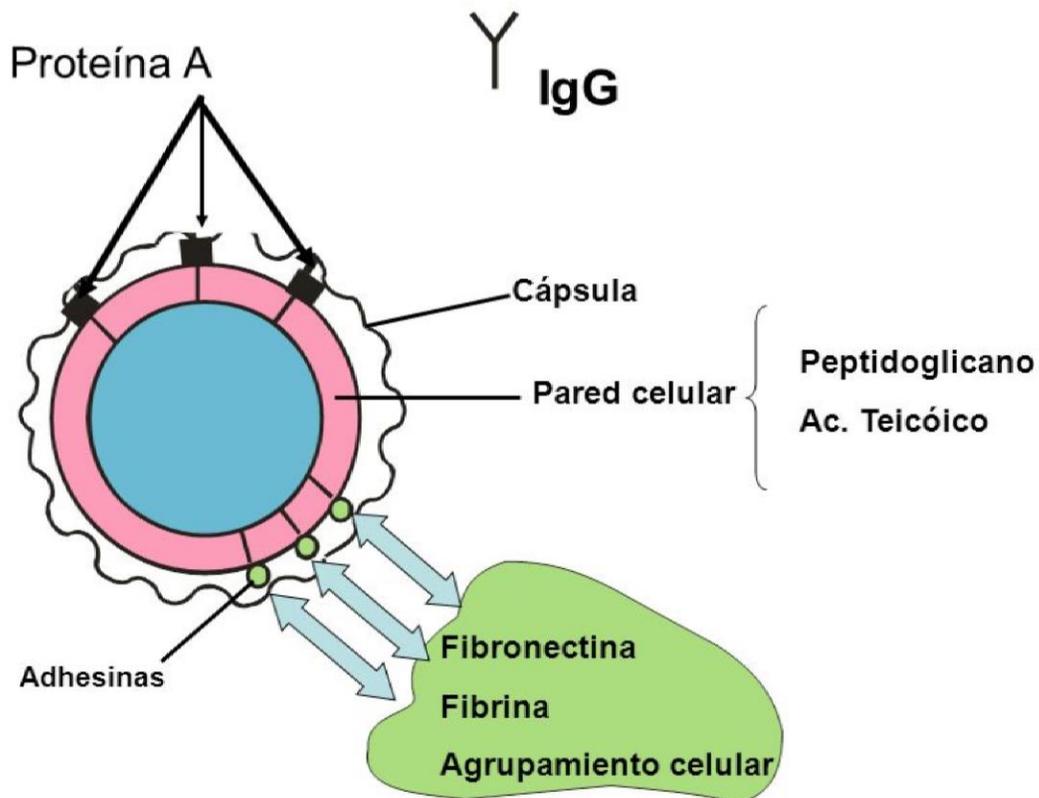


Figura 2.4. Mecanismo de acción de la proteína A⁶⁶

2.3 Factores de Patogenicidad y manifestación clínica.

Los *Staphylococcus* pueden producir enfermedades por su capacidad de multiplicarse y propagarse de modo extenso en los tejidos mediante la producción de muchas sustancias extracelulares. Algunas de estas sustancias son enzimas; otras se consideran toxinas extracelulares, muchas de las toxinas están bajo control genético de plásmidos.



Figura 2.5. Lesiones en la piel causada por *Staphylococcus aureus*⁶⁷

2.3.1 Enzimas y Toxinas

Enzimas

✓ Catalasa:

Esta enzima que poseen los *Staphylococcus* descomponen el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.

✓ Coagulasa:

Esta enzima puede impedir la progresión de leucocitos en el área infectada por producir coágulos en los capilares. La especie que produce esta enzima es el *Staphylococcus aureus*.



Figura 2.6. Impétigo causada por *Staphylococcus aureus*⁶⁸

✓ **Lipasas**

Actúa sobre diferentes sustratos (aceites, grasas, ceras, etc.) que permite colonizar áreas de la piel con altas concentraciones de dichos sustratos.

✓ **Estafiloquinasa**

Es una fibrinolisisina que activa el plasminógeno, los transforma en plasmina y este actúa sobre la fibrina.



Figura 2.7 Formación de absceso en piel⁶⁹

✓ **Hialuronidasas:**

Degrada el ácido hialurónico, un componente del tejido que ayuda a sostener a las células juntas del huésped.

✓ **Nucleasas**

Tienen propiedades endonucleolíticas y exonucleolíticas que pueden actuar sobre el ADN y el ARN.

✓ **Gelatinasa**

Esta enzima es segregada como gelatinasa exocelular para degradar las proteínas.

✓ **Penicilinasas**

Es una enzima que posee el género *Staphylococcus* su función es desdoblar el anillo β - lactámico de la penicilina (penicilina β - lactamasa-1) por lo cual la penicilina pierde su efectividad.

➤ **Toxinas**

➤ **Exotoxina**

Son toxinas letales producidas por *Staphylococcus* causan necrosis en la piel y contienen hemolisinas. La toxina α (hemolisina) es una proteína heterogénea que puede causar lisis en los eritrocitos y dañar a las plaquetas, esta toxina muestra acción sobre el músculo. La toxina β - desdobla la esfingomielina y es tóxica para muchos tipos de células incluso los eritrocitos humanos, las toxinas γ es antigénicamente distinta no muestra interrelación con las lisinas del *Streptococcus*.

➤ **Leucocidina**

Es la toxina de *S aureus* puede matar los leucocitos expuestos de muchos animales. Su función en la patogenia es incierta puesto que los *Staphylococcus* no pueden matar a los leucocitos y a veces son fagocitados de manera tan eficiente.

➤ **Toxina Exfoliativa**

La toxina exfoliativa liberada principalmente por *Staphylococcus aureus* en el sitio de infección, se absorbe y se transporta al torrente sanguíneo circulatorio a grandes áreas de la piel. Esta toxina causa la separación en la capa celular de la epidermis justo por debajo de la capa externa queratinizada muerta. Debido a que las capas externas de piel se pierden hay una pérdida de líquido corporal y puede ser un peligro de infección secundaria que puede ser causada por las bacterias Gram negativas oportunistas como especies de *Pseudomonas*.

➤ **Toxina del síndrome del Shock Tóxico. (TSST)**

Los *Staphylococcus aureus* producen toxinas denominadas toxina-1 del síndrome de choque tóxico al igual que la enterotoxina F y la exotoxina C pirógena es el prototipo del superantígeno. En los humanos la toxina se vincula con la fiebre, choque tóxico y afección de múltiples sistemas incluyendo erupción descamativa de la piel.



Figura 2.8. Síndrome de piel escaldada. Causada por *Staphylococcus aureus*⁷⁰

➤ **Enterotoxina**

Casi el 50 % de las cepas de *S. aureus* producen al menos 6 toxinas solubles (A-F) igual que la TSST-1 las enterotoxinas son superantígenos que se unen a moléculas del complejo de MHC de clase II y producen la estimulación de las células T. Las enterotoxinas son termoestables (resistentes a la ebullición durante 30 min) y resisten a la acción de las enzimas del intestino.³⁷

Las enterotoxinas causan intoxicación alimentaria y se produce cuando la bacteria de *S. aureus* crece en productos alimenticios a base de carbohidratos y proteínas. La ingestión de tan solo 25 µg



Figura 2.9. TSST. En piel. Causado por *S. aureus*⁷¹

de enterotoxina B puede provocar en el humano vómito y diarrea. El efecto de la enterotoxina tal vez se debe a la estimulación del sistema nervioso central (centro de vomito) luego que la toxina actúa sobre los receptores nerviosos en el intestino.

Epidemiología

Los *Staphylococcus* se encuentran propagados principalmente en sangre

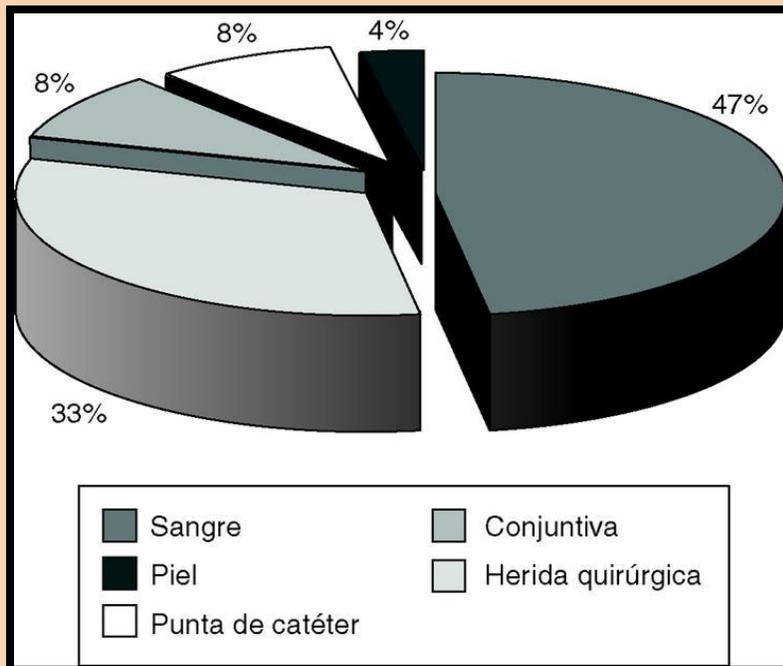


Figura 2.10 Infecciones causadas por el género *Staphylococcus*⁷²

causando bacteriemia en un organismo, aunque también pueden estar como oportunistas en piel, conjuntiva, catéteres de corazón y en heridas quirúrgicas. Por lo general *Staphylococcus aureus* puede aparecer en cualquier grupo de edad

pero es más frecuente en niños recién nacidos, ancianos e individuos inmunocomprometidos. La transmisión es por lo general de persona a persona o por fómites. Por ejemplo el síndrome de piel escaldada causada por *Staphylococcus* ocurre por lo general en pequeñas epidemias como las guarderías.

Diagnóstico

Se puede encontrar este género de *Staphylococcus* en muestras como pus, esputo, cultivo nasal y cultivo faríngeo, material aspirado de la tráquea, o líquido cefalorraquídeo. Además de cultivos vaginal y uretral para el caso de *S. Saprophyticus* su determinación de anticuerpos en suero contra esta bacteria carece de valor.



Tratamiento:

Son sensibles a la novovicina y es resistente a la penicilina dejando a los antibióticos más eficaces para combatirlo como los del grupo aminoglucósidos. tetraciclinas, cefalosporina, oxacilina, eritromicina entre otros. En recién nacidos se utiliza el antiséptico de hexaclorofeno para evitar la colonización de *Staphylococcus*, pero cabe mencionar que el antiséptico no se debe aplicar por tiempo prolongado debido a su toxicidad.³⁸



Capítulo 3,

Familia Streptococcaceae

CAPITULO 3

3.1 Características Generales de los *Streptococcus*

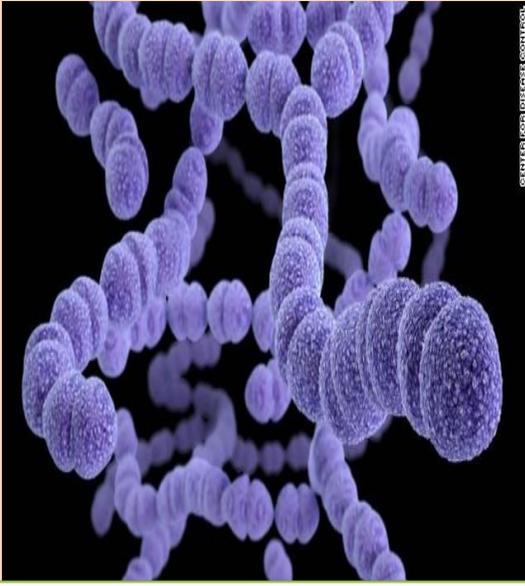


Figura 3.1 *Streptococcus*. (MEB)⁷⁴

El género *Streptococcus* son bacterias Gram positivas esféricas que por lo general forman cadenas largas en cultivos líquidos durante su crecimiento y cadenas cortas en cultivos sólidos. Se distribuye ampliamente en la naturaleza y Algunos son miembros de la flora normal humana; otros en su minoría se vinculan en producir infecciones en humanos y animales.

Los *Streptococcus* se distinguen por presentar en ellos diferentes hemolisis en los medios de cultivo sólidos como en el agar sangre (Hemólisis α , Hemólisis β , Hemólisis- α o no presentan hemólisis). La mayoría de los *Streptococcus* está clasificada por el grupo de Lancefield, otros pertenecen al grupo Viridians y otros a los *neumococos*.

En su morfología e identificación los cocos son individuales, esféricos u ovoides y se disponen en cadenas largas, se dividen según su plano perpendicular al eje de lo largo de la cadena. La longitud de las cadenas varía ampliamente y está condicionada por factores ambientales. Los *Streptococcus* son Gram positivos, sin embargo cuando la cepa envejece (añejamiento de cepa) y las bacterias mueren pierden su Gram positividad y se tornan con aspecto de Gram negativos.^{39,40}

3.2 Clasificación de lancefield



Figura 3.2 Rebecca Craighill Lancefield. (1895-1981)⁷⁵

Rebecca Craighill Lancefield. Bacterióloga de profesión se casó con el genetista Donald Lancefield de quien tomó su apellido. Rebecca realizó la clasificación serológica de los *Streptococcus* hemolíticos utilizando un polisacárido o sustancia C que se encuentra presente en la pared celular de los *Streptococcus* ya que

Logró analizar su carácter antigénico de la membrana y su especificidad de cada especie para establecer distintos serogrupos, además mediante el análisis de algunas proteínas de la pared celular identificó los serotipos M, T y R de estos el más importante es el antígeno M por ser factor importante en la virulencia. Lancefield para llevar a cabo su clasificación serológica ordenó a los *Streptococcus* por grupos utilizando letras mayúsculas (A, B, C, D, F, H, y K). Cabe mencionar que existen otras especies de *Streptococcus* de importancia clínica que NO pertenecen al grupo serológico de Lancefield como es el caso del grupo *viridians* y *los neumococos*.

Cuadro9. Streptococcus del grupo Lancefield, grupo Viridians y neumococos causantes de enfermedades comunes en el hombre ^{42, 43}

Grupo de Lancefield	Género y Especie	Habitad en el humano	Hemólisis en Agar Sangre.	Enfermedades comunes en el humano.
A	<i>S. pyogenes</i>	Faringe y piel	β	Faringitis. Impétigo, Fiebre Glomerulonefritis. Erisipela, Celulitis en heridas, Septicemia, endocarditis
B	<i>S. agalactiae</i>	Aparato genital femenino, faringe	β	Septicemia, Sepsis puerperal, Endocarditis Y Meningitis neonatal
C	<i>S. dysgalactiae</i>	Faringe, vagina y piel	β α	Celulitis, Endocarditis e Infecciones en heridas
D	<i>Enterococcus</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. faecium</i>	Intestino grueso	Hemólisis α β , γ	Infección del Tracto Urinario, Peritonitis, Absceso pelviano Infecciones en heridas y Endocarditis
F	<i>S. anginosus</i>	Faringe, colon y aparato genital femenino	β	Sinusitis, Meningitis, Absceso cerebral, Neumonía y Caries dental

H	<i>S. sanguins</i>	Faringe, boca y dientes	α	Caries Dentales, Endocarditis, Abscesos cerebrales, Septicemia
K	<i>S. salivarius</i>	Faringe, boca tráquea y pulmones	α	Meningitis, Endocarditis, Bacteremia y Sinusitis
Neumococo	<i>S. pneumoniae</i>	Faringe, boca tráquea y pulmones	α	Neumonía lobar, Meningitis, Otitis, Endocarditis, Bacteremia
Grupo Viridians	<i>S. mutans</i>	Dientes, boca y faringe	α, β	Caries dental, Endocarditis, Meningitis y Bacteremia

Micrografía de Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) de los principales *Streptococcus* del grupo de Lancefield, Grupo *Viridians* y *Neumococos*.^{43,44}

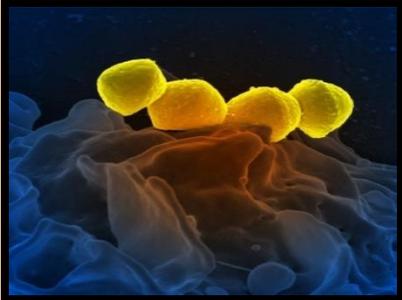


Figura 3.3 Grupo A de Lancefield, *S. pyogenes* (MEB)⁷⁶

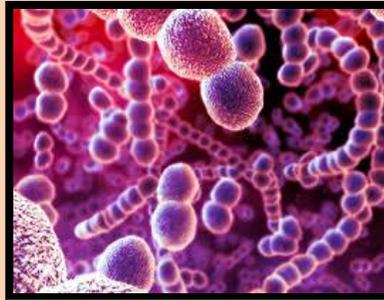


Figura 3.4 Grupo B de Lancefield, *S. agalactiae* (MEB)⁷⁷



Figura 3.5 Grupo C de Lancefield, *S. dysgalactiae* (MEB)⁷⁸



Figura 3.6 Grupo D de Lancefield, *Enterococcus* (MEB)⁷⁹

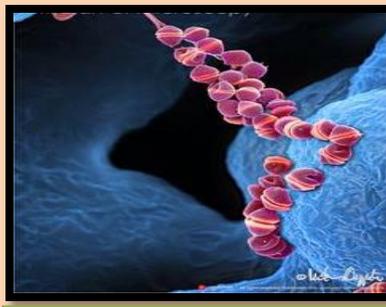


Figura 3.7 Grupo F de Lancefield, *S. anginosus* (MEB)⁸⁰

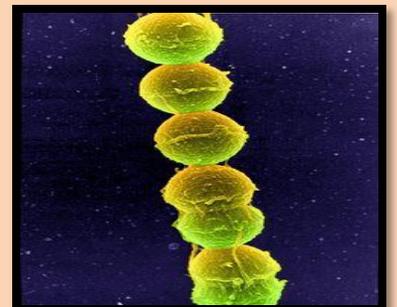


Figura 3.8 Grupo H de Lancefield *S. sanguinis*. (MEB)⁸¹



Figura 3.9. *S. pneumoniae* (neumococo) (MEB)⁸²



Figura 3.10 *S. mutans* del grupo *viridians* (MEB)⁸³

- Cultivo

La mayor parte de los *Streptococcus* crece en medio sólidos, en su superficie presentan colonias discoidales, miden de 1-2 mm de diámetro. La cepa que produce material capsular con frecuencia da lugar a colonias mucoides esto debido a la virulencia que presentan las bacterias como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*. Las características de crecimiento de las colonias, se



Figura 3.11. Colonias mucoides de *Streptococcus* β -hemolítico en la superficie de Agar sangre⁸⁴

obtienen principalmente por aprovechamiento de azúcares que fermentan, el crecimiento de los *Streptococcus* tiende a ser escasos sobre medio sólido o en caldo a menos que sea enriquecido con sangre o líquidos.

Los requerimientos nutritivos varían ampliamente entre las diferentes especies, los patógenos humanos son más exigentes y requieren una variedad de factores de crecimiento. El crecimiento y la hemólisis se favorecen con incubación en 10% de CO₂.

La mayor parte de los *Streptococcus* hemolíticos patógenos crecen mejor a 37 °C, los *Enterococcus* del grupo D crecen mejor de 15 a 45 °C. Los *Enterococcus* también crecen en concentraciones de cloruro de sodio (6.5%), en 0.1% de azul de metileno y en bilis agar esculina.^{45, 46,47}

3.3 Estructura antigénica

Los *Streptococcus* hemolíticos pueden dividirse en grupos serológicos y ciertos grupos se subdividen en:

Antígeno de la pared celular. Este carbohidrato se encuentra en la pared celular de muchos estreptococos. La especificidad serológica de los carbohidratos específicos de grupo se determina mediante un aminoazúcar para los *Streptococcus* del grupo A, este aminoazúcar es la ramnosa-N-acetilglucosamina; para el grupo B el polisacárido es la ramnosa-N-acetilglucosamina; para el grupo C, la ramnosa -N-acetilgalactosamina, para el grupo D el ácido glicérol teítoico, que contiene D-alanina y glucosa; para el grupo F la glucopiranosil-N-acetilgalactosamina; la capsula es la que le proporciona resistencia contra fagocitos además de estar compuesta de ácido hialurónico.

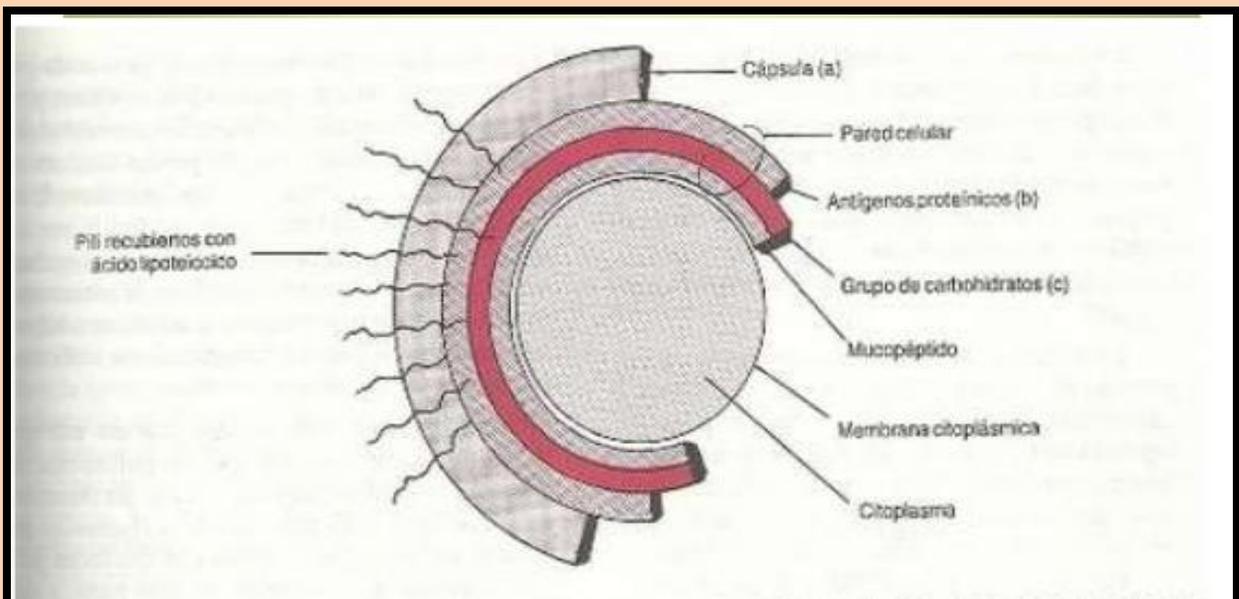


Figura 3.12 Estructura antigénica de la célula de *Streptococica* del grupo A, a) Capsula de ácido hialurónico, b) Antígenos M, T y R de pared celular y c) el carbohidrato específico es ramnosa-N acetil glucosamina⁸⁵

La proteína M Esta sustancia es un factor importante de virulencia para el *Streptococcus pyogenes* del grupo A, esta proteína tiene la apariencia de prolongaciones en la pared celular del *Streptococcus*. Cuando la proteína M se encuentra presente en los *Streptococcus* son virulentos y en ausencia de anticuerpos específicos tipo M pueden resistir la fagocitosis efectuada por leucocitos polimorfonucleares.

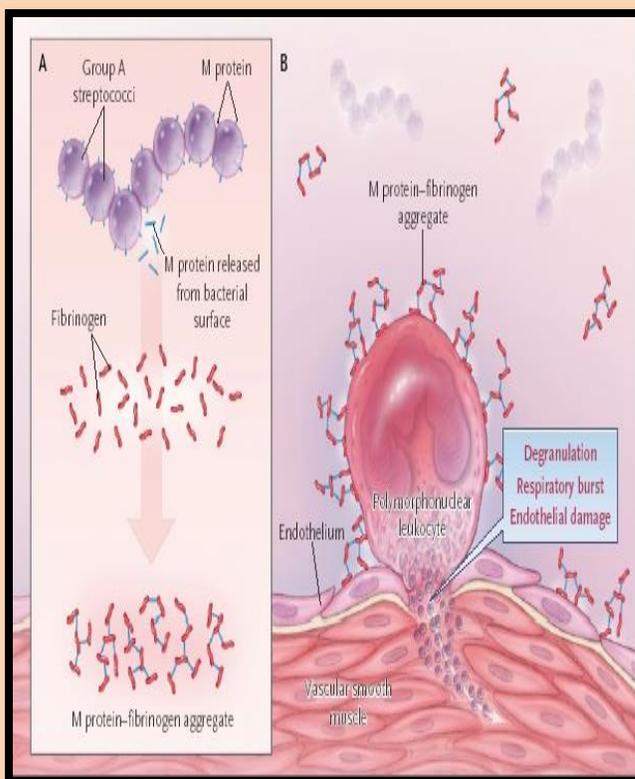


Figura 3.13 Mecanismo de acción de la proteína M de *Streptococcus* del grupo A⁸⁶

Se ha estudiado la estructura y funciones de la proteína M la molécula tiene forma de bobina enrollada que separa los dominios funcionales de la bacteria. Esta estructura permite gran número de cambios en las secuencias en tanto mantiene la función, por lo tanto los inmunodeterminantes de la proteína M pueden cambiar con facilidad.

Al parecer la proteína M y quizá otros antígenos de la pared celular de los *Streptococcus* desempeñan una función principal en la patogenia de la fiebre reumática.

La sustancia T

Este antígeno no tiene interrelación con la virulencia de *Streptococcus*. A diferencia de la proteína M, la sustancia T es ácido-lábil y termolábil. Se obtiene de los *Streptococcus* mediante la gestión proteolítica que se puede destruir con rapidez para separar la sustancia T de la sustancia M. La sustancia T se puede destruir de los *Streptococcus* por calor o utilizando una extracción ácida esto para poder aislar la sustancia T de la proteína M.

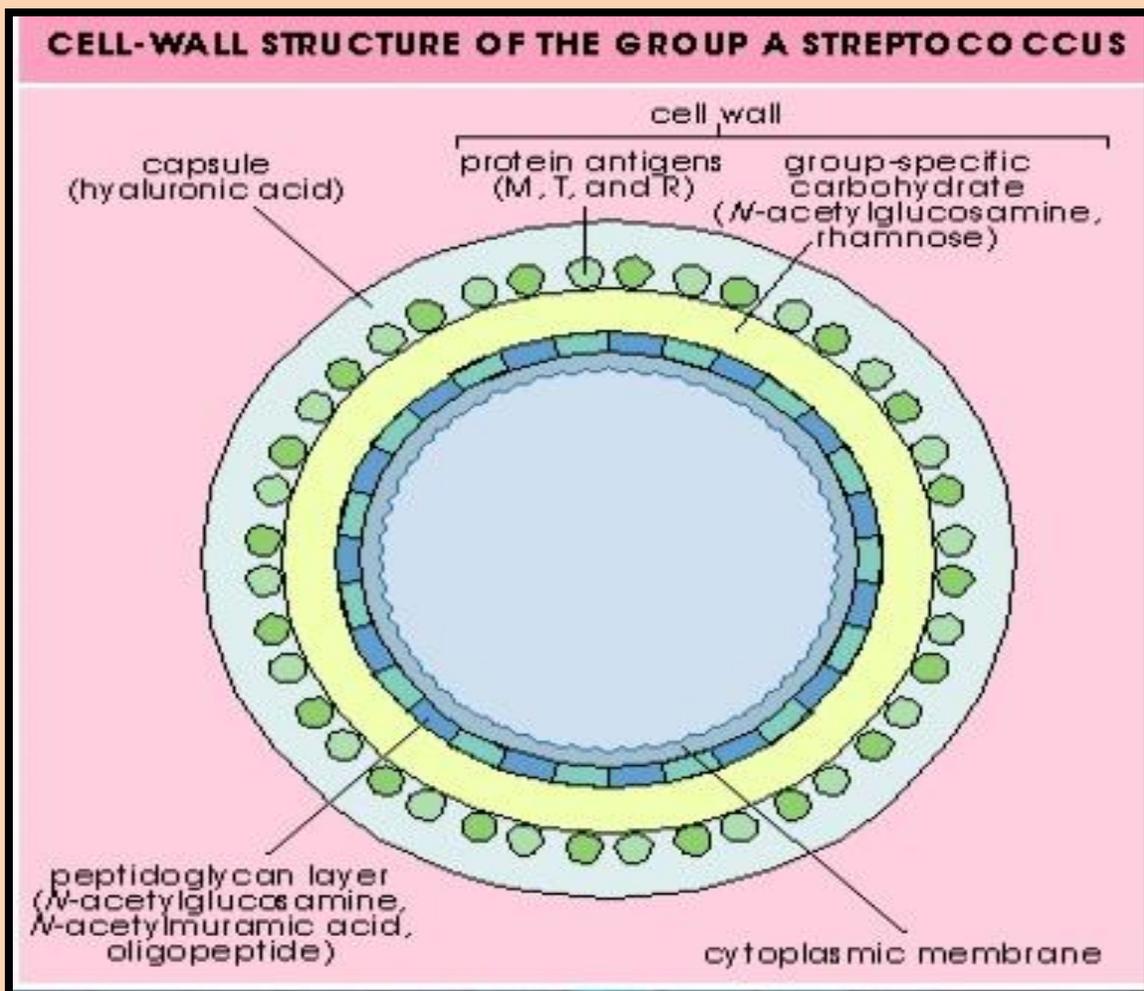


Figura 3.14 Antígenos proteicos (sustancias M, T Y R) en la superficie de *Streptococcus* del grupo A⁸⁷

3.4. Factores de Virulencia y manifestación clínica

3.4.1. Toxinas Y Enzimas

Los *Streptococcus* elaboran enzimas y toxinas como productos extracelulares antigénicos, las cuales se presentan de la siguiente manera:

➤ **Estreptocinasa (Fibrinolisisina)**

Muchas cepas de *Streptococcus* β -Hemolítico del grupo A producen estreptocinasa, esta sustancia transforma el plasminógeno del plasma humano en plasmina, una enzima proteolítica activa que digiere la fibrina y otras proteínas. Este proceso de digestión puede interferirse mediante inhibidores inespecíficos del suero y con un anticuerpo específico la antiestreptocinasa.

➤ **Streptodornasa (Desoxirribonucleasa estreptocócica)**

Esta enzima despolimeriza el ADN y su actividad enzimática se puede cuantificar por la disminución de la viscosidad de las soluciones de ADN con viscosidad conocida. Los exudados purulentos se deben a su viscosidad principalmente por la desoxirribonucleoproteína.

➤ **Hialuronidasa**

La hialuronidasa desdobla el ácido hialurónico, un componente importante del tejido conectivo. Por lo tanto la hialuronidasa ayuda a la propagación de los microorganismos infectantes (factor de propagación). Las hialuronidasas son antigénicas y específicas de cada bacteria o fuente tisular. Después de la infección con microorganismos productores de la hialuronidasas aparecerán anticuerpos específicos que tratarán de atacar a la bacteria dentro del tejido.

➤ **Difosfopiridina nucleotidasa**

Algunos *Streptococcus* elaboran esta enzima en el ambiente. Esta sustancia puede vincularse con la capacidad de los organismos para matar a los leucocitos, ciertas cepas producen proteinasa, y amilasa

➤ **Exotoxina Pirógena (Toxina Eritrogenica)**

Esta es la toxina responsable del cuadro clínico de escarlatina, se produce en cepas de *Streptococcus Pyogenes* que se encuentran parasitadas por un bacteriófago en estado lisogénico; además es un potente pirógeno que actúa en el hipotálamo Su naturaleza proteica le confiere gran inmunogenicidad, lo que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes de la propia toxina.

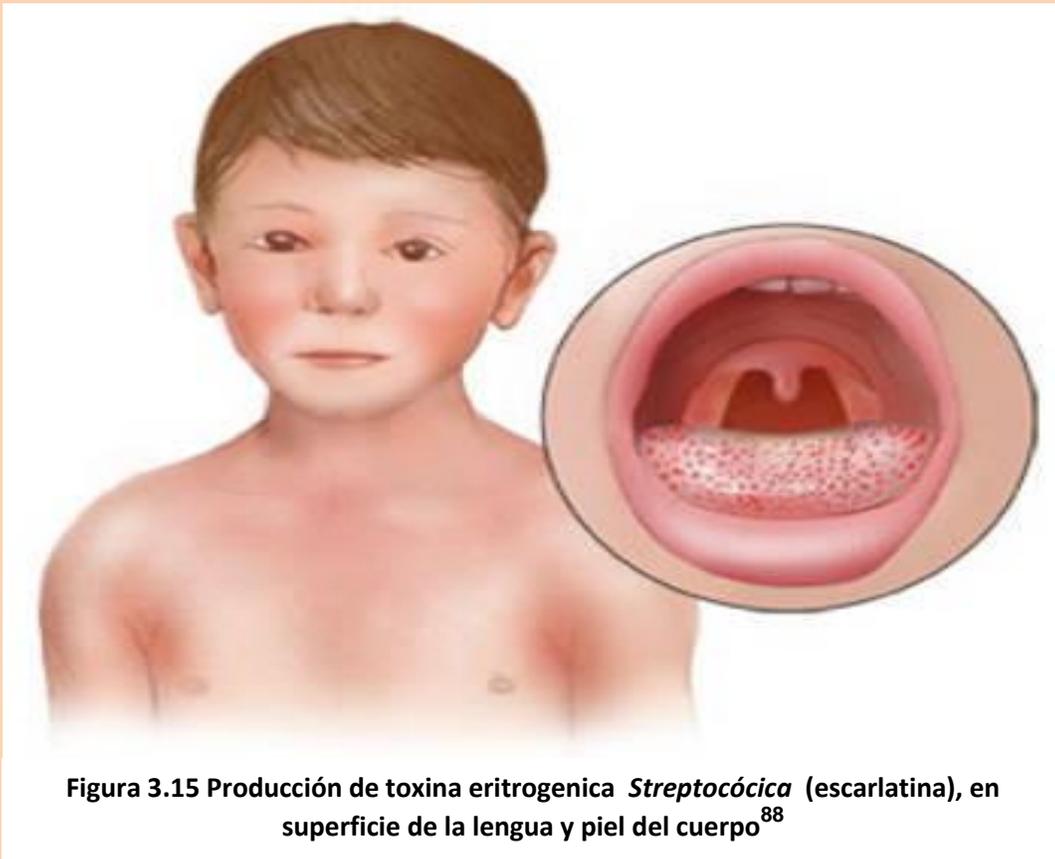


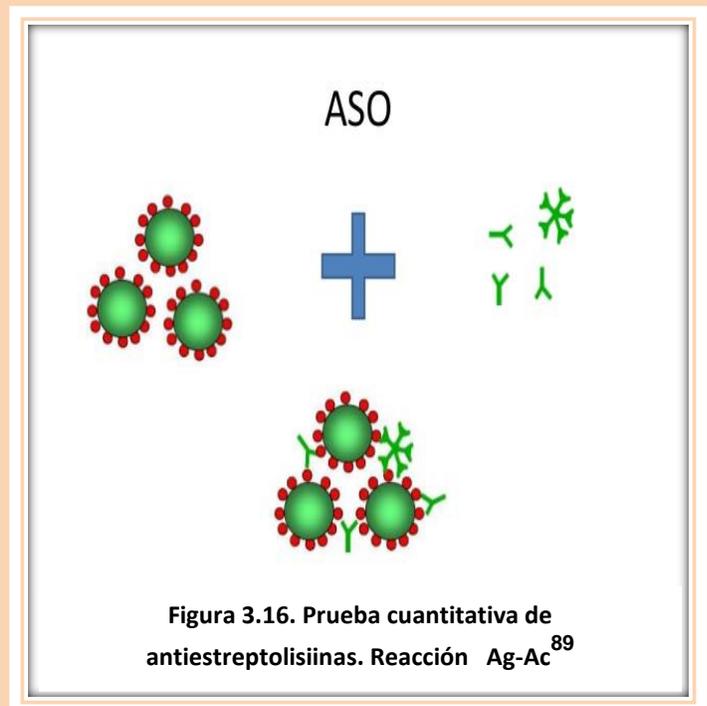
Figura 3.15 Producción de toxina eritrogenica *Streptocócica* (escarlatina), en superficie de la lengua y piel del cuerpo⁸⁸

➤ Hemolisinas

Muchos de los *estreptococos* pueden causar hemólisis diferentes tipos de hemólisis en los eritrocitos de carnero y cuando hay destrucción completa de estos eritrocitos con liberación de hemoglobina se denomina β - hemólisis. Los *estreptococos* que son β - Hemolíticos como *Streptococcus pyogenes* elabora 2 tipos de Hemolisinas que se denominan estreptolisina O y estreptolisina S.

Estreptolisina O

Es una exoenzima inmunogénica tóxica que se inactiva en presencia de O_2 , es producida por *Streptococcus* β -hemolítico que pertenece al grupo A. La bacteria al producir esta exoenzima es capaz de destruir a los eritrocitos del torrente sanguíneo humano y a consecuencia de ello el sistema inmune reacciona produciendo anticuerpos específicos antiestreptolisina O. Al determinar un valor elevado de la prueba de antiestreptolisinas (ASO) indica la presencia de una infección reciente por *streptococcus* β -hemolítico. La prueba de ASO sirve para determinar en la mayoría de los casos un diagnóstico de fiebre reumática aguda, glomerulonefritis, endocarditis bacteriana y escarlatina



Estreptolisina S

Es el agente causante de las zonas hemolíticas alrededor de las colonias de *estreptococos* que crecen sobre la superficie de placas de agar sangre, se elaboran en presencia de suero de allí el nombre de estreptolisina S, no es antigénica, pero puede detenerse mediante un inhibidor específico casi siempre está presente en el suero de los humanos y animales. Su efecto tóxico suele ser más intenso en riñón (nefrotóxico), no es inmunogénica y no se inactiva en presencia de oxígeno.^{48,49,50.}

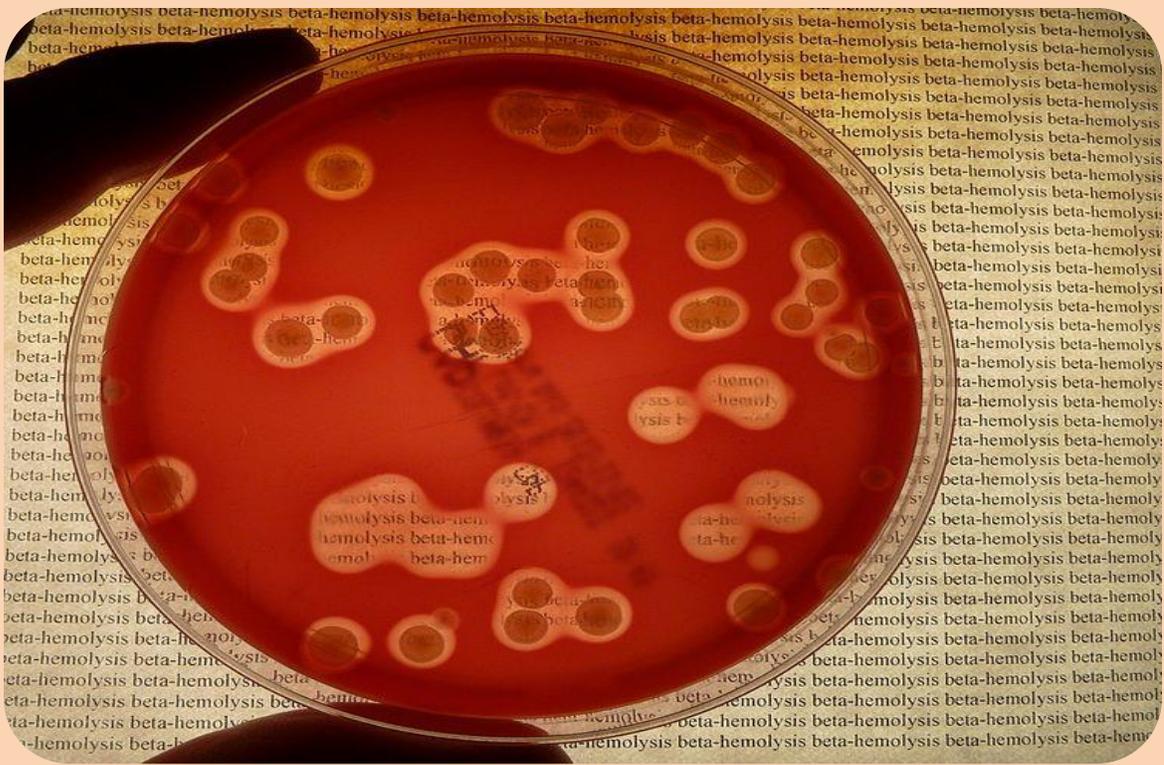


Figura 3.17 Estreptolisinas O y S. causantes de la lisis de eritrocitos en Agar Sangre de Carnero al 5 %⁹⁰

Capítulo 4

Siembra e identificación de Staphylococcus y Streptococcus de importancia clínica

4. Siembra e identificación de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia Clínica

4.1 *Staphylococcus aureus*

Sir Alexander Ogston, de origen escocés y Médico de profesión, descubrió en la pus de un absceso quirúrgico de rodilla la bacteria *Staphylococcus*, en 1878 introdujo la nomenclatura del género que proviene de *staphylo* que significa “racimo de uva” y *cocos* por ser “células esféricas”. La bacteria de *Staphylococcus aureus* es inmóvil, no esporulada, anaerobio facultativo, se presenta en forma de diplococos o racimos de uva, posee la enzima catalasa y coagulasa, es Gram positivo y es muy común que este microorganismo cause enfermedades como:

Impétigo. Es una lesión que se caracteriza por maceración de la piel, formación de una pápula eritematosa que es dolorosa y evoluciona para formar costra con eritema periférico.

Forúnculo. Es un pequeño absceso localizado en la piel y en tejido celular subcutáneo; la piel puede romperse con facilidad y drenar secreción purulenta.

Síndrome de shock toxico (TSST). La toxina afecta principalmente a mujeres que usan tampones contaminados por *S. aureus* esto durante su periodo menstrual, provocando descamación en área genital.

Síndrome de piel escaldada. Enfermedad de Lyell o necrólisis epidérmica tóxica causada por *Staphylococcus aureus* por producir daños en la piel como la generación de ampollas, producción de eritemas y exfoliación que deja la piel adolorida, además este síndrome puede provocar fiebre en el paciente.

A continuación se mostrara el aislamiento y la morfología colonial de *Staphylococcus aureus* en diferentes medios de cultivo como Agar Sal y Manitol, Agar S-110, Agar S-110, Agar Soya Tripticaseina y Agar Sangre de Carnero al 5%

Morfología Colonial

Cuadro 9	<i>S. aureus</i>
Características	Agar Sal y Manitol
Color	Dorado
Tamaño	2-3 mm
Forma	Redonda
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Adherente
Otras	Fermentación del Manitol



FOTO 4.1. Agar Sal y Manitol. Colonias de *S. aureus*, sembrado por estría cruzada

El medio de cultivo Agar Sal y Manitol es un medio selectivo diferencial que contienen 7.5 g de NaCl que permite el crecimiento de bacterias halófilas como el del genero *Staphylococcus*, además nos permite identificar a *Staphylococcus aureus* por fermentar el carbohidrato de manitol que contiene el medio de cultivo el cual al ser detectado por el indicador Rojo de Fenol las colonias crecen de color dorado.

Morfología Colonial

Staphylococcus aureus

Cuadro 10	
Características	Agar S-110
Color	Amarillo pálido
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Suave
Otras	Fermenta el manitol



Foto 4.2. Agar S-110. Colonias de *S. epidermidis*. Sembrado por estría cruzada

El agar S-110 es un medio de cultivo selectivo diferencial que contiene extracto de levadura y tripteína que aportan nutrientes al microorganismo, el NaCl su alta concentración ayuda a inhibir el crecimiento de otros microorganismos para permitir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, dicho microorganismo es capaz de fermentar el manitol y lactosa que contiene el medio de cultivo produciendo colonias de color amarillo pálido.

Morfología colonial

Staphylococcus aureus

Cuadro 11	
Características	Agar Soya Trypticaseína
Color	Crema
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Cóncava
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Suave
Otras	Olor a mantequilla

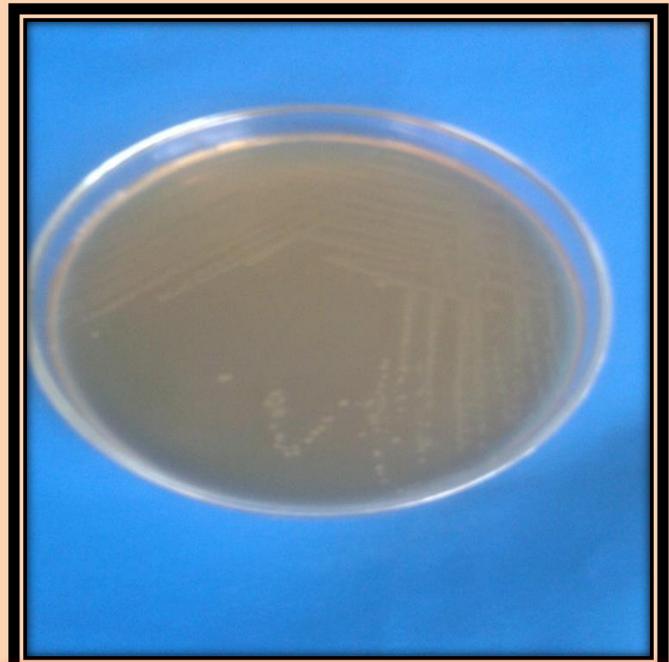


FOTO 4.3. Agar Soya Trypticaseína. Colonias de *S. aureus*, sembrado por estría cruzada

El Agar Soya Trypticaseína es un medio de cultivo no selectivo que facilita el desarrollo de microorganismos anaerobios facultativos como el *Staphylococcus aureus* por tener el medio entre sus componentes NaCl que mantiene el equilibrio osmótico, el fosfato dipotásico funciona como amortiguador de pH, la soya y la caseína aportan nutrientes para el desarrollo de colonias del microorganismo.

Morfología Colonial

Staphylococcus aureus

Cuadro 12	
Características	Agar Sangre de carnero al 5%.
Color	Blanquesino
Tamaño	2-3 mm
Forma	Redondo
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Suave
Otras	β - hemolisis



FOTO 4.4. Agar Sangre de Carnero al 5 %. Colonias de *S. aureus*, sembrado por estría cruzada

Es Agar Sangre de carnero al 5 % es medio de cultivo que contiene infusión de musculo de corazón y peptona que otorgan al medio alto valor nutritivo, se encuentra enriquecido con vitaminas, enzimas y no contiene antibióticos para permitir el crecimiento de la mayoría de microorganismos como el *Staphylococcus aureus*, su crecimiento en el medio produce una zona transparente alrededor de las colonias (β - hemólisis) ya que produce una destrucción total de eritrocitos de carnero.

Tinción de Gram



FOTO 4.5. *Staphylococcus aureus*, Gram positivo, se observa en diplococos y racimos de uva que miden 1 μm de dm

Pruebas Bioquímicas

Prueba de catalasa

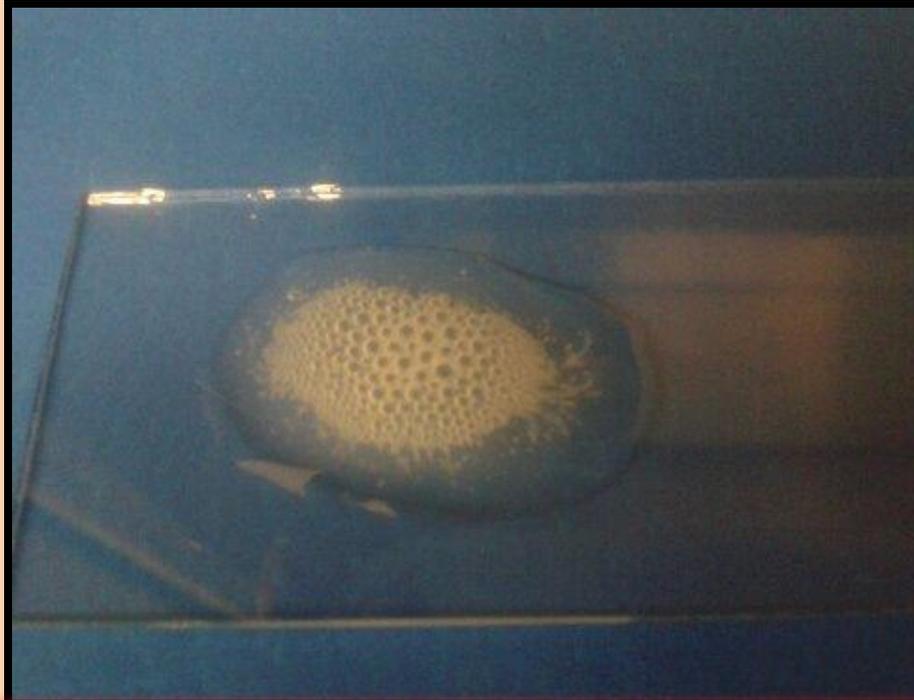


FOTO 4.6. *Staphylococcus aureus*, catalasa positiva. Formación de burbujas de O₂

La enzima catalasa es una hidropéroxidasa que se encuentra en la bacteria de *Staphylococcus aureus* debido a que esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua + Oxígeno, observándose formación de burbujas de O₂ visibles.



Resultados de Pruebas Bioquímicas en tubo de *Staphylococcus aureus*

Cuadro 13	
Pruebas Bioquímicas <i>Staphylococcus aureus</i>	Resultados
1) TSI	A/A H ₂ S=(-)
2) MIO	Motilidad=(-) Indol=(-) Ornitina=(-)
3) SIM	Motilidad=(-) Indol=(-) H ₂ S=(-)
4) LIA	Descarboxilación de Lisina=(-) Desaminación de Lisina=(-) Fermentación de Glucosa=(+)
5) Citrato de Simmons	Citrato=(-)
6) UREA de Crihistensen	Urea=(+)
7/8) RM/VP	RM=(+)/VP=(+)

En cuadro 13 se encuentran los resultados de la interpretación de pruebas bioquímicas de TSI, MIO, SIM, LIA Citrato de Simmons, Urea y Rojo de metilo-Vogues proskauer de *Staphylococcus aureus*.

Nota: El fundamento, composición del medio, resultados de referencia e interpretación del medio se encuentran en anexo.

A continuación se presentaran los resultados que se obtuvieron de la parte experimental para la identificación bacteriana.

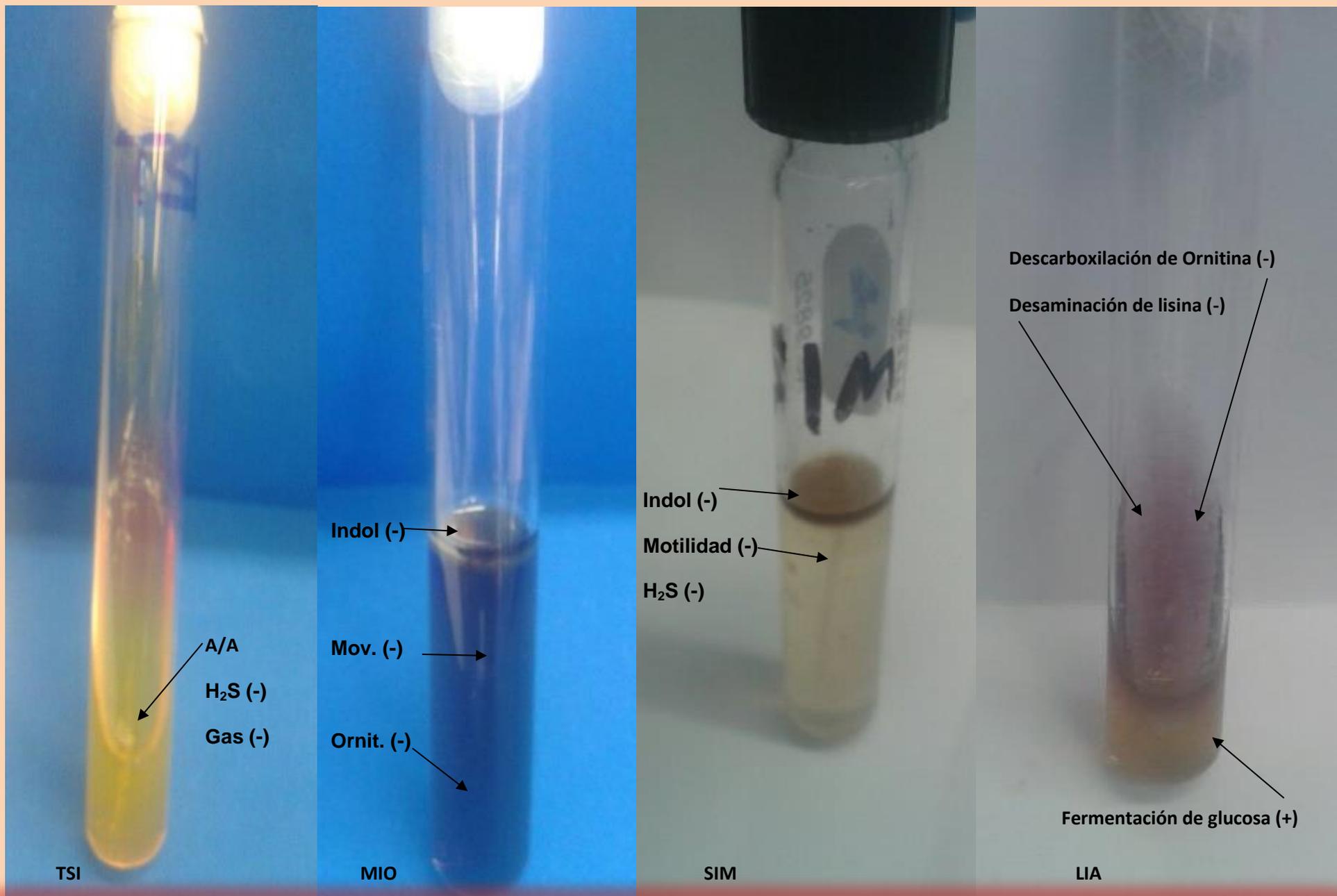


Foto 4.7 Resultados de Pruebas Bioquímicas de TSI, MIO, SIM, LIA.

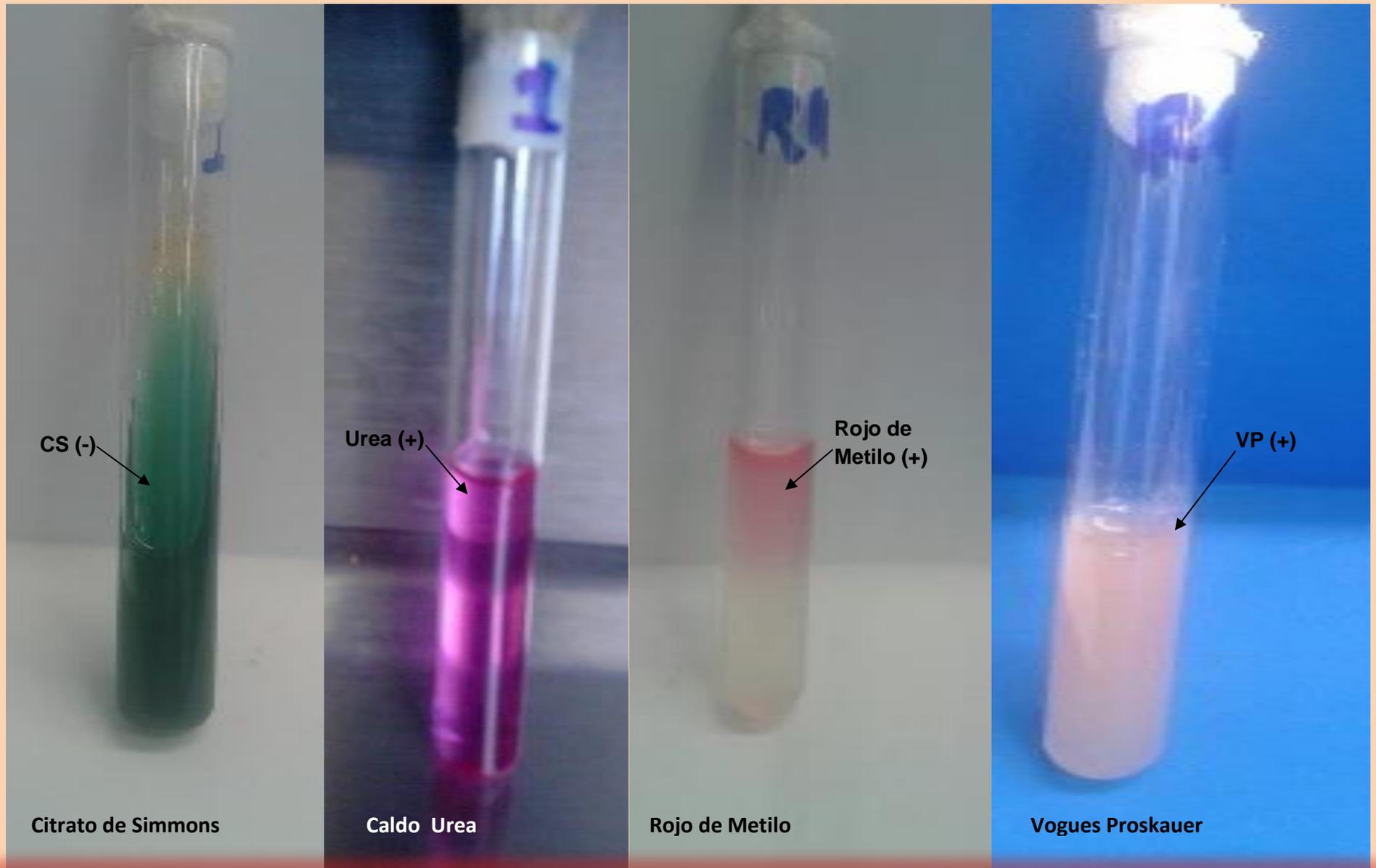
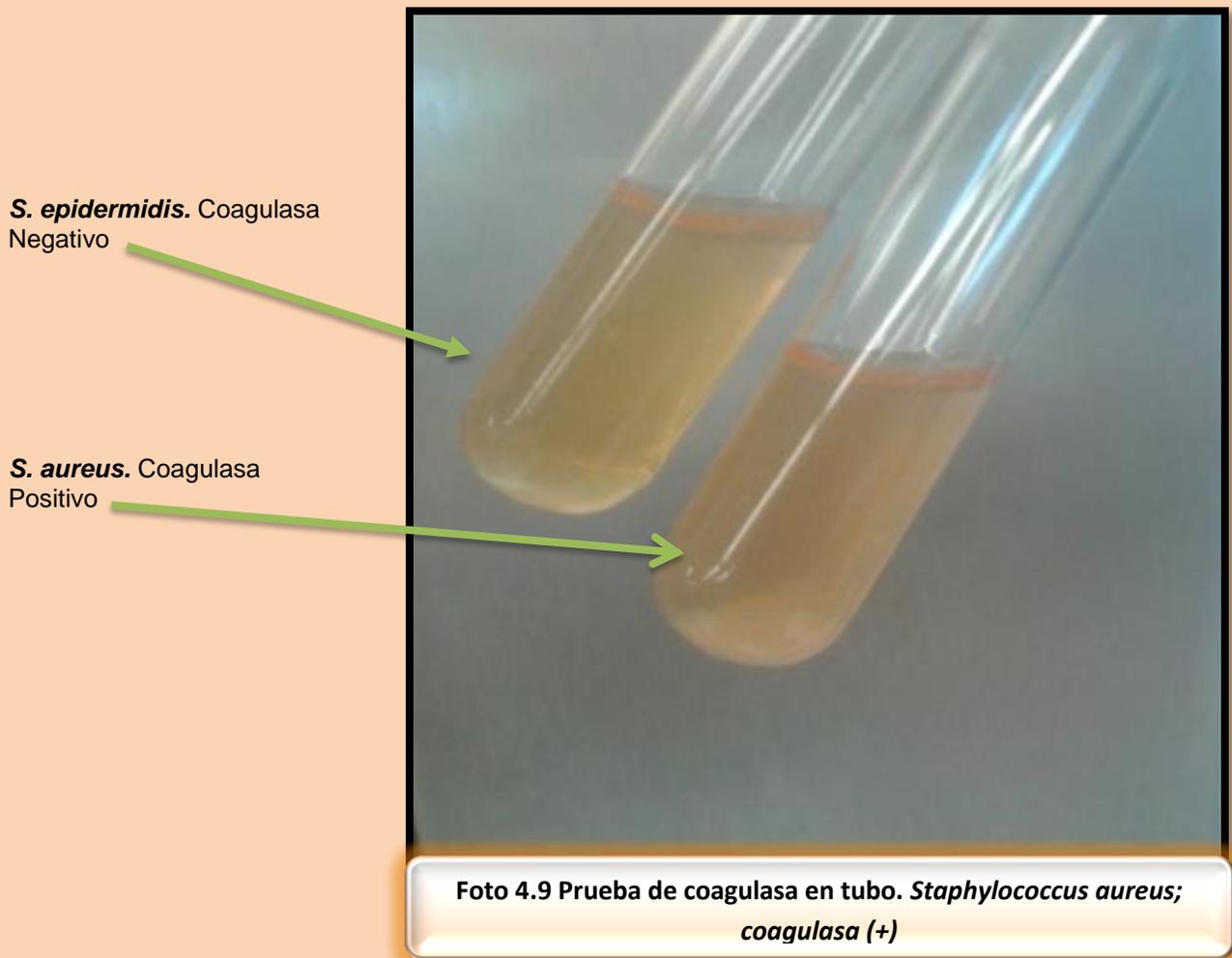


Foto 4.8 Resultados de Pruebas Bioquímicas de Citrato de Simmons, UREA, Rojo de Metilo-Vogues Proskauer

✓ **Prueba de Coagulasa Libre**

En esta técnica sirve para diferenciar especies del género *Staphylococcus*. La enzima coagulasa no posee actividad proteolítica es decir reacciona de manera específica con la protrombina convirtiendo el fibrinógeno soluble en un coagulo de fibrina insoluble que solo se observa en bacterias como *Staphylococcus aureus*.



✓ **Coagulasa Ligada (Prueba de Coagulasa en placa)**

La coagulasa ligada o factor de agregación es responsable de la absorción del fibrinógeno y lo altera de tal modo que precipita sobre *Staphylococcus* que son coagulasa positivo para causar su agregación, lo que produce la aglutinación rápida de las células. El factor de agregación convierte el fibrinógeno en fibrina de manera directa sin la participación de factores del plasma y no es inhibido por los anticuerpos contra la coagulasa libre.

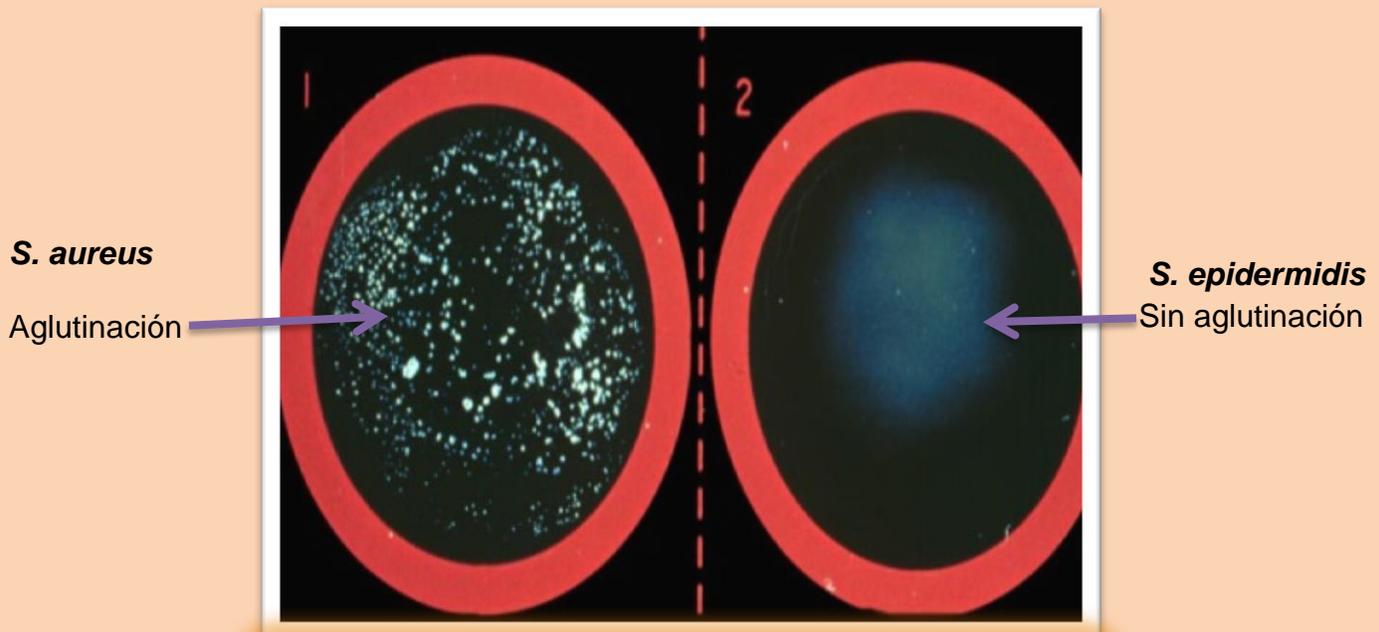


Foto 4.10. Prueba de coagulasa en placa. *Staphylococcus aureus* presenta aglutinación, mientras que *Staphylococcus epidermidis* es Coagulasa negativo

Fermentación de Carbohidratos de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus

Cuadro 14	
Caldo Rojo de Fenol + Carbohidratos con Campana de Durham	RESULTADOS
RF + Glucosa	F/ SG
RF + Lactosa	F/ SG
RF + Xilosa	SF/ SG
RF + Manitol	F/ SG
RF + Sorbitol	SF/ SG
RF + Trehalosa	F/ SG
RF + Maltosa	F/ SG

Interpretación:

F= Fermentación (Ácido-Amarillo)

S/F= Sin fermentación (Alcalino-Rojo)

G= Producción de gas en campanas de

Durham: CO₂ y H₂

SG= Sin producción de gas en campanas de

Durham: CO₂ y H₂

Nota: Los carbohidratos se realizaron por Duplicado

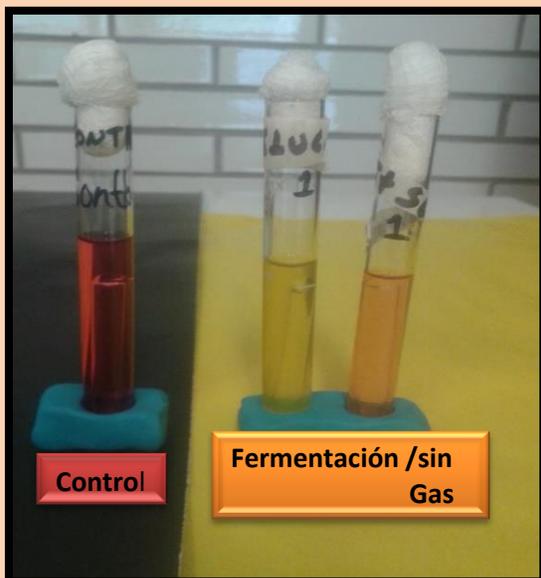


Foto. 4.11. Rojo de Fenol + Glucosa con Campana de Durham. F/SG



Foto 4.12. Rojo de Fenol + Lactosa con Campana de Durham. F/SG



Foto 4.13 Rojo Fenol + Manitol con Campana de Durham. K/SG

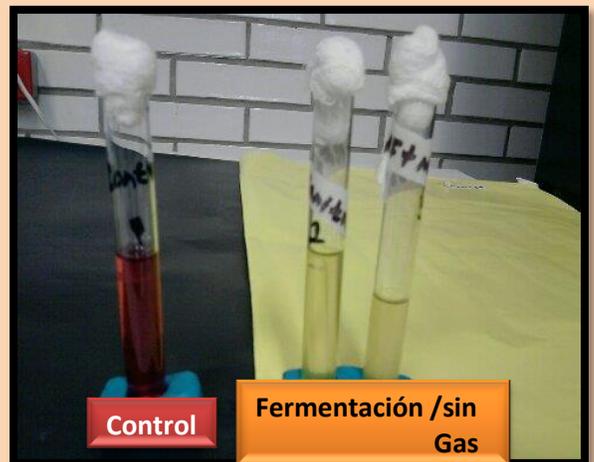


Foto 4.14. Rojo de Fenol + Xilosa con Campana de Durham. F/SG



Foto 4.15. Rojo de Fenol + Sorbitol con Campana de Durham. K/SG



Foto 4.16. Rojo de Fenol + Trehalosa con Campana de Durham. F/SG



Foto 4.17. Rojo de Fenol + Maltosa con Campana de Durham. F/SG

4.2 *Staphylococcus epidermidis*

(El Médico alemán Friedrich Julius Rosenbach (1842-1923) descubrió al microorganismo *Staphylococcus albus*, tiempo después esta bacteria fue renombrado como *Staphylococcus epidermidis* por su localización en piel. El *Staphylococcus epidermidis* es un diplococo, inmóvil, que mide de 0,5-1 μm de diámetro, es no esporulado y anaerobio facultativo. Se caracteriza por ser catalasa positiva, coagulasa negativo, termonucleasa negativo, fermenta carbohidratos como glucosa, sacarosa, lactosa y produce gas, además forma productos de ácidos terminales, es ureasa débilmente negativo y no produce hemólisis en medios de agar sangre. Es parte de la flora comensal de la piel, aunque el *S. epidermidis* no suele ser patógeno puede llegar a ser infeccioso en pacientes con sistemas inmunes comprometidos. *S. epidermidis* es también una preocupación importante para las personas con catéteres u otros implantes quirúrgicos, ya que la bacteria causa biopelículas que crecen en estos 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 pudo haber sido contaminado por este microorganismo. Otra enfermedad que causa *S. epidermidis* es la endocarditis en pacientes con válvulas cardíacas ya que la bacteria puede entrar en el momento de un recambio valvular.

A continuación se mostrara el aislamiento y morfología colonial de *Staphylococcus epidermidis* en diferentes medios de cultivo como Agar Sal y Manitol, S-110, Agar soya tripticaseina y Agar sangre de carnero al 5 %.

Morfología Colonial

Staphylococcus epidermidis

Cuadro 15	
Características	Agar Sal y Manitol
Color	Blanco
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Suave
Otras	No fermenta manitol



Foto 4.18. Agar Sal y Manitol. Colonias de *S. epidermidis*, Sembrado por estría cruzada

El Agar Sal y Manitol es un medio de cultivo selectivo diferencial que contiene 7.5 % de NaCl que permite el crecimiento de bacterias halófilas como *Staphylococcus epidermidis* , la bacteria no es capaz de fermentar el carbohidrato manitol y por lo tanto al no ser detectado por el indicador rojo de fenol las colonias se observan de color blanco y el medio conserva su color salmón esto por no presentar fermentación de manitol.

Staphylococcus epidermidis.

Cuadro 16	
Características	Agar S- 110
Color	Blanco
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Cóncava
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Suave
Otras	No fermenta Manitol



Foto 4.19. Agar S-110, Colonias de *S. epidermidis*, Sembrado por estría cruzada

El Agar S-110 es un medio de cultivo selectivo diferencial que contiene entre sus componentes extracto de levadura y tripteina que aportan nutrientes al microorganismo, el NaCl mantiene la presión osmótica por lo tanto este medio permite el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* ya que sus colonias crecen de color blanco debido a que la bacteria no es capaz de fermentar los carbohidratos manitol y lactosa.

Staphylococcus epidermidis

Cuadro 17	
Característica	Agar Soya Trypticaseina
Color	Blanco Pálido
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Suave
Otras	-----

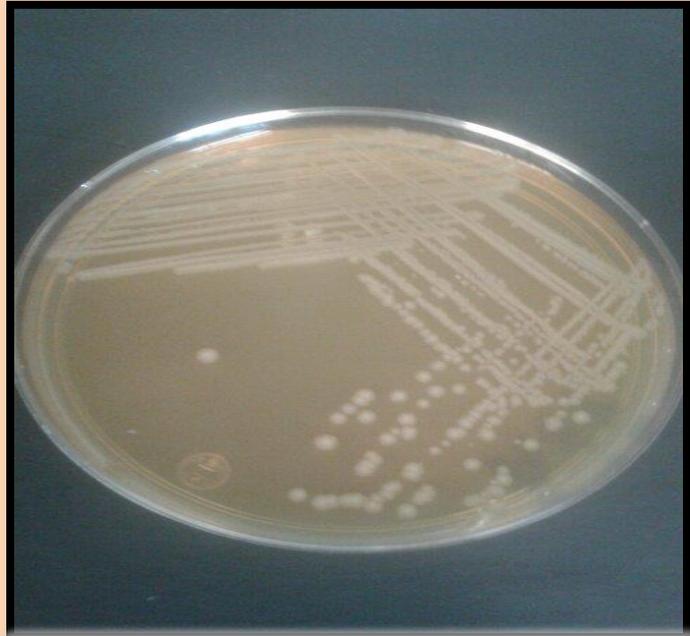


FOTO 4.20. Agar Soya Trypticaseina, Colonias de *S. epidermidis*, Sembrado por estría cruzada

El Agar Soya Trypticaseina es un medio de cultivo no selectivo que facilita el desarrollo de microorganismos anaerobios facultativos como el *Staphylococcus epidermidis* dando un crecimiento de colonias de color blanco pálido.

Staphylococcus epidermidis

Cuadro 18	
Característica	Agar Sangre de carnero al 5 %
Color	Blanco
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Cóncava
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Suave
Otras	γ- Hemólisis



Foto 4.21. Agar Sangre de Carnero al 5%.
Colonias de *S epidermidis*, Sembrado por estría
cruzada

El Agar Sangre de Carnero al 5 % es un medio de cultivo enriquecido que contiene peptona e infusión de musculo de corazón que otorga alto valor nutritivo al medio para permitir el crecimiento fácil de microorganismos como el *S epidermidis* quien su crecimiento de colonias no produce hemólisis en los eritrocitos de carnero que contiene el medio de cultivo; por ello la bacteria es considerada como γ- hemolítico.

Tinción de Gram

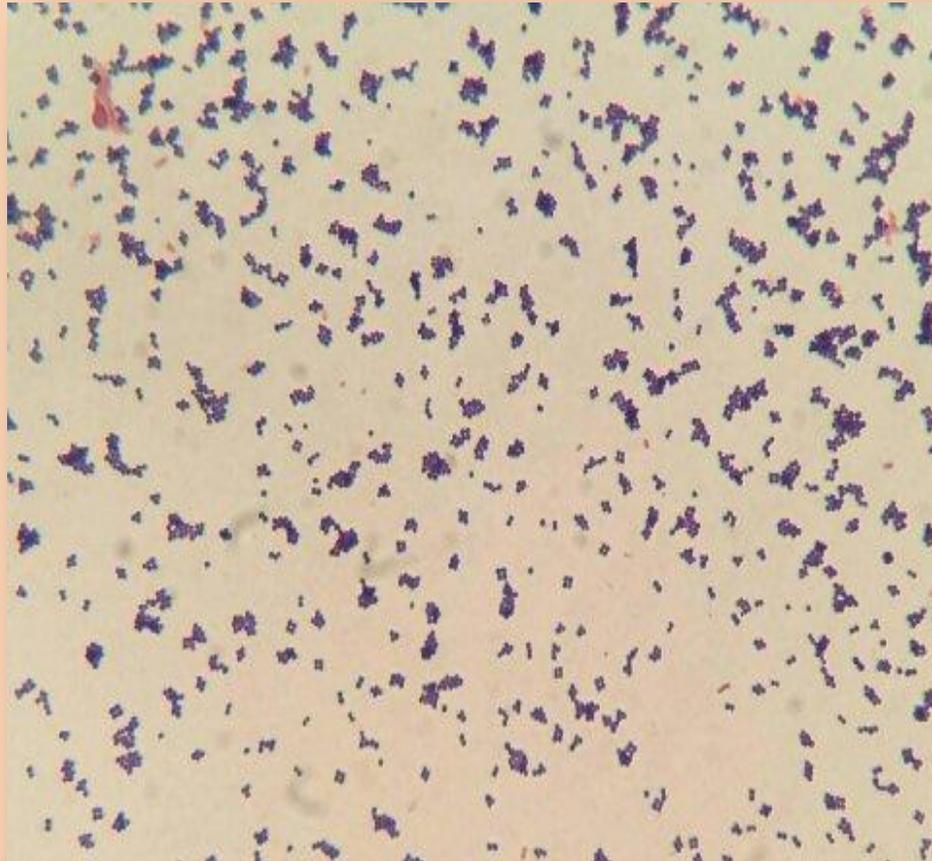


Foto 4.22. *Staphylococcus epidermidis*. Gram positive, se observan diplococos que miden de 0.5-1 μm de dm

Pruebas Bioquímicas

Prueba de Catalasa



Foto 4.23. *S. epidermidis*, Catalasa positivo. Formación de burbujas de O₂

Staphylococcus epidermidis es una bacteria anaerobia facultativa que posee la enzima catalasa que es capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno en Oxigeno + agua, provocando una reacción de formación de burbujas de oxigeno visibles en el portaobjetos.

Reacción:



Resultados de Pruebas Bioquímicas en tubo de *S. epidermidis*

Cuadro 19	
Pruebas Bioquímicas <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Resultados
1) TSI	A/A. H ₂ S=(-)
2) MIO	Motilidad=(-) Indol=(-) Ornitina=(-)
3) SIM	Motilidad=(-) Indol=(-) H ₂ S=(-)
4) LIA	Descarboxilación de Lisina=(-) Desaminación de Lisina=(-) Fermentación de Glucosa=(+)
5) Citrato de Simmons	Citrato= (-)
6) Urea de Crhistensen	Urea=(-)
7/8) RM/VP	RM=(+)/VP=(+)

En cuadro 19 se encuentran los resultados de la interpretación de pruebas bioquímicas de TSI, MIO, SIM, LIA Citrato de Simmons, Urea y Rojo de metilo-Vogues proskauer de *Staphylococcus epidermidis*.

Nota: El fundamento, composición del medio, resultados de referencia e interpretación del medio se encuentran en anexo.

A continuación se presentaran los resultados que se obtuvieron de la parte experimental para la identificación bacteriana

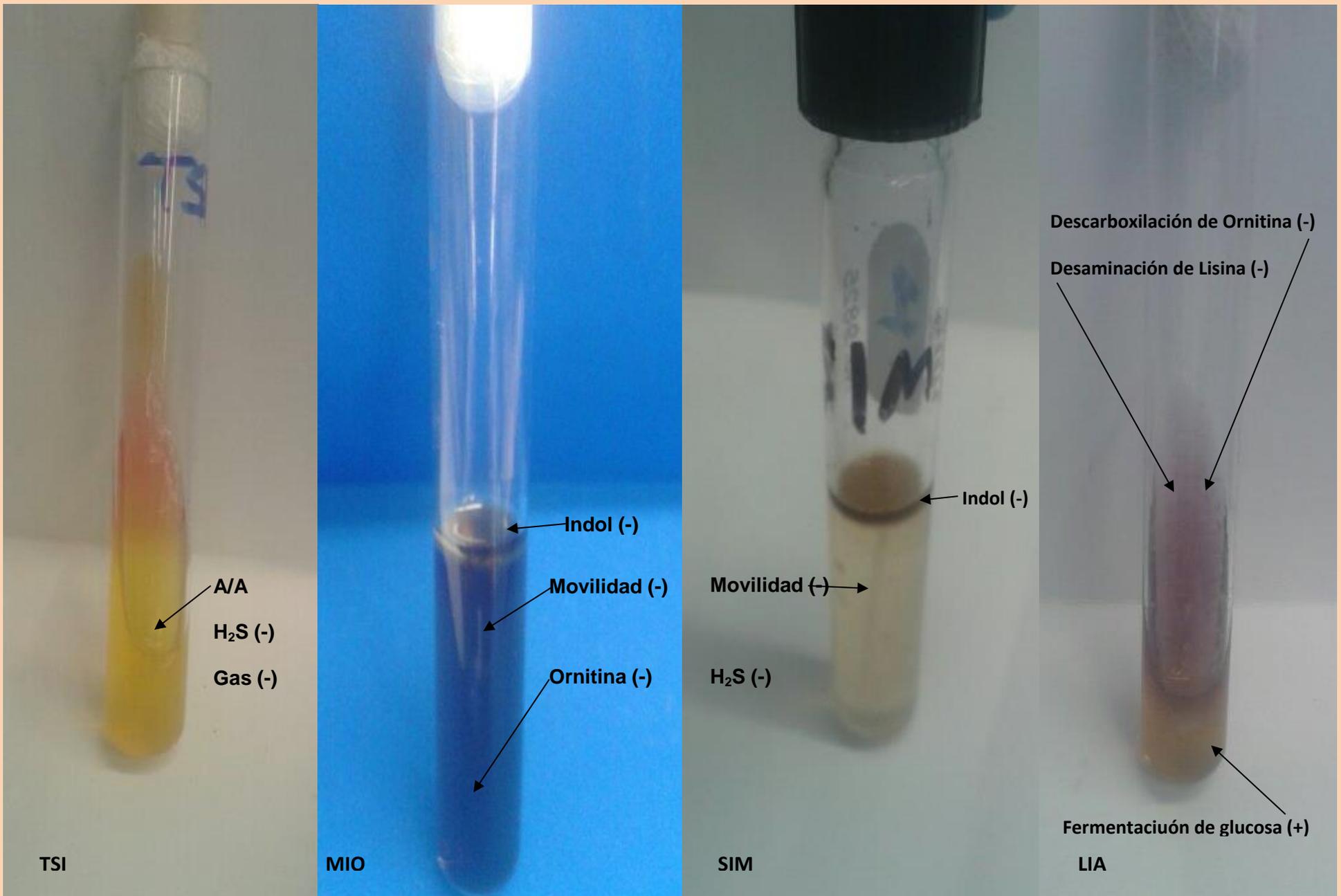


Foto 4.24. Resultados de Pruebas Bioquímicas de TSI, MIO, SIM Y LIA.

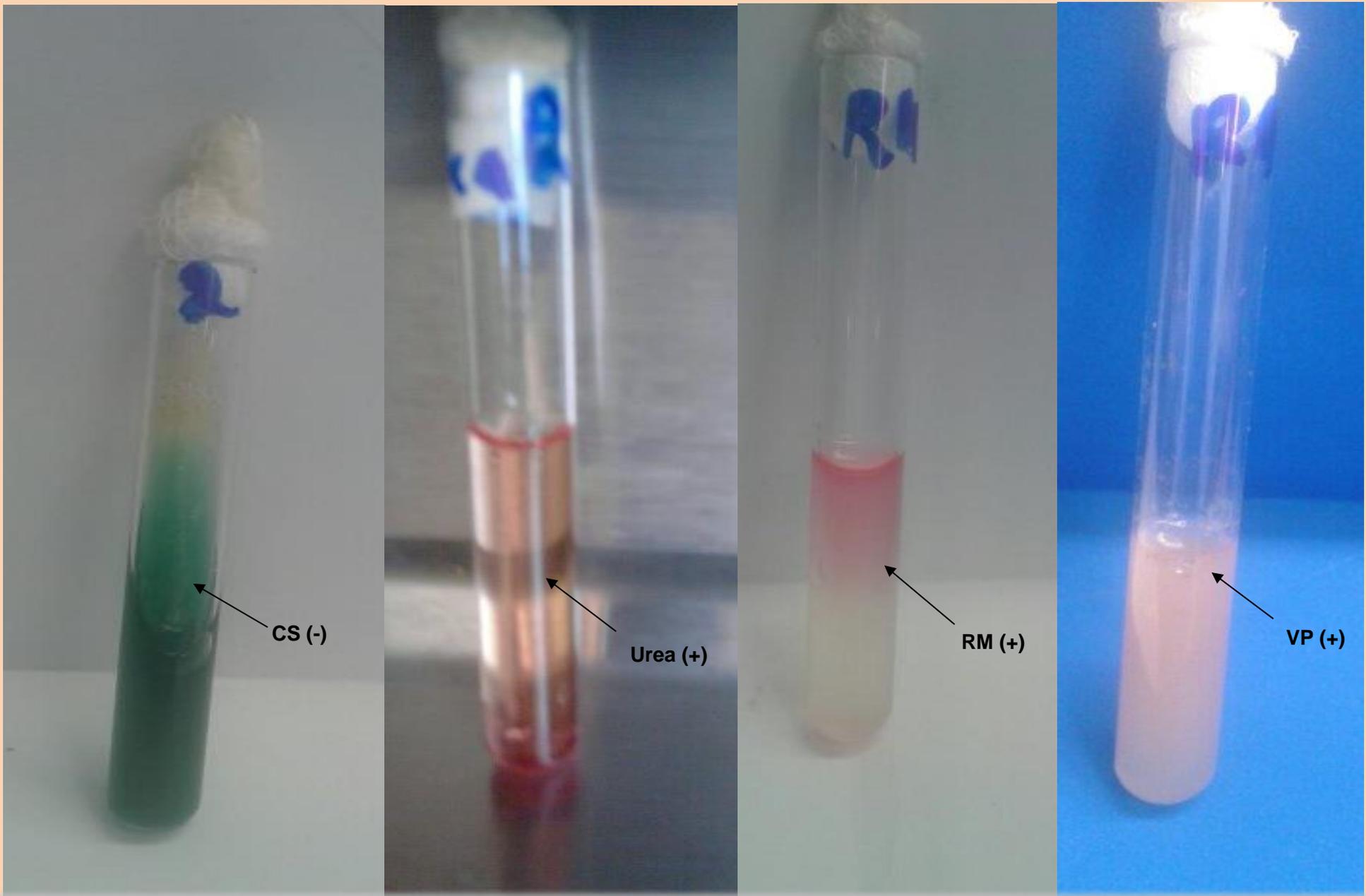


Foto 4.25. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Citrato de Simmons, Urea, Rojo de Metilo y Vogues Proskauer.

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis

Cuadro 20	
Caldo Rojo de Fenol + Carbohidratos con Campana de Durham	RESULTADOS
RF + Glucosa	F/ G
RF + Lactosa	F/ G
RF + Xilosa	K/ SG
RF + Manitol	K/ SG
RF + Sorbitol	K / SG
RF + Trehalosa	K/ SG
RF + Maltosa	F/G

Interpretación:

F= Fermentación (Ácida-Amarillo)

K= Alcalino (Rojo)

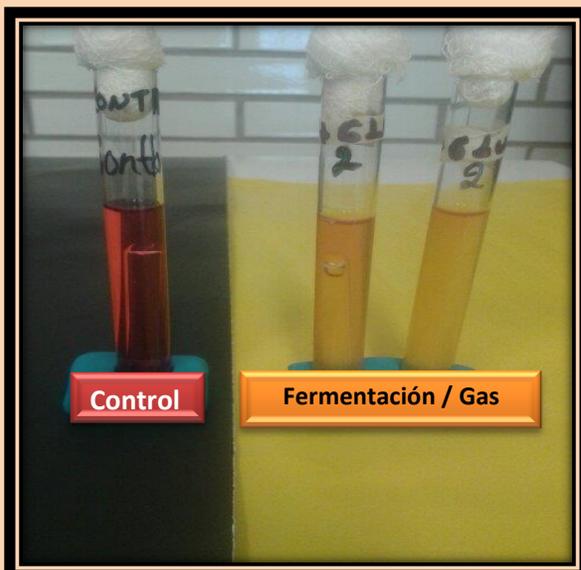
G= Producción de gas en campana de

Durham: CO₂ y H₂

SG= Sin producción de gas en campana

de Durham: CO₂ y H₂

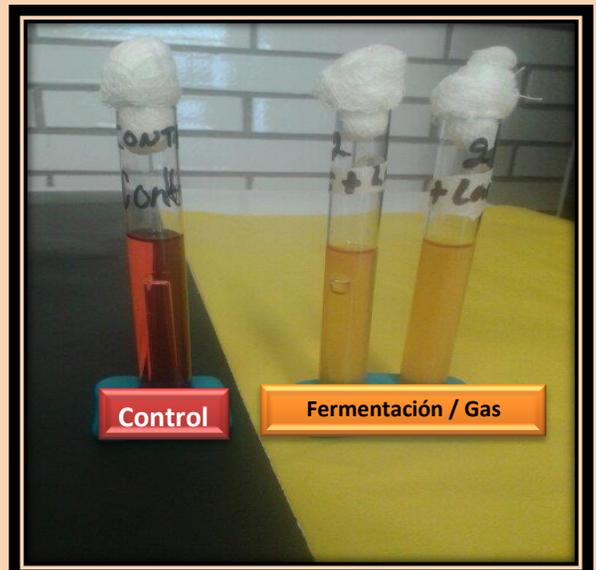
Nota: todos los carbohidratos se realizaron por duplicado.



Control

Fermentación / Gas

Foto 4.26. Rojo Fenol + Glucosa con Campana de Durham. F/G



Control

Fermentación / Gas

Foto 4.27. Rojo de Fenol + Lactosa con Campana de Durham. F/G



Control

Sin Fermentación /sin Gas

Foto 4.28. Rojo de Fenol + Xilosa con Campana de Durham. SF/SG



Control

Sin Fermentación /sin Gas

Foto 4.29. Rojo de Fenol + Manitol con Campana de Durham. SF/SG



Control

Sin Fermentación /sin Gas

Foto 4.30. Rojo de Fenol + Sorbitol con Campana de Durham. SF/SG



Control

Sin Fermentación /sin Gas

Foto 4.31. Rojo de Fenol + Trehalosa con Campana de Durham. SF/SG



Control

Fermentación / Gas

Foto 4.32. Rojo de Fenol + Maltosa con Campana de Durham. F/G

4.3 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus del grupo A se presenta como célula oval o esférica, mide de 0,5-1 μm de diámetro, se encuentra agrupada en pares en medios sólidos y cadenas largas en cultivos líquidos, es inmóvil, no esporulado, Gram positivo, carecen de la enzima catalasa y citocromo oxidasa, su metabolismo es anaerobio facultativo. La bacteria crece en presencia de CO_2 , degradan carbohidratos por fermentación, sus colonias son puntiformes que miden de 0-1 mm de diámetro, son traslucidas o ligeramente opacas, circulares, convexas, y principalmente mucoides ya que es una cepa muy virulenta.

En agar sangre *S. pyogenes* produce β -Hemólisis y el color de sus colonias es blanco-transparente, Son sensibles a la Bacitracina, resistentes a la Optoquina y sensible a la mayoría de los antibióticos.

El antígeno M que posee *S. pyogenes* en la pared celular lo difiere antigénicamente de la mayoría de los otros *Streptococcus*. Esta bacteria causa una gran variedad de enfermedades y cuenta con un gran arsenal de factores de virulencia principalmente la sustancia M esta sustancia que posee causa la degradación de componentes C3b además posee una capsula compuesta de ácido hialurónico que inhibe la fagocitosis y ayuda a la penetración de tejidos causando la separación de células epiteliales escamosas.

Streptococcus pyogenes infecta sólo a humanos bajo condiciones naturales, quizás porque la estreptocinasa reacciona específicamente con un factor de coagulación humano. Las infecciones por esta bacteria se diseminan con facilidad por gotitas respiratorias generadas al gritar, toser y estornudar; estas gotitas

alcanzan una distancia de 60 a 150 cm de un individuo infectado ya que si se deja de tratar, la persona será un portador asintomático por semanas. Las personas que portan a la bacteria por las fosas nasales diseminan con más efectividad a comparación de que los que transmiten por la boca.

Las epidemias de faringitis por *Streptococcus* se originan por comida contaminada, además la incidencia máxima de faringitis por *S. pyogenes* ocurre en invierno y primavera afectando principalmente a niños de edad escolar, también la bacteria es causante de escarlatina por la toxina eritrogénica que produce.

La prevención consiste en evitar contacto con personas asintomáticas del microorganismo, no consumir alimentos contaminados en los cuales se encuentre con mayor incidencia la bacteria. Para el tratamiento no existe una vacuna disponible a pesar de los años de estudio; sin embargo existen antibióticos entre ellos la penicilina o eritromicina con un tratamiento de 10 días elimina en un 90% al microorganismo.^{38,39}

A continuación se mostrara el aislamiento y morfología colonial de *Streptococcus agalactiae* en diferentes medios de cultivo como Agar soya tripticaseina, Agar chocolate, Agar estreptosel y Agar sangre de carnero al 5 %

Morfología Colonial

Streptococcus pyogenes

Cuadro 21	<i>S. pyogenes</i>
Características	Agar Soya Triticaseina
Color	Blanco
Tamaño	0-1 mm
Forma	Puntiforme
Bordes	Irregular
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz Reflejada	Mate
Luz Transmitida	Opaco
Consistencia	Friable
Otros	-----



Foto 4.33. AST. Colonias de *S. pyogenes*. Sembrado por estría cruzada

Agar Soya Trypticaseina es un medio de cultivo no selectivo que favorece el desarrollo de la mayoría de microorganismos Gram positivos como *Streptococcus pyogenes* perteneciente del grupo A de Lancefield. Debido a que el medio de cultivo posee entre sus componentes tripteina y peptona de soya que aporta nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos y bases puricas y pirimidicas que favorecen el crecimiento de colonias.

Streptococcus pyogenes

Morfología colonial

Cuadro 21	<i>S. pyogenes.</i>
Características	Agar chocolate
Color	Blanco
Tamaño	0-1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Irregular
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz Reflejada	Mate
Luz Transmitida	Traslucida
Consistencia	Mucoide
Otros	-----



Foto 4.34. Agar Chocolate. Colonias de *S. pyogenes*, Sembrado por estría cruzada

Agar chocolate es un medio de cultivo enriquecido, no selectivo y es una variante de agar sangre por contener eritrocitos que han sido lisados por el suave calentamiento a 56 °C. Este medio de cultivo posee entre sus componentes peptona de carne y peptona de caseína como fuente de nutrientes, el almidón soluble absorbe sustancias tóxicas indeseables que eviten el desarrollo del microorganismo, el NaCl mantiene un balance osmótico, además contiene el medio antimicrobiano para evitar el desarrollo de otros microorganismos indeseables ya que así se permitió el desarrollo del microorganismo anaerobios facultativos, Gram positivo como el *Streptococcus pyogenes*.

Streptococcus pyogenes

Morfología colonial

Tabla 20.	<i>S. pyogenes.</i>
Características	Agar Estreptosel
Color	Beish
Tamaño	0-1 mm
Forma	Puntiforme
Bordes	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Rugosa
Luz Reflejada	Mate
Luz Transmitida	Traslucida
Consistencia	Suave
Otros	-----



Foto 4.35. Agar Estreptosel. Colonias de *S. pyogenes*, Sembrado por estría cruzada

El agar Estreptosel es un medio de cultivo selectivo para la identificación del género *Streptococcus*. Entre sus componentes el medio de agar Estreptosel posee L-cistina, peptona de caseína y peptona de soya que aportan nutrientes al microorganismo para su desarrollo, la dextrosa es utilizada por el microorganismo como única fuente de Carbono, el Cloruro de Sodio mantiene la presión osmótica, la azida de sodio y el sulfito de sodio son inhibidores de microorganismos no deseados para permitir el crecimiento libre de *Streptococcus pyogenes*.

Streptococcus pyogenes

Morfología colonial

Cuadro 22	<i>S. pyogenes</i>
Características	Agar Sangre de carnero al 5%
Color	Blanco-Grisaseo
Tamaño	0-1 mm
Forma	Puntiforme
Bordes	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz Reflejada	Brillante
Luz Transmitida	Transparente
Consistencia	Mucoide
Otros	β - Hemolisis

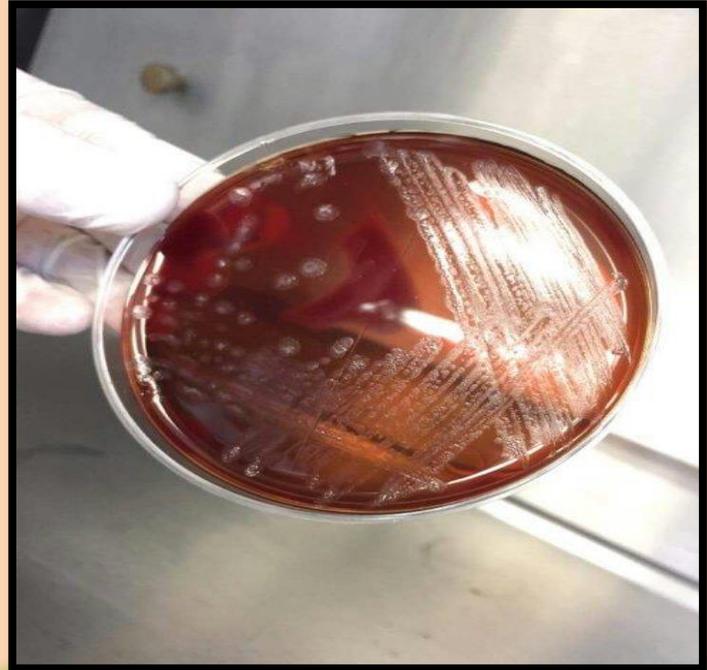


Foto 4.36. Agar Sangre de carnero al 5 %. Colonias de *S. pyogenes*, Sembrado por estría cruzada

El agar Sangre de Carnero al 5 % es un medio de cultivo enriquecido que contiene peptona e infusión de musculo de corazón que otorga alto valor nutritivo al medio para permitir el crecimiento fácil de microorganismos como el *Streptococcus pyogenes* ya que su crecimiento de colonias produce hemólisis en los eritrocitos de carnero que contiene el medio de cultivo y genera una zona totalmente transparente alrededor de la colonia; por ello la bacteria es considerada como β -hemolítico.

Tinción de Gram

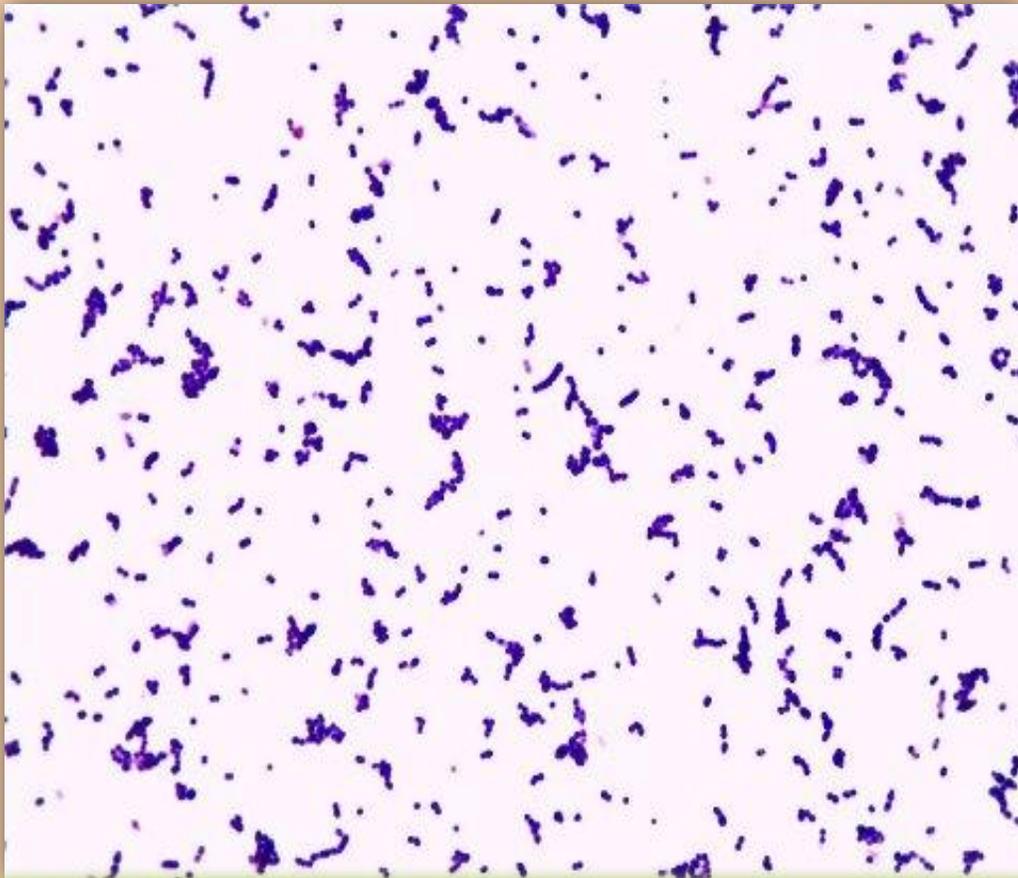


Foto 4.37. *Streptococcus pyogenes*, Gram Positivo, Se observan cadenas largas que miden de 0.5-1 μm

Prueba de sensibilidad a Bacitracina

Determina la sensibilidad de *Streptococcus* β - Hemolítico del grupo A para ser diferenciado de otros *Streptococcus* β - Hemolíticos ya que la sensibilidad a Bacitracina prueba la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana.

S. pyogenes
Sensible a
Bacitracina

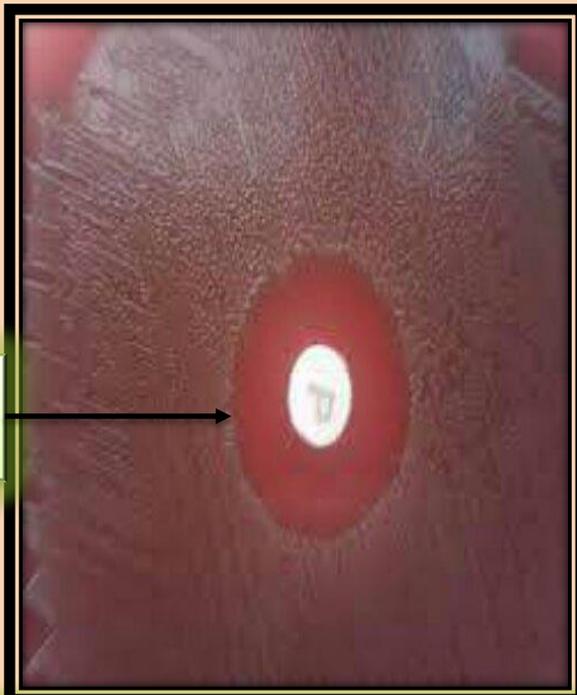


Foto 4.38 *Streptococcus pyogenes*. Sensible a Bacitracina mostrando un halo de inhibición de 9 mm alrededor del sensidisco

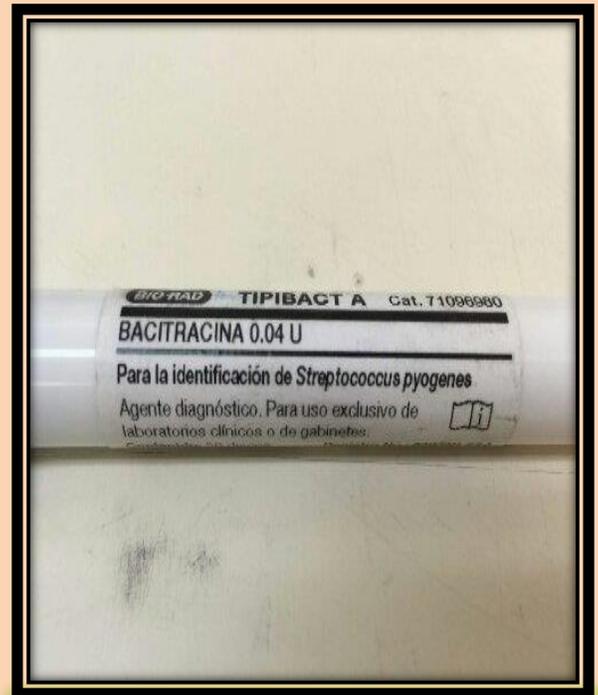


Foto 4.39. Paquete de Sensidiscos de Bacitracina. Cada sensidisco está impregnado con 0.04 U del antibiótico de Bacitracina

Prueba de CAMP (Christie, Atkins y Munch-Petersen)

Los estreptococos del grupo B (*Streptococcus. agalactiae*) produce una proteína difusible y termoestable (Factor CAMP) que provoca el aumento de la β - hemolisis de *Staphylococcus aureus* (Esta bacteria es sembrada desde la parte superior hasta la parte inferior y debe ser en el centro del medio de cultivo agar sangre de carnero al 5%) ya que produce una esfingomielinasa “C” que puede unir a las membranas de los eritrocitos cuando son expuestas al factor de CAMP del grupo B y por lo tanto los eritrocitos del medio de agar sangre sufren hemolisis. El sinergismo que se produce se observa en forma de **“Punta de cabeza de flecha”** en la zona de desarrollo del área de β - Hemólisis.

Prueba de
CAMP. Positivo
S. agalactiae

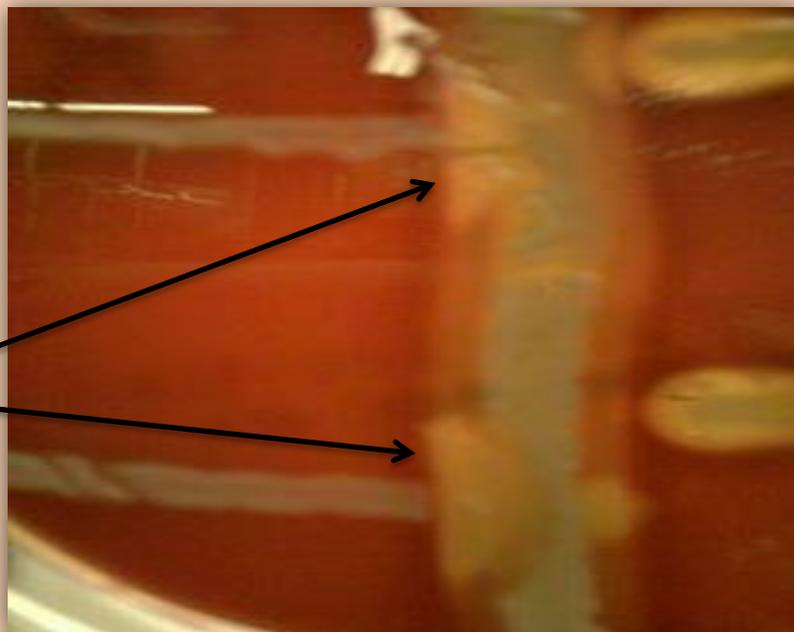


Foto.4.50. Prueba de CAMP. Formación de cabeza de flecha (Sinergismo) de *Streptococcus agalactiae* (izquierda), *Streptococcus pyogenes* (derecha) no hay sinergismo

Pruebas Bioquímicas

Prueba de Catalasa

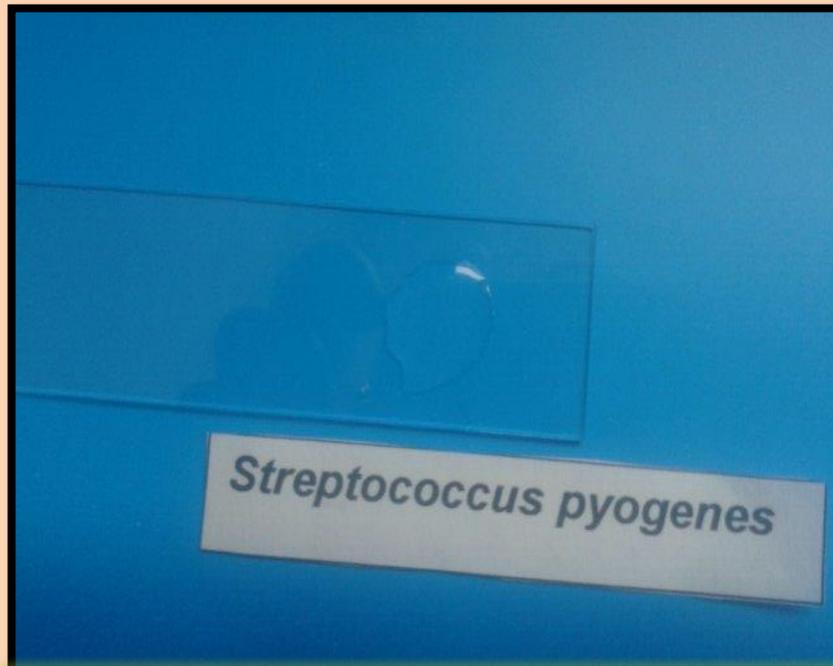


Foto 4.40. *Streptococcus pyogenes*, catalasa negativo, No hay formación de burbujas de O₂

- ✓ *Streptococcus pyogenes* no es capaz de descomponer peróxido de hidrógeno en agua más Oxígeno, debido a que no posee la enzima catalasa y por lo tanto no se observara formación de burbujas de O₂.

Reacción:



Resultados de Pruebas Bioquímicas en tubo de *S. pyogenes*

Cuadro 23	
Pruebas Bioquímicas. <i>Streptococcus pyogenes.</i>	Resultados
1) TSI	A/A H ₂ S =(-)
2) MIO	Motilidad =(-) Indol =(-) Ornitina=(-)
3) SIM	Motilidad=(-) Indol=(-) H ₂ S=(-)
4) LIA	Descarboxilación de Lisina=(-) Desaminación de Lisina=(-) Fermentación de Glucosa=(+)
5) Citrato de Simmons	Citrato de Simmons=(-)
6) urea de Crhistensen	Urea =(-)
7/8) RM/VP	RM=(-)/VP=(-)

En cuadro 13 se encuentran los resultados de la interpretación de pruebas bioquímicas de TSI, MIO, SIM, LIA Citrato de Simmons, Urea y Rojo de metilo-Vogues proskauer de *Staphylococcus aureus*.

Nota: El fundamento, composición del medio, resultados de referencia e interpretación del medio se encuentran en anexo.

A continuación se presentaran los resultados que se obtuvieron de la parte experimental para la identificación bacteriana

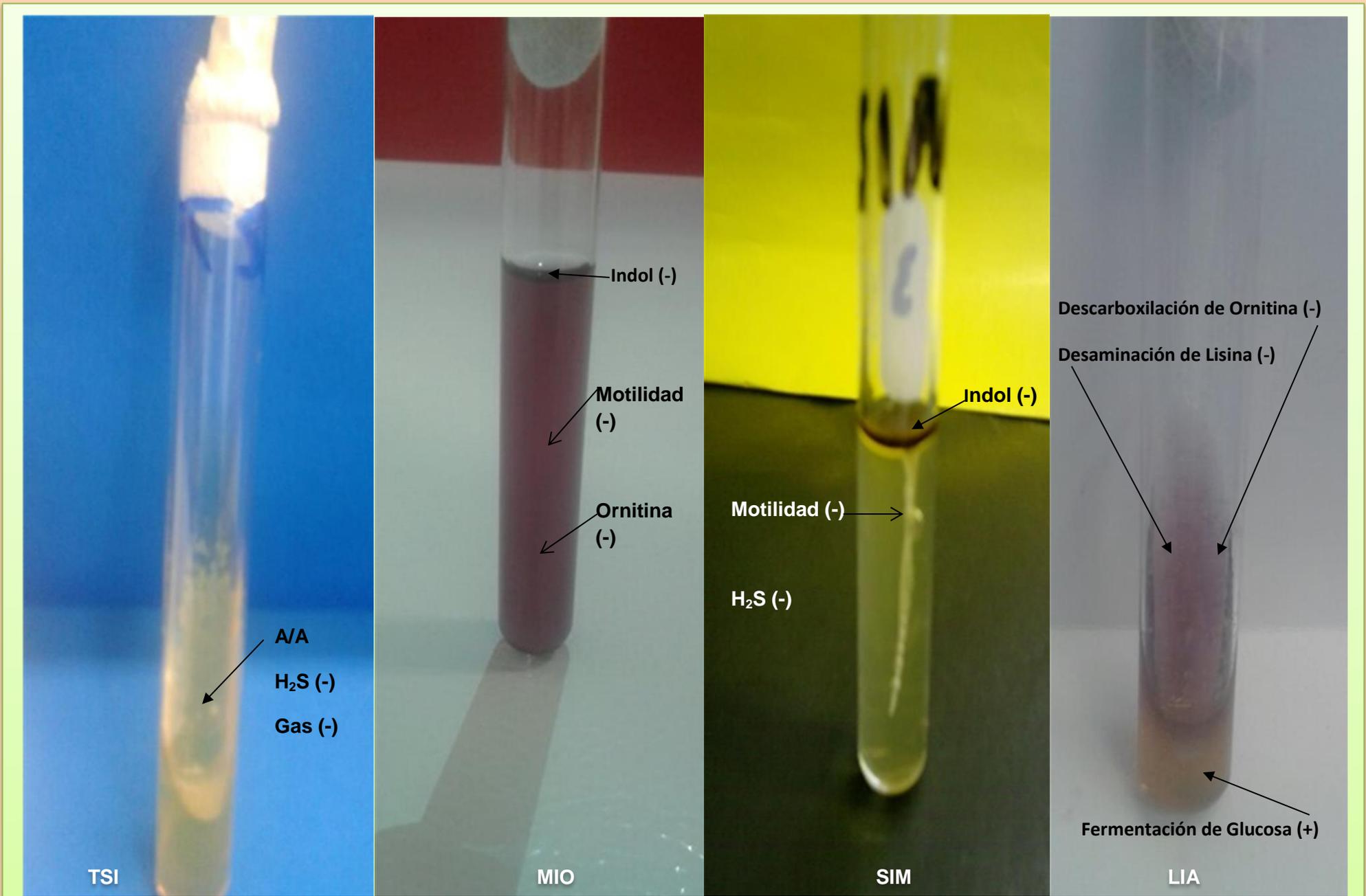


Foto 4.41. Resultados de Pruebas bioquímicas de TSI, MIO, SIM, Y LIA

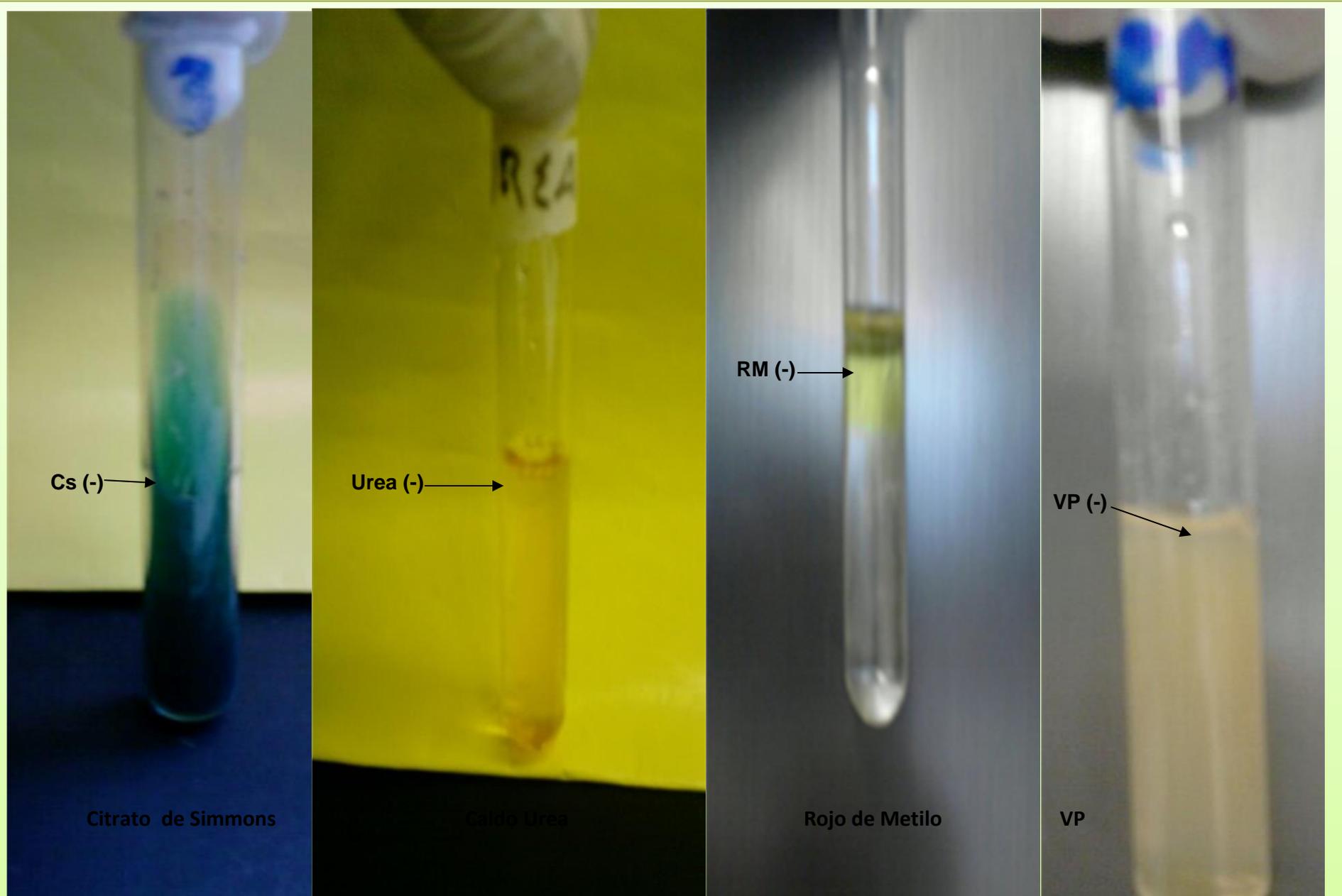


Foto. 4.42. Resultado de Pruebas Bioquímicas de Citrato de Simmons, Urea, Rojo de Metilo-Vogues Proskauer

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes

Cuadro 24	
Caldo Rojo de fenol + Carbohidratos con Campana de Durham	RESULTADOS
RF + Glucosa	F/ G
RF + Lactosa	F/ SG
RF + Xilosa	SF/ SG
RF + Manitol	SF/ SG
RF + Sorbitol	SF/ SG
RF + Trehalosa	F/ SG
RF + Maltosa	SF/ SG

Interpretación:

F= Fermentación (Ácida-Amarillo)

SF= Sin fermentación (Alcalino Rojo)

G= Producción de gas en campanas de Durham: CO₂ y H₂

SG= Sin producción de gas en campanas de Durham: CO₂ y H₂

Nota: Los carbohidratos se realizaron por duplicado

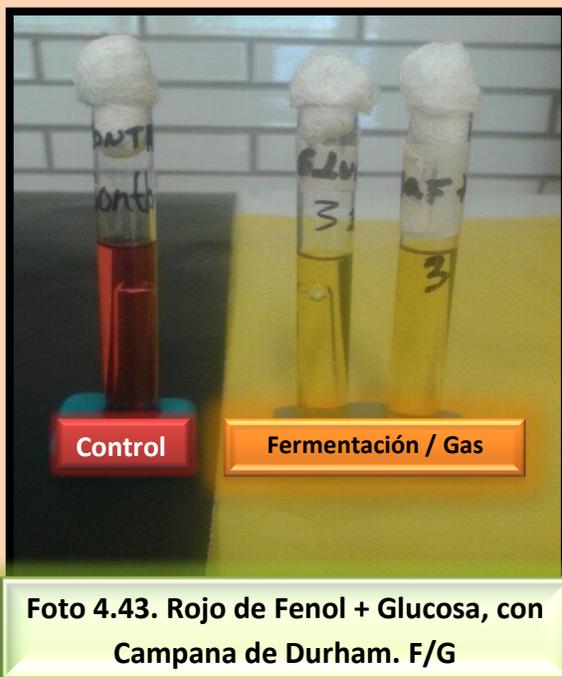


Foto 4.43. Rojo de Fenol + Glucosa, con Campana de Durham. F/G



Foto 4.44. Rojo de Fenol + Lactosa, con Campana de Durham. F/SG



Control

Sin Fermentación / Sin Gas

Foto 4.45. Rojo de Fenol + Xilosa, con Campana de Durham. SF/SG



Control

Sin Fermentación / SG

Foto 4.46. Rojo de Fenol + Manitol, con Campana de Durham. SF/SG



Control

Sin fermentación/ sin Gas

Foto 4.47. Rojo de Fenol + Sorbitol, con Campana de Durham. SF/SG



Control

Fermentación / Sin Gas

Foto 4.48. Rojo de Fenol + Trehalosa, con Campana de Durham. SF/SG



Control

Sin Fermentación / Sin Gas

Foto 4.49. Rojo de Fenol + Maltosa, con Campana de Durham. SF/SG

4.4. *Streptococcus agalactiae*

Es una bacteria que pertenece al grupo B de Lancefield, se encuentra en flora nativa en genitales y aparato respiratorio. En algunos casos se ha encontrado en meningitis, endocarditis y septicemias en neonatos. *Streptococcus agalactiae* se caracteriza por agruparse en cadenas largas en medios líquidos y forma cadenas cortas en medios sólidos, es inmóvil, no esporulado, son Gram positivos, carecen de la enzima catalasa y oxidasa, su metabolismo es anaerobio facultativo, fermentan la mayoría de carbohidratos. Se caracteriza por producir una proteína difusible y termoestable (Factor de CAMP). Prueba fundamental que lo diferencia de las demás especies de *estreptococos*. Sus colonias son puntiformes que miden de 0-1 mm de diámetro; son convexas, circulares, translúcidas, mucoides, superficie lisa y son β -Hemólisis en agar sangre. Sus colonias son de color blanco-grisáceo y son resistentes a la Bacitracina y Optoquina. Debido a que la bacteria se encuentra comúnmente en el tracto urinario o en vagina puede causar una seria infección en recién nacidos por causar una reacción conocida como sepsis neonatal ya que el sistema inmune de un bebe aun es débil por lo tanto la bacteria puede propagarse fácilmente a través de la sangre del neonato. Como tratamiento de elección se recomienda administrar penicilina y en dado caso de ser alérgicos a este antibiótico se recomienda la clindamicina en recién nacidos y en adultos inmunocomprometidos; ya que su toxicidad del antibiótico es leve. Aunque también existen otros antibióticos que pueden ser de elección para atacar la bacteria como la gentamicina, vancomicina y eritromicina.³⁹

A continuación se mostrara el aislamiento y la morfología colonial de *Streptococcus agalactiae* en diferentes medios de cultivo como Agar Casman, Agar Soya Trypticaseina, Agar Estreptosel y Agar sangre de carnero al 5 %

Morfología Colonial

Streptococcus agalactiae

Cuadro 25	
Características	Agar Casman
Color	Gris pálido
Tamaño	0-1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Friable
Otras	β - Hemolisis



Foto 4.51. Agar Casman. Colonias de *S. agalactiae*, sembrado por estría cruzada

El agar Casman es un medio de cultivo diferencial y enriquecimiento para el aislamiento y desarrollo de microorganismos como *Streptococcus* pertenecientes del grupo B ya que el medio de cultivo solido contiene entre sus componentes peptona biotriptasa que proporciona el complejo vitamínico, el almidón de maíz impide la inhibición del crecimiento del microorganismo y los eritrocitos de caballo al ser lisados permiten observar la hemolisis de *Streptococcus agalactiae* β -Hemolítico.

Streptococcus agalactiae

Morfología colonial

Cuadro 26	
Características	Agar Soya Tripticaseina
Color	Blanco
Tamaño	0-1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
luz transmitida	Opaco
Consistencia	Friable
Otras	-----

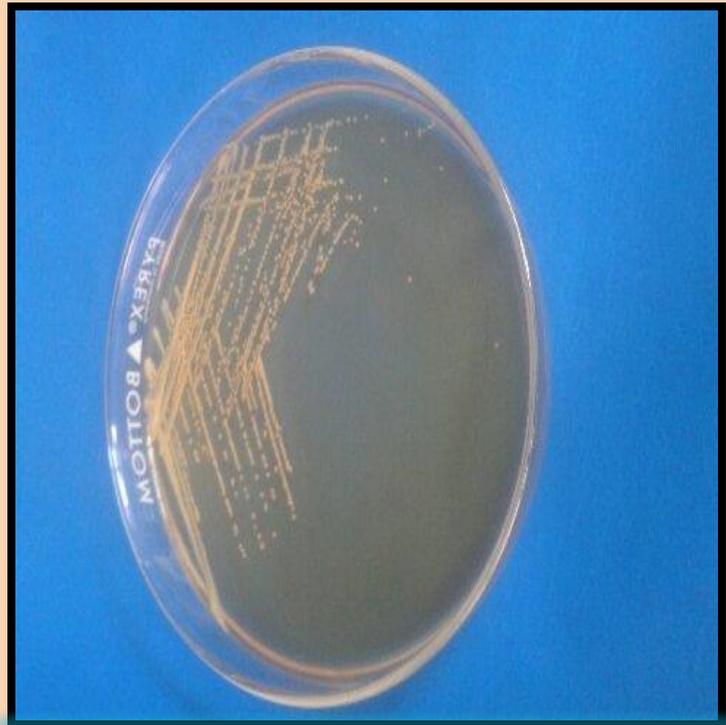


Foto 4.52. Agar Soya Tripticaseina. Colonias de *S. agalactiae*, Sembrado por estría cruzada

El Agar Soya Tripticaseina es un medio de cultivo no selectivo que facilita el desarrollo de microorganismos anaerobios facultativos, Gram positivos como el *Streptococcus agalactiae* por tener el medio entre sus componentes NaCl que mantiene el equilibrio osmótico, el fosfato dipotásico funciona como amortiguador de pH, la soya y la caseína proveen vitaminas, nitrógeno y carbono para permitir el crecimiento de colonias del microorganismo de color blanco pálido.

Streptococcus agalactiae

Morfología colonial

Cuadro 27	
Características	Agar Estreptosel
Color	Blanco
Tamaño	1-2 mm
Forma	Uniforme
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Opaca
luz transmitida	Traslucida
Consistencia	Mucoide
Otras	-----



Foto 4.53. Agar Estreptosel. Colonias de *S. agalactiae*, sembrado por estría cruzada

El agar Estreptosel es un medio de cultivo selectivo para la identificación del género *Streptococcus*. Entre sus componentes el medio de agar Estreptosel posee L-cistina, peptona de caseína y peptona de soya que aportan nutrientes al microorganismo para su desarrollo, la dextrosa es utilizada por el microorganismo como única fuente de Carbono, el Cloruro de Sodio mantiene la presión osmótica, la azida de sodio y el sulfito de sodio son inhibidores de microorganismos no deseados para permitir el crecimiento libre de *Streptococcus agalactiae*.

Streptococcus agalactiae

Morfología colonial

Tabla 27.	
Características	Agar Sangre de carnero al 5%
Color	Blanco
Tamaño	0-1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
luz transmitida	Transparente
Consistencia	Mucoide
Otras	β - Hemolisis



Foto 4.54. Agar Sangre de Carnero al 5%. Colonias de *S. agalactiae*, sembrado por estría cruzada

El Agar Sangre de Carnero al 5 % es un medio de cultivo que contiene infusión de musculo de corazón y peptona que otorgan al medio alto valor nutritivo, se encuentra enriquecido con vitaminas, enzimas y no contiene antibióticos para permitir el crecimiento de la mayoría de microorganismos como el *Streptococcus agalactiae* ya que su crecimiento en el medio produce una zona totalmente transparente alrededor de las colonias (β - hemólisis).

Tinción de Gram

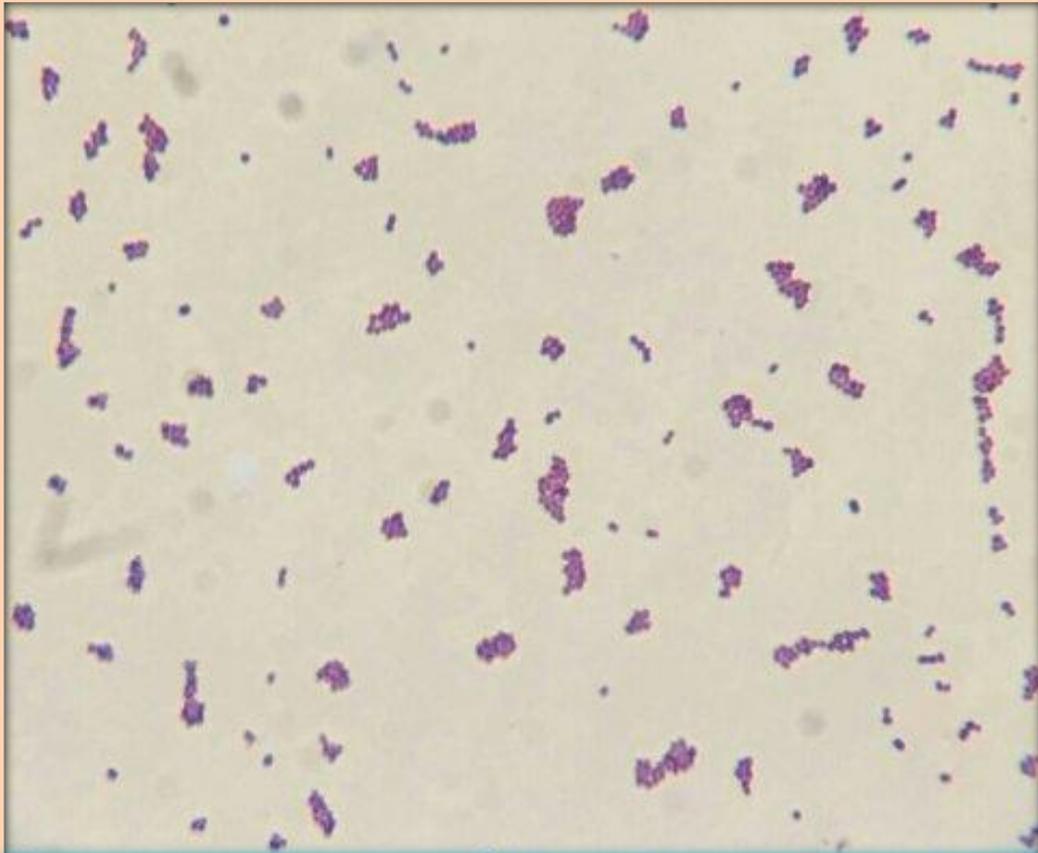


Foto 4.55 *Streptococcus agalactiae*. Gram Positivos. Cadenas largas que miden de 0.5-1 μm de dm

✓ Prueba de sensibilidad a Optoquina

Determina la sensibilidad de un microorganismo a la sustancia de Optoquina. La sensibilidad a Optoquina prueba la fragilidad de la membrana celular bacteriana.

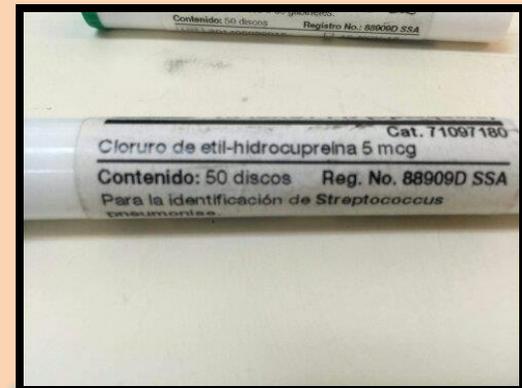
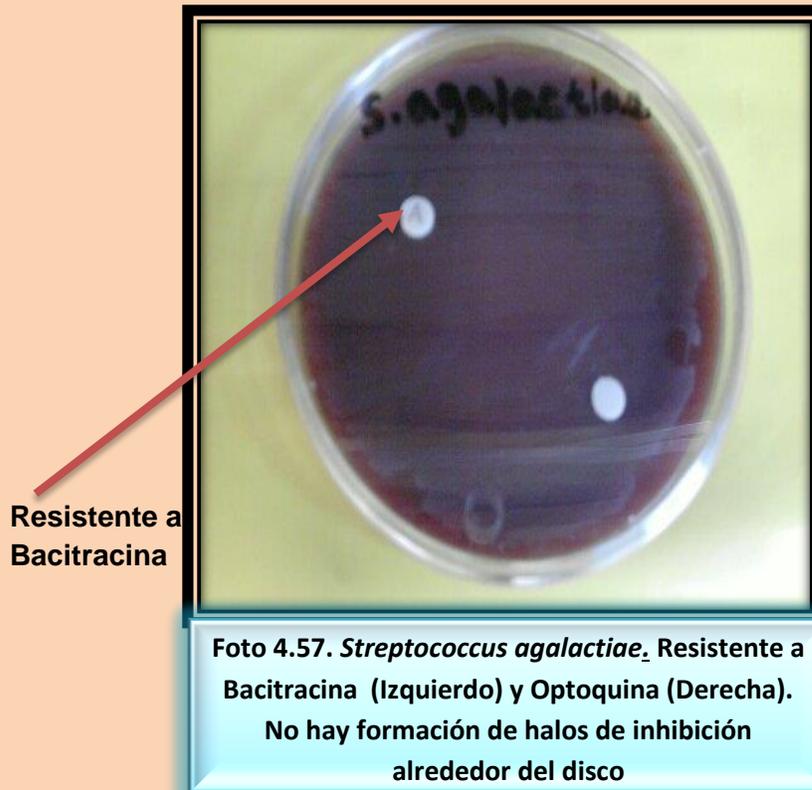


Foto 4.56. Paquete de Sensidiscos de Optoquina. Cada sensidisco está impregnado con alrededor de 0.02 mL de la sustancia de Optoquina

Resistente a Optoquina

Interpretación:

- ✓ En la prueba del sensidisco de **Bacitracina** se observa que no hay zona de inhibición por lo tanto la bacteria de *Streptococcus agalactiae* es resistente a Bacitracina.
- ✓ En la prueba del sensidisco de **Optoquina** se observa que no hay formación de halos de inhibición alrededor del sensidisco por lo tanto se considera que la bacteria es resistente a Optoquina.

Pruebas bioquímicas

Prueba de catalasa



- ✓ *Streptococcus agalactiae* no es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua más Oxígeno, debido que no posee la enzima de catalasa y por lo tanto no se observara formación de burbujas de O₂.

Reacción.



Resultados de pruebas bioquímicas en tubo de *Streptococcus agalactiae*

Cuadro 29	
Pruebas Bioquímicas. <i>Streptococcus agalactiae</i>	Resultados
1) TSI	A/A H ₂ S=(-)
2) MIO	Motilidad =(-) Indol=(-) Ornitina=(+)
3) SIM	Motilidad =(-) Indol=(-)
4) LIA	Descarboxilación de Lisina=(-) Desaminación de Lisina =(-) Fermentación de Glucosa(+)
5) Citrato de Simmons	Citrato=(-)
6) Urea de Crhistensen	Urea=(-)
7/8) RM/VP	RM=(-)/VP(+)

En el cuadro 29 se encuentran los resultados de la interpretación de pruebas bioquímicas de TSI, MIO, SIM, LIA Citrato de Simmons, Urea, RM-VP de *Staphylococcus agalactiae*.

Nota: El fundamento la composición del medio, resultados de referencia e interpretación del medio se encuentran en anexo.

A continuación se presentaran los resultados obtenidos de la parte experimental para la identificación bacteriana.

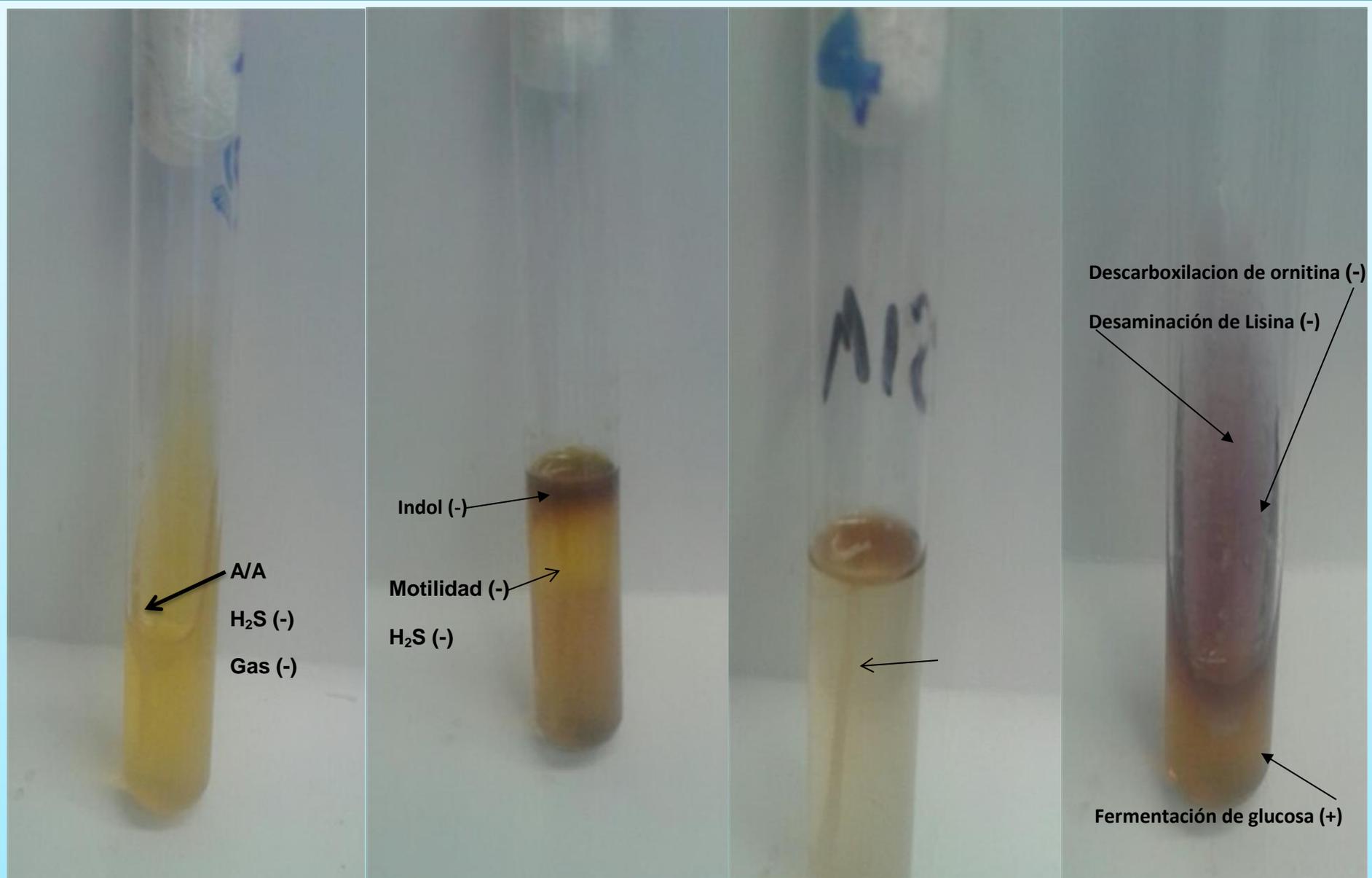


Foto. 4.59. Resultados de Pruebas Bioquímicas de TSI, MIO, SIM Y LIA

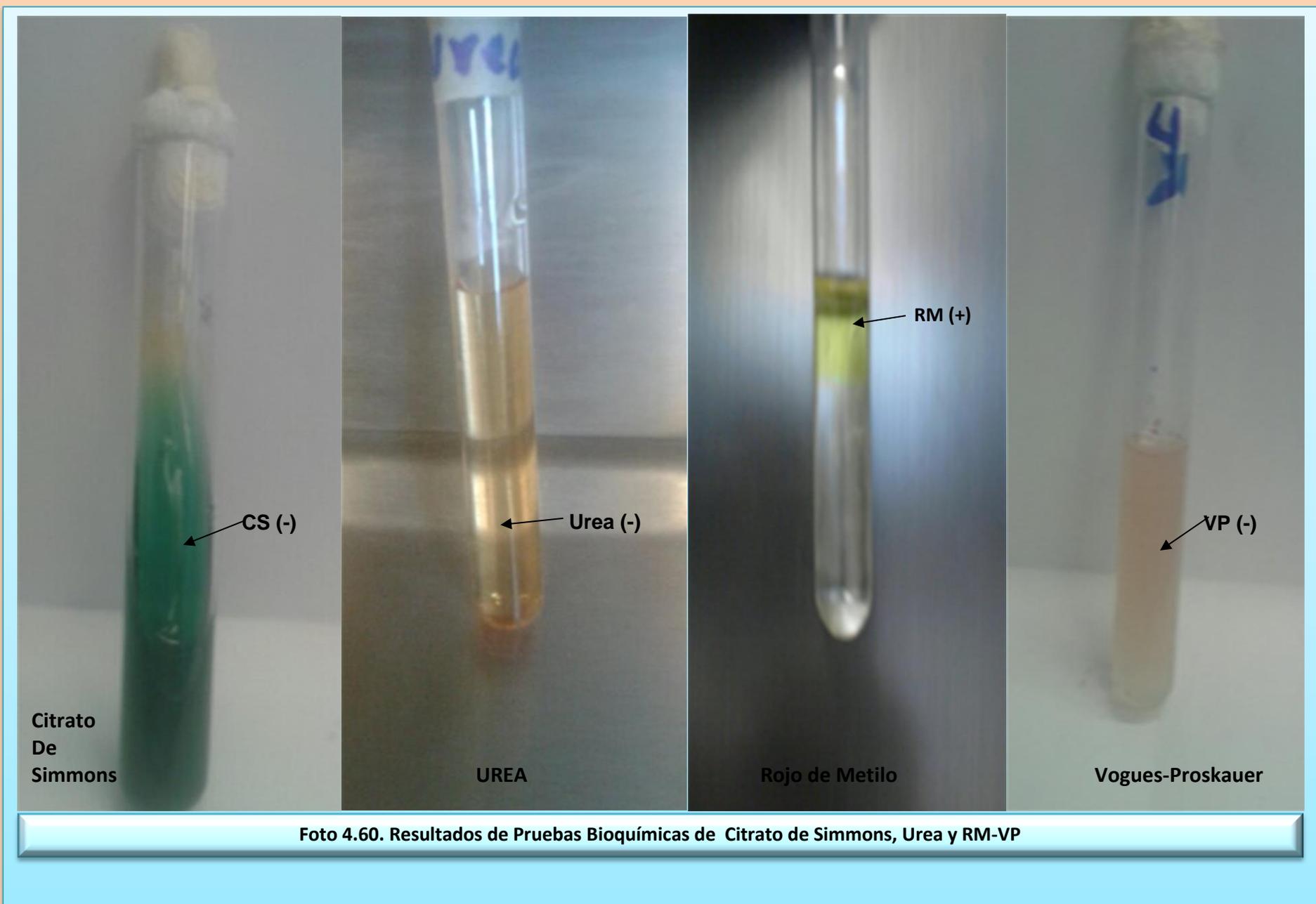


Foto 4.60. Resultados de Pruebas Bioquímicas de Citrato de Simmons, Urea y RM-VP

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae

Cuadro 30	
Caldo Rojo de fenol + Carbohidratos con Campana de Durham.	RESULTADOS
RF + Glucosa	F/ G
RF + Lactosa	F/ SG
RF + Xilosa	SF/ SG
RF + Manitol	SF/ SG
RF + Trehalosa	F/SG
RF + Sorbitol	SF/SG
RF + Maltosa	SF/SG

Interpretación:

F= Fermentación (Ácida-Amarillo).

SF= Sin fermentación (Alcalino-Rojo).

G= Producción de gas en campanas de Durham: CO₂ y H

SG= Sin producción de gas en campanas de Durham: CO₂ y H₂

Nota: Los carbohidratos se realizaron por duplicado

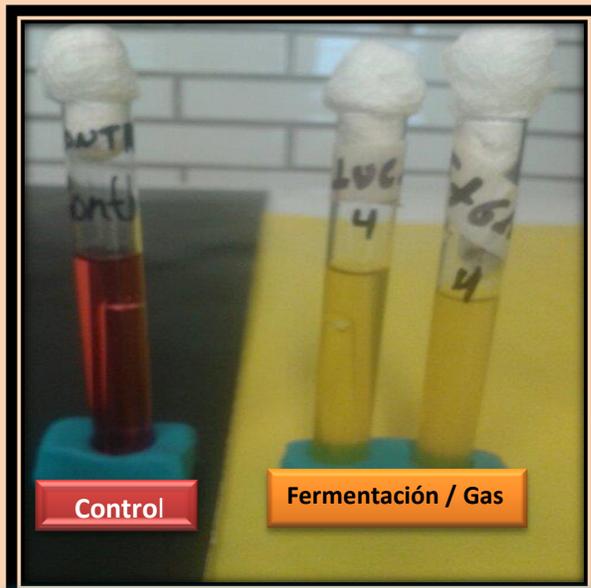


Foto 4.62. Rojo de Fenol + Glucosa con Campana de Durham. F/G

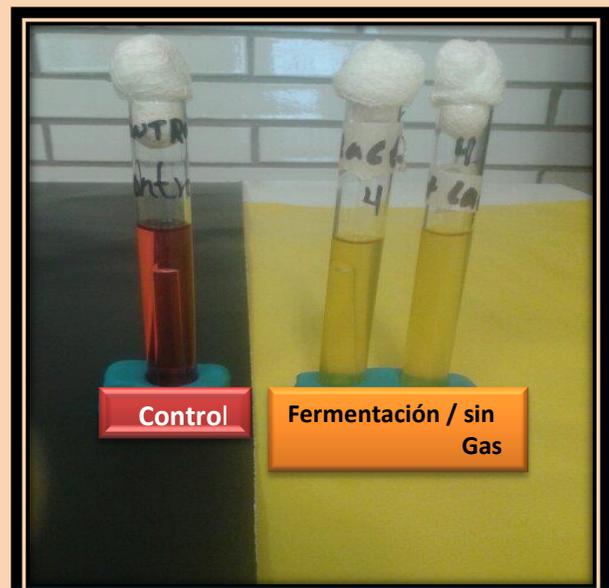


Foto 4.61. Rojo de Fenol + Lactosa con Campana de Durham. F/SG

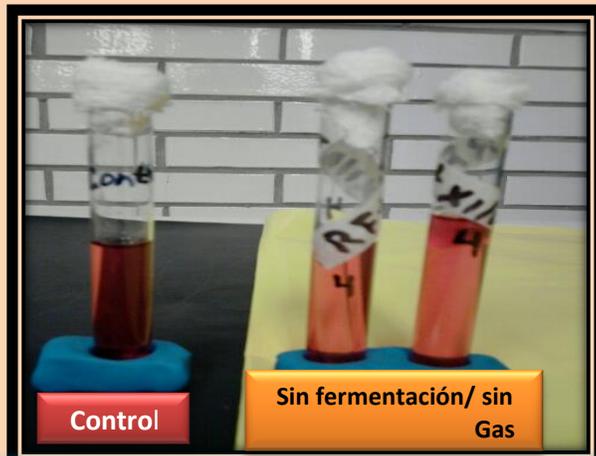


Foto 4.63. Rojo de Fenol + Xilosa con Campana de Durham. SF/SG



Foto 4.64. Rojo de Fenol + Manitol con Campana de Durham. SF/SG

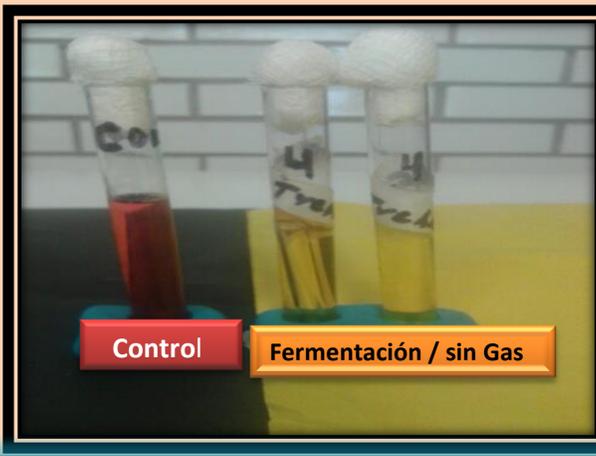


Foto 4.65. Rojo de Fenol + Trahalosa con Campana de Durham. F/SG



Foto 4.66. Rojo de Fenol + Sorbitol con Campana de Durham. SF/SG



Foto 4.67. Rojo de Fenol + Maltosa con Campana de Durham. SF/SG

ANEXOS



Anexos

Técnica

1- En un portaobjetos limpio realizar un frotis delgado de la cepa y dejar secar al aire y después fijar el frotis pasándolo 3-4 veces de la llama de un mechero



FOTO 5.68 Esterilización de asa para preparación de frotis bacteriano

2- Colocar el frotis sobre un soporte para tinción y cubrir la superficie con colorante cristal violeta durante un minuto

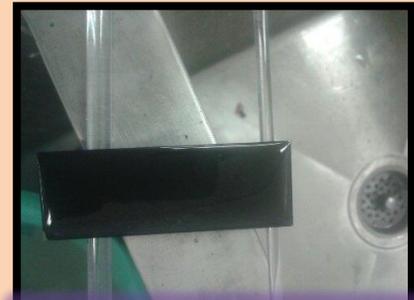


FOTO 5.69 Cristal Violeta (Colorante primario)

3- Después escurrir y lavar con H₂O corriente



FOTO 5.70 Lavado con agua Corriente

- 4- Cubrir con Yodo de lugol el portaobjetos durante un minuto



FOTO 5.71 Yodo de Lugol (Mordente)

- 5- Escurrir y lavar con H₂O corriente

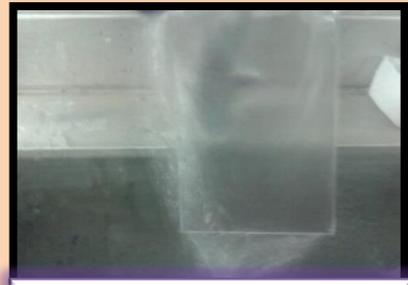


FOTO 5.72 Lavado con H₂O corriente

- 6- Colocar unas gotas del decolorante Alcohol-Acetona durante 15 segundos



FOTO 5.73 Alcohol- Acetona (Decolorante)

- 7- Posteriormente se lava con H₂O corriente y colocar otra vez sobre el soporte de tinción



FOTO 5.74 Lavado con H₂O corriente

- 8- Llenar hasta el tope con colorante de contraste safranina durante un minuto



FOTO 5.75 Safranina
(Contraste)

- 9- Escurrir y lavar con H₂O corriente y colocar en posición vertical el preparado para que drene el exceso de agua

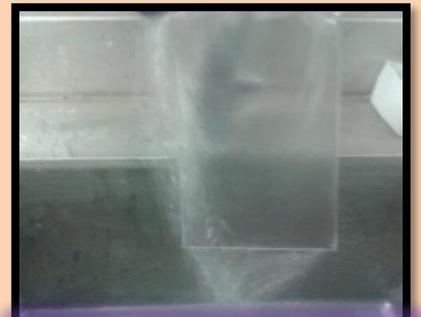


FOTO 5.76 Lavado con H₂O
corriente

- 10- Observar la preparación en microscopio óptico a una inmersión de 10x, 40x y 100x (con aceite de cedro).^{51,52}

Prueba de Coagulasa

Coagulasa Libre (Prueba de coagulasa tubo)

- 1- Tomar una muestra sanguínea en tubo con EDTA y centrifugar a 3000 rpm para obtener plasma
- 2- Colocar 0.5 ml. de plasma en un tubo estéril
- 3- Añadir 0.5 ml de un cultivo puro en caldo de *Staphylococcus aureus* y mezclar suavemente por rotación
- 4- Colocar en baño maría a 37°C por 2 horas. Y leer la prueba cada 30 min

Interpretación:

- 3- Prueba positiva: Formación de un coágulo visible
- 4- Prueba negativa: No se observa formación de coágulo

S. epidermidis. Coagulasa
Negativo



S. aureus.
Formación de
coágulo

Foto 5.77. *S. aureus*. Coagulasa
positivo

- **Prueba de sensibilidad a Bacitracina**

Determina la sensibilidad de Bacitracina (0.04 U) de los *Streptococcus* del grupo A. Se realiza preferentemente sobre la placa de agar sangre donde se encuentren colonias de *Streptococcus* de forma pura. Se utilizan sensidiscos de Bacitracina comúnmente de un pH ácido.

Interpretación:

La zona de inhibición es de 9mm alrededor del sensidisco. (Sensible).

Se considera resistente si NO se observa halo de inhibición alrededor del sensidisco.

- **Prueba de Optoquina.**

La Optoquina es soluble en agua y se difunde con rapidez en el medio de agar sangre. Por lo tanto los discos de papel impregnado de Optoquina pueden colocarse directamente sobre la superficie del agar sangre para realizar la prueba.

Interpretación:

La zona de inhibición es de 14 mm, o más alrededor del sensidisco de Optoquina.

Se considera resistente si NO se observa halo de inhibición alrededor del sensidisco.

Prueba de CAMP (Christie, Atkins y Munch-Petersen)

La identificación principal de los *Streptococcus* del grupo B se puede realizar a través de la prueba de CAMP.

La actividad hemolítica de la β -lisina *estafilocócica* sobre los eritrocitos es incrementada por un factor extracelular producido por los *Streptococcus* del grupo B denominado factor de CAMP.

La prueba de CAMP se realiza efectuando una siembra única de los *Streptococcus* perpendicular a una siembra de *S. aureus* productora de β -Lisina. Las dos líneas de siembra no deben tocarse y debe incubarse en atmósfera ambiental. En una prueba positiva la zona de lisis aumentada toma la forma de una “Cabeza de flecha” en la unión de las dos líneas de siembra.

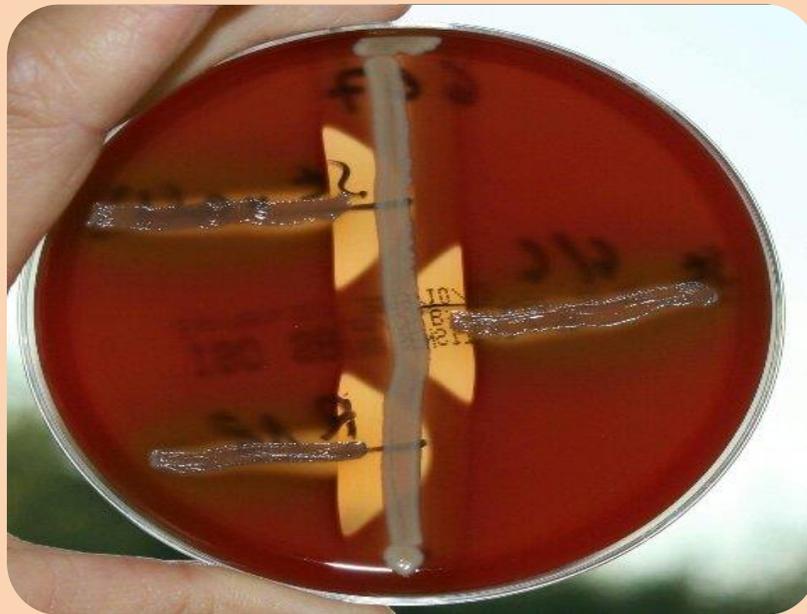


Foto 5.78. Prueba de CAMP. Formación de Cabeza de Flecha (Sinergismo)

Pruebas Bioquímicas

Catalasa

Comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias que contienen citocromo ya que descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.



Método:

- 1) Transferir una colonia bien aislada con el asa hacia el centro de un portaobjetos
- 2) Añadir 2 a 3 gotas de peróxido de Hidrógeno al 3% y homogenizar la mezcla
- 3) Observar la formación o no formación de burbujas de O_2



Foto 5.79. Catalasa positivo. Formación de burbujas de O_2

TSI (Triple azúcar Hierro)

Son medios sólidos que se esterilizan con vapor a presión de 15 lbs, a una temperatura de 110°C x 15 min. Se deja solidificar en posición inclinada. Se inoculan por picadura en el centro del tubo hasta las $\frac{3}{4}$ partes del mismo y se siembra por estría abierta en la superficie.

Composición del medio TSI entre sus componentes:

3 Hidratos de Carbono.....Glucosa 0.1 %

Lactosa 1 %

Sacarosa 1%

Producto de azufreMezcla de peptonas

Indicador de pH.....Rojo de Fenol

Acido (amarillo) 6.8, Neutro (Naranja) 7.0 y alcalino (Rojo) 8.0

Indicadores.....Tiosulfato de sodio
y citrato férrico de amonio

Fermentación de Carbohidratos

Cuando el fondo como la superficie del cultivo cambia de naranja a color amarillo, esto indica como la glucosa, como la lactosa y la sacarosa fueron degradados, aeróbica como anaeróbicamente, a ácidos terminales, los cuales al ser detectados por el indicador Rojo de fenol, viran el color del medio de naranja a amarillo.

Los gases que se forman por la fermentación de glucosa y sacarosa son el CO₂ y H₂, estos se pueden observar por la formación de burbujas en la pared del tubo o bien por el desprendimiento completo del medio de cultivo dentro del tubo.

II) Determinación del ácido Sulfhídrico

La bacteria fermenta los carbohidratos produciendo ácidos terminales que acidifican el medio y hacen reaccionar el tiosulfato de sodio produciendo ácido sulfhídrico, el cual es un gas incoloro: por lo tanto es necesario un segundo indicador para detectarlo de forma visible, para lo tanto se utiliza el citrato Férrico de Amonio, para producir un sulfuro Ferroso (Fes) que es un **precipitado Negro insoluble**, que se observa fácilmente.

Reacción:

Bacteria medio ácido + Tiosulfato \longrightarrow H₂S (g) ácido Sulfhídrico

H₂S incoloro + Iones de Fierro \longrightarrow Fes negro + H₂.

NOTA: Algunas bacterias producen mucho H₂S que pueden ocultar la acides del medio (color amarillo) por lo tanto, si hay producción de H₂S indica que también existe una condición acida en caso de que la bacteria sea productora de acides.

Interpretación:

1-Fermentación de glucosa solamente

- a) En pico flauta: reacción alcalina rojo
- b) Capa profunda: reacción acida (color amarillo)

2)-Fermentación como glucosa y lactosa

- a) Pico flauta: color amarillo
- b) Capa profunda: color amarillo

3)-No fermentación de glucosa ni lactosa

- a) Pico flauta : rojo (reacción alcalina)
- b) Capa profunda: no hay cambio de color

4)- Producción de Gas:

- a) Producción de gases de CO₂ y H₂.

Se manifiesta por una sola burbuja de gas formada en el medio o puede haber en las paredes del tubo ruptura del medio.

5).Producción de ácido Sulhídrico (H₂S)

- a) Se forma un precipitado negro en el medio solido en tubo.

El precipitado negro puede ocultar la acidez (color amarillo) del medio solido por lo tanto se puede reportar como acidez positivo aun cuando no se observe en caso de que la bacteria sea capaz de producir acidez.

MIO (Movilidad Indol Ornitina)

Es un medio semisólido se esteriliza con vapor a presión de 15 lbs, y a una temperatura de 121°C x 15 min. Se deja solidificar en posición vertical, se inocula por picadura en el centro del tubo hasta las $\frac{3}{4}$ partes de longitud de la columna y se extrae rápidamente.

Este medio diferencial tiene un triple fin:

- I) **Determinar la motilidad del medio**
- II) **Determinar si la bacteria produce Indol**
- III) **Determinar la descarboxilación de Ornitina**

Composición del medio:

Fuente de triptófano.....Peptona de gelatina y caseína 1.2g

Fuente de Ornitina.....Ornitina

Indicador de pH.....Purpura de Bromocresol.

Amarillo (ácido) 5.2, Neutro (Purpura Intenso) 6.5, Alcalino (Purpura amarillento)

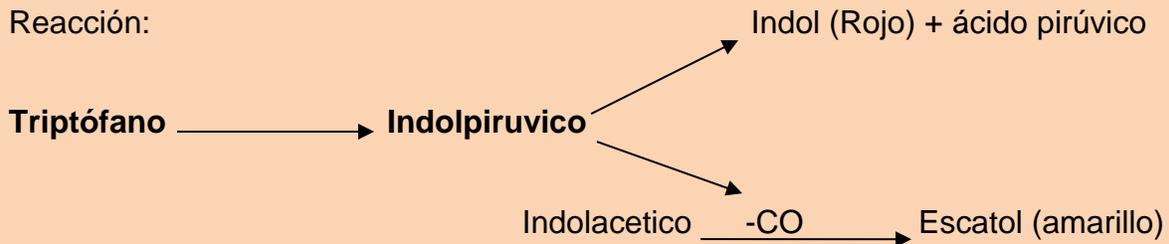
Indicador de pH.....Reactivo de Kovacs

- I) **Prueba de Motilidad.**

Algunas bacterias tienen movimiento propio debido a la presencia de flagelos. La motilidad o movimiento del microorganismo se puede observar en el tubo por una turbidez difusa en el seno del medio de cultivo, considerando la prueba positiva.

II) Prueba de Indol

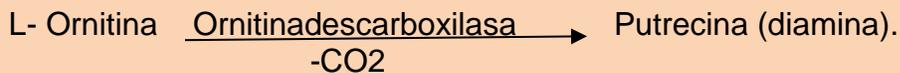
Esta prueba diferencial se basa en la degradación del triptófano (aminoácido) a indolpiruvico, el cual puede seguir dos caminos:



III) Descarboxilación de la Ornitina

La descarboxilación de origen microbiano es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas, son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (COOH).

Reacción:



Interpretación de resultados

✓ **Color amarillo:** Descarboxilación de Ornitina a putrecina

✓ **Indol:**

Positivo: Color rojo Quinona en la superficie del anillo.

Negativo: Color amarillo en la superficie del anillo.

✓ **Motilidad:**

Positivo: Turbidez difusa en todo el medio

Negativo: Turbidez solo en punción

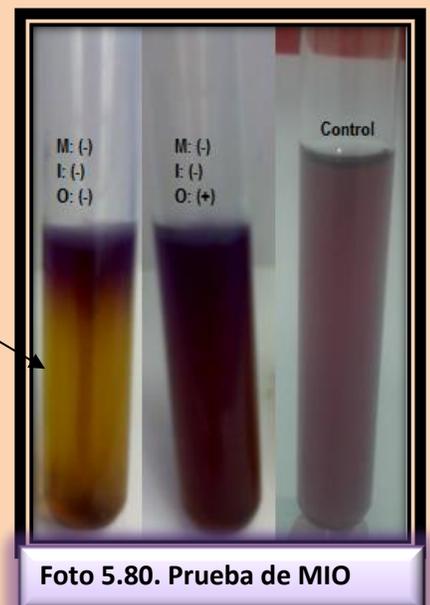


Foto 5.80. Prueba de MIO

Medio de SIM (Movilidad, Indol, Ácido Sulhídrico)

Es un medio semisólido que se esteriliza con vapor a presión de 15 lbs, y a una temperatura 121°C x 15 min. Se deja solidificar en posición vertical y se inocula por picadura hasta las $\frac{3}{4}$ partes.

Este medio diferencial tiene un triple fin:

- I) **Determinar la producción de ácido Sulhídrico**
- II) **Determinar si la bacteria produce Indol**
- III) **Determinar la motilidad del microorganismo**

Entre los componentes del medio son:

Indicadores de H₂S.....Tiosulfato de sodio, FeS y

Citrato férrico de amonio

Indicador..... Reactivo de Kovacs.

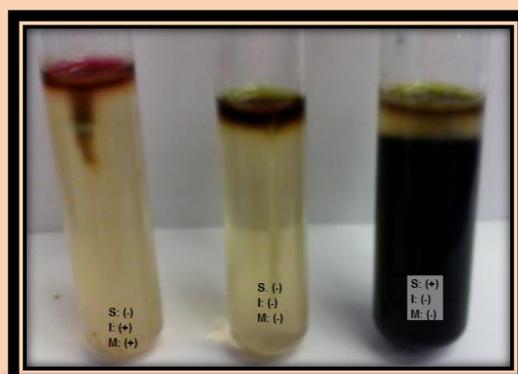


FOTO 5.81.Prueba de SIM

✓ La interpretación de esta prueba se dio en los medio TSI Y MIO

Medio de LIA (Agar Lisina Hierro)

Este medio sólido se esteriliza a presión de vapor a 15 lbs, a 121°C x 15 min. Se deja solidificar en forma inclinada se inocula por picadura y por estría abierta en superficie.

Este medio diferencial tiene un doble fin:

- I) Determinar la desaminación de Lisina**
- II) Determinar la descarboxilación de Lisina**

Composición del medio:

Fuente de Carbono.....Glucosa

Fuente de Lisina.....Lisina

Catalizador de la actividad enzimática.....Piridoxal

Indicador de pH.....Purpura de Bromocresol
Ácido (amarillo) pH 5.2, Neutro (Purpura intenso), alcalino (Purpura amarillo apagado).

Interpretación:

La L-lisina es un aminoácido que se descarboxila en CADAVERINA más CO₂, por la acción de la enzima descarboxilasa.

Reacción:



La cadaverina es un producto estable en condiciones anaerobias el cual alcaliniza el medio. El indicador purpura de bromocresol detecta el cambio y vira el color del medio a purpura amarillento apagado (se considera prueba LIA positiva).

La desaminación de lisina es desaminada por la acción de la enzima Lisina dehidrolasa dando como productos un ácido orgánico + amoníaco.

Reacción:



Al ser detectados estos productos por el indicador purpura de bromocresol, el medio vira de color purpura a color rojo-naranja en la superficie y en el fondo amarillo. Consideramos esta prueba como desaminación de Lisina positiva.

Interpretación de resultados:

Prueba positiva:

Pico flauta:

- a) Purpura turbio (Descarboxilación de lisina).
- b) Capa profunda: amarillo claro (fermentación de glucosa solamente)
- c) Desaminación de Lisina: Pico flauta rojo

Prueba negativa:

Sin cambio de color permanece purpura



Prueba de Citrato de Simmons

Es un medio sólido que se esteriliza con presión a vapor a 15 lbs. Y a una temperatura de 121°C por 15 min. Se deja solidificar en posición inclinada, se inocula por picadura estría abierta.

Esta prueba nos sirve para detectar si el microorganismo es capaz de utilizar el Citrato como única fuente de carbono.

Composición del medio:

Algunas de sus componentes del medio son:

Fuente de carbono.....Citrato de sodio

Fuente de Nitrógeno.....Monofosfato de amonio

Fosfato de amonio

Indicador de pH.....Azul de bromocresol

Ácido (amarillo), Neutro (verde), alcalino (azul).

Interpretación:

Reacción positiva:

- Color azul intenso en pico flauta
- Crecimiento de colonias en la superficie pico flauta, aun cuando no presente cambio de color verde a azul intenso.

Reacción Negativa: Sin cambio de color, ni crecimiento de colonias en pico flauta.



Foto 5.83. Prueba de Citrato de Simmons

PRUEBA DE CALDO UREA

La Urea es un medio líquido que se esteriliza por FILTRACIÓN, debido a que la urea es termolábil, se inocula el medio agitando el asa con la muestra durante unos segundos dentro del tubo o bien se inclina el tubo y se inocula sobre la pared del mismo, se retira el asa y se vuelve a colocar el tubo en posición vertical.

Esta prueba sirve para detectar si el microorganismo es capaz de desdoblar la Urea.

Composición del medio:

Factor de crecimiento.....Extracto de levadura

Fuente de Nitrógeno.....Urea

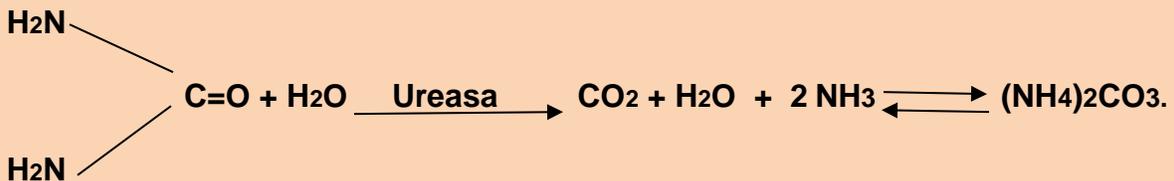
Indicador de pH.....Rojo de Fenol

Acido (amarillo), Neutro (amarillo), alcalino (Rojo-rosado).

Interpretación:

El sustrato Urea es una diamina del ácido carbónico a la que frecuentemente se le menciona como carbamida.

La hidrolisis de la urea es catabolizada por la enzima específica, ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución la urea hidroliza dando el carbonato de amonio como producto final.



Interpretación de resultados:

Reacción positiva: Color rojo-rosado en todo el caldo

Reacción negativa: No hay cambio de color y el medio se conserva amarillo

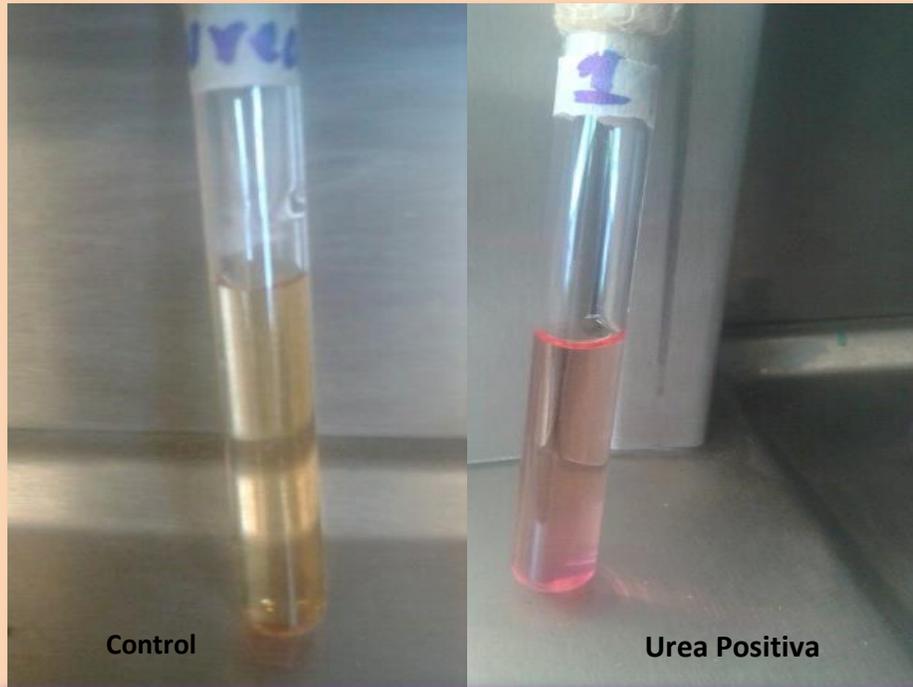


Foto 5.84. Prueba de Urea de Christensen

Rojo de Metilo - Vogues Proskauer. (RM-VP)

Es un medio líquido que se esteriliza con vapor a presión a 15 lbs, a 121°C x 15 min. Se inocula por agitación y se pone en posición vertical.

Por un lado el **rojo de metilo** es un indicador de pH para determinar la concentración de iones Hidronio (H_3O^+) presentes en un organismo cuando fermenta la glucosa. Por otro lado el **Vogues-Proskauer** Determina si la bacteria es capaz de producir ACETILMETILCARBINOL (Acetoina) que es un producto neutro derivado del metabolismo de la glucosa.

Composición del medio líquido:

Fuente de carbonoGlucosa

Fuente de nitrógeno.....Peptona

Amortiguadores de pH.....Fosfato de potasio y Monofosfato
de Amonio

Indicador de pH.....Rojo de fenol

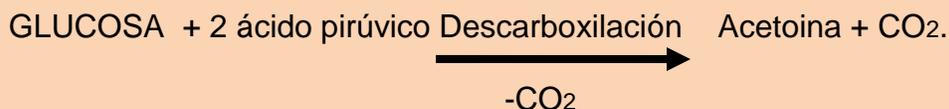
Reactivos:

Intensificador de color.....Naftol 50%

Agente Oxidante.....Hidróxido de Potasio al 40%

La acetoina (acetilmetilcarbinol) se obtiene de la descarboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico.

Reacción:



En la utilización de reactivos en la acetoina se agrega α -Naftol (0.6 mL) el cual actúa únicamente como intensificador de color, Al agregar KOH al 40%. (2 a 3 gotas) se acelera la oxidación de la acetoina a diacetilo, esta reacción con el núcleo de guanidinia-Arginina que hay en la peptona y junto con el α -naftol da una reacción de color rosa de 3 a 5 min. Intensificando después a los 30 minutos a rojo intenso.

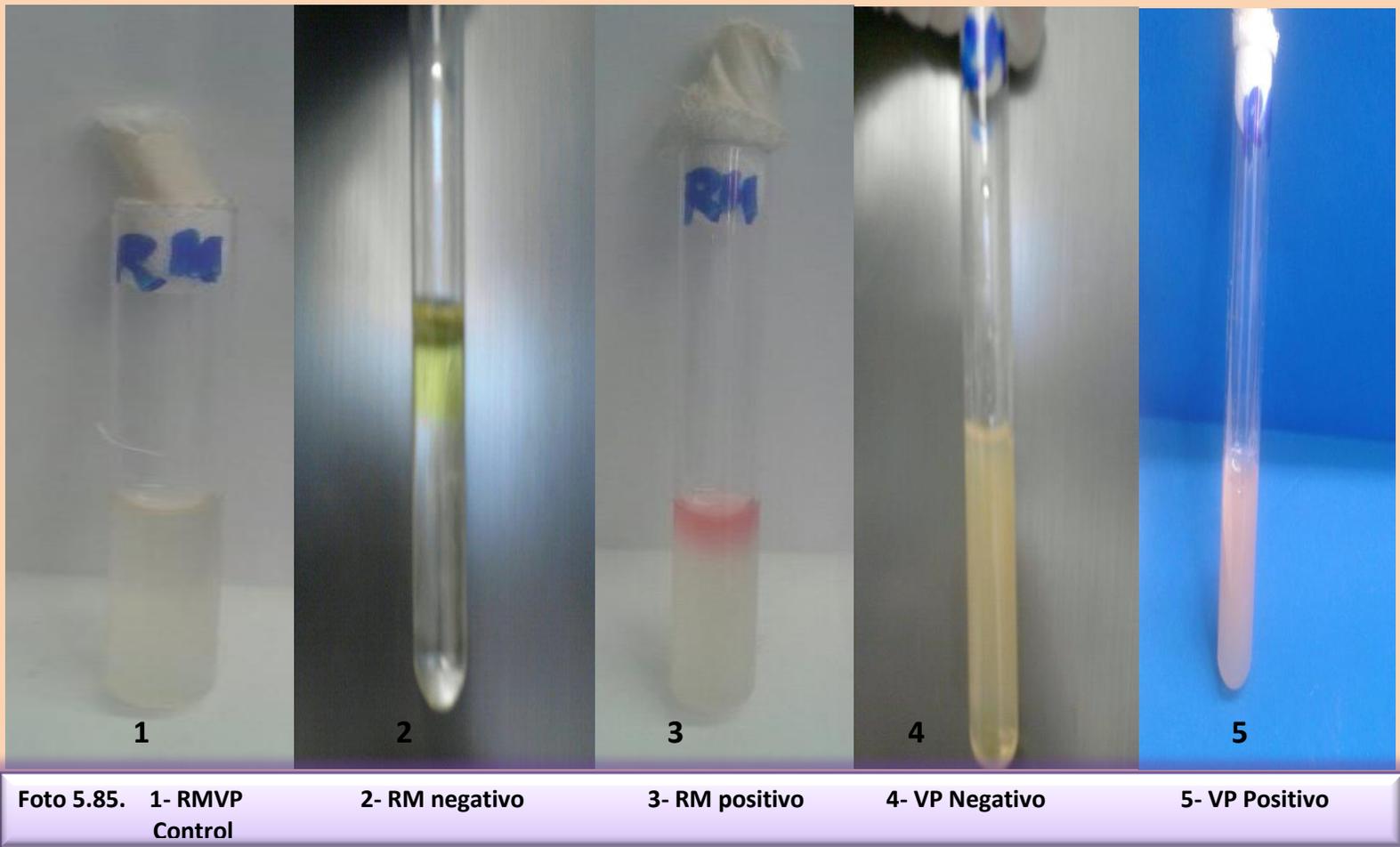
Interpretación:

Reacción positiva VP: La presencia de color rosado en superficie indica presencia de acetoina.

Reacción negativa VP: Se observa el color amarillo cobrizo en la superficie del medio indica que solo se mezclaron los reactivos.

Reacción positiva de RM: Se observa un color rojo en la superficie del medio

Reacción Negativa RM: Color amarillo en la superficie del medio. pH 6



FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

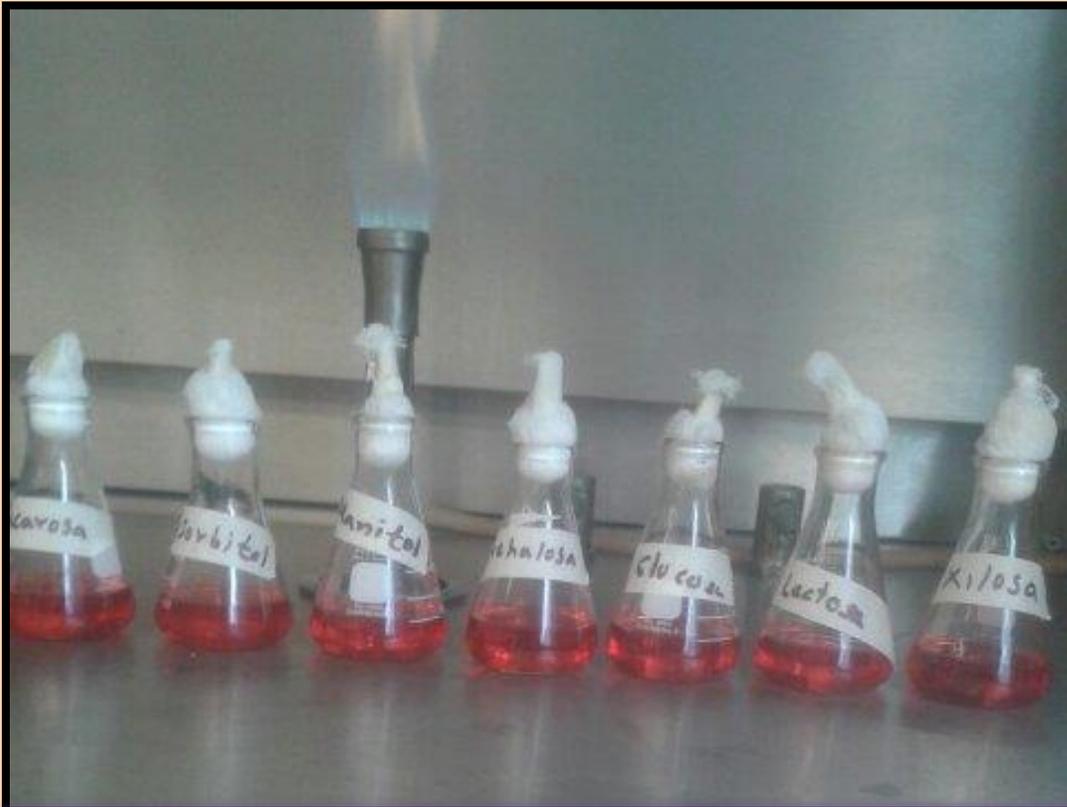


Foto 5.86. Preparación de 8 Carbohidratos (RF + glucosa, RF + Lactosa, RF + Sacarosa, RF + Xilosa, RF + Manitol, RF + Sorbitol. RF + Trehalosa y RF + Maltosa)

- **Rojo de Metilo + Carbohidratos con campana de Durham invertida**

Principio:

Determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un Hidrato de Carbono específico, también de gas visible en campana de Durham invertida.

Los carbohidratos en medios líquidos, que contienen dentro del tubo campana de Durham invertida se esterilizan a presión de vapor en autoclave a 110°C x 15 minutos (esto debido a que los carbohidratos son termolábiles). Se colocan en

posición vertical y se inoculan por agitación por unos segundos y luego se incuban a 37°C x 24 a 48 horas.

La fermentación de carbohidratos es un proceso metabólico anaerobio de óxido-reducción en el cual un sustrato orgánico actúa como el aceptor final de Hidrógeno (aceptor de electrones en lugar de oxígeno).

Las bacterias que fermentan un hidrato de carbono por lo común son anaerobias facultativas y los productos finales de cada carbohidrato utilizado varía según la especie bacteriana, por lo que depende del sistema enzimático de cada especie y de las condiciones ambientales.

Medio líquido: Cuando se utiliza un medio líquido con hidrato de carbono. La campana de Durham por lo común se coloca en posición invertida solo en el tubo con glucosa, si un microorganismo es capaz de producir gas a partir de glucosa, esto indica que también se producirá gas en la mayoría de carbohidratos utilizados. Sin embargo se sabe que si el microorganismo utilizado no fermenta la glucosa, es aconsejable agregar campanas de Durham a otros tubos con hidratos de carbono con el objetivo de asegurar de que la bacteria no es capaz de fermentar dichos carbohidratos.^{49, 52}

Interpretación:

- ✓ **Fermentación del carbohidrato (positivo):** Color amarillo (acidez) del medio líquido
- ✓ **Sin Fermentación del carbohidrato (Negativo):** Color rojo del medio líquido
- ✓ **Producción de Gas:** Formación de burbujas dentro de la campana de Durham
- ✓ **Sin producción de Gas:** No hay formación de burbujas dentro de la campana de Durham

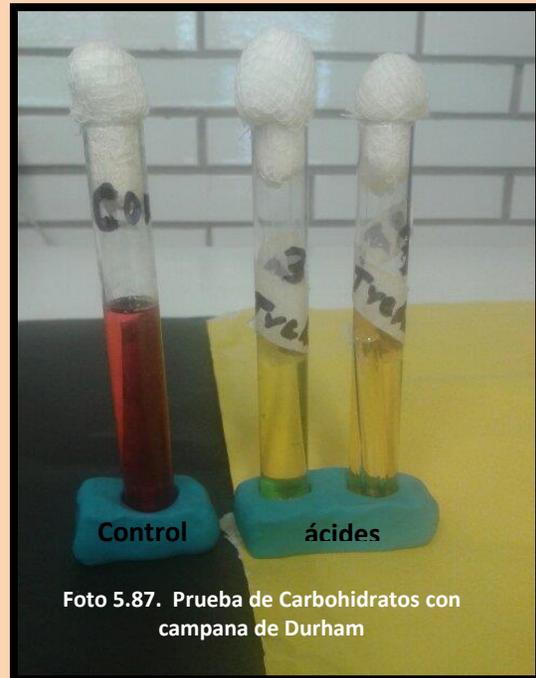


Foto 5.87. Prueba de Carbohidratos con campana de Durham

REFERENCIAS

1. Paul de Kruif. Los cazadores de microbios. 1^a ed. México: editorial Panamericana; 2005
2. García R. Química Industrial. 7^a. Ed. México: ENCB-IPN; 2008
3. James M. Microbiología moderna en los alimentos. 3^a ed, España: Editorial Interamericana; 2007
4. Boourgeois. C. Microbiología alimentaria. 2^a ed. Editorial Acribia, España. 2009
5. Moreno B. Microbiología industrial. 3^a ed, Editorial, panamericana, México. 2013
6. Finegold. Introducción a la Microbiología. 1^a ed; E.U.A: Editorial interamericana, 2009.
7. Madigan C. Microbiología. 3^a ed. México: Editorial Hispanoamericana; 2010
8. Brooks. Microbiología medica de Jewentz. 3^a ed. E.U.A: Editorial. Preston; 2013
9. Escanga. La célula bacteriana. 3^a ed. E.U.A: Editorial Limusa; 2012
10. Hinojosa R. Estructuras Bacterianas. 4^a ed. México. Editorial panamericana; 2010
11. Visille. Célula Procariota. 5^{ta} ed. E.U.A: Editorial Belmont: 2012
12. Jewetz. Microbiología Médica. 3^{ra} ed. E.U.A: Editorial Panamericana; 2009
13. Honter G. Genética Bacteriana. 5^a ed. E.U.A: Editorial prestón; 2010
14. Jerry. Microbiología Molecular. 6^a ed. Canadá: Editorial Trea: 2009
15. Rojas-Espinoza. Inmunología de Memoria. 4^a ed México: Editorial Panamericana; 2007
16. Baker. Técnicas de laboratorio de microbiología, 2^a ed .México: Editorial Lemus; 2012

17. Janeway. Microbiología experimental. 2ª ed. E.U.A: Editorial Prantice Mc Graw Hill; 2009
18. Roger P. Inmunología experimental. 5ª ed. Editorial interamericana. E.U.A. 2012
19. Varela G., Grotiuz G. Fisiología y metabolismo bacteriano. 3ª ed. México: Editorial trilla; 2013
20. James M, Jay. Microbiología. 3ª ed. España. Editorial Panamericana; 2011
21. Royer. Bacteriología Clínica: 8ª ed. México: Editorial Medica panamericana; 2010
22. Madigan F. Biología de los microbios. 10ª ed. México: Editorial Kamus; 2010.
23. PML. Diccionario de especialidades de laboratorio de análisis clínicos. 8ª ed. Canadá: Editorial Panamericana; 2012
24. Romero H. Manual de bacteriología Experimental. 2ª ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2012
25. Adams. Tipos de siembra microbiológica. 3ª ed. Colombia Editorial Panamericana; 2009
26. Baker .F.K. Técnicas microbiológicas. 3ª ed. Madrid: Editorial Lemus; 2013.
27. BIDICO. Medios de cultivo. [Bidico on line]. [Citado 8 de abril del 2009].
Consulta: 3-marzo-2016. Disponible en: <http://www.dibico.com/productos.html>.
28. Tory. Bacteriología experimental y técnicas microbiológicas. 3ª ed. E.U.A. 2006
29. Becton DC. Medios de cultivo. [Becton on the internet]. [Citado 2 de mayo del 2013]. Consulta: 5-marzo-2016. Disponible en:
http://www.medicaexpo.es/prod/merck-millipore/ProductDetail&utm_medium.html.

30. Antimicrobianos contra epidemiologías. [microbes on the internet]. [Citado 23 de marzo del 2015] consulta: 17-marzo-2016. Disponible en:
<http://Agentesantimicrobianos.com.html>.
31. Harry´s. Tratamiento epidemiológicos bacterianos. [microbiology on the internet]. [Citado 14 de julio del 2013]. Consulta: 2-abril-2016. Disponible en:
<http://www.botanical-online.com/antibacteriano.html>
32. Farret. Genética bacteriana. [microbial world on the internet]. [Citado 1 de agosto del 2015]. Citado: 8-abril-2016. Disponible en:
<http://www.GeneticaBacteriana.es/genmic/curso%20microbiologigenetica%20general/11-metodos%20analiticos>.
33. Jetti. La revolución de los antimicrobianos. 5ª ed. E.U.A: Editorial parras; 2015
34. Cabrera E., Gómez R., Zuñiga A. la resistencia de bacterias a antibióticos, Antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de Supervivencia y adaptación. Colombia Médica. Vol. 38 No. 2; 2009
35. Luján D. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina asociado a la Comunidad: Aspectos epidemiológicos y moleculares. Fac. Méd. 2015
36. Aragüés M, González A. Infecciones cutáneas primarias por *stafilococcus* y *streptococcus*. 4ª ed. EU.A: Editorial panamericana; 2006
37. Guzmán Coronado BJ. *Staphylococcus* de importancia Clínica. 4ª ed. México: Editorial Médica panamericana; 2008
38. Brock. Microbiología Médica. 5ª ed. E.U.A: Editorial trillas; 2005
39. Gubbay L, Ellis A. Infecciones por *Staphylococcus* y *Streptococcus* en Pediatría: frecuencia de los distintos *Streptococcus*. IMC; 1994

40. Zarate R. Gonzales G tejedor. Enfermedad severa invasiva por *Streptococcus* del grupo Lancefield; 3^a ed; Editorial Panamericana; 2008.
41. Troy. *Streptococcus* de importancia clínica y epidemiológica. [microbiology on the internet]. [Citado 9 de enero del 2010]. Consulta: 9-abril-2016
Disponible en:
<http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/APUN-Streptococcus.pdf>.
42. Murray. M. Microbiología médica. 6^a ed. España: Elsevier; 2009
43. Kinston. *Streptococcus* de importancia. 3^a Ed. E.U.A: Editorial Médica Panamericana; 2009
44. García F. *Streptococcus* de importancia clínica. 1^a ed. Canadá: Editorial Trillas; 2015
45. Velázquez R. *Streptococcus* del grupo de Lancefield. México 2^a ed. Editorial Interamericana; 2010
46. Ochoa G. Tratado de *Estreptococos* hemolíticos. [microbes on the internet] [Citado 6 de marzo del 2012].Consulta 12-abril-2016. Disponible en:
<http://www.Streptococcushemoliticos.patogenos.html>.
47. Ramírez J. Historia de Lancefield. [microbiology line]. [Citado 9 de diciembre del 2014]. Consulta: 23-mayo-2016. Disponible en:
<https://www.cienciasbiologicas.com.html>
48. <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/colorantes.html>.2016.
49. <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b2/pruebasbioquimicas.html>.2013.
50. <http://www.britanialab.com/esp/productos/b02/Mediosdecultivo.html>.2014.
51. Mac Faddin, J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3^a ed. México: Editorial Médica panamericana; 2003

REFERENCIAS DE FIGURAS

- 1) Figura 1.1 Antoni Van Leeuwenhoek. Disponible en:
<https://micro.magnet.fsu.edu/optics/timeline/people/leeuwenhoek.html>
- 2) Figura 1.2. Antibióticos. Disponible en:
<http://www.creacionismo.net/genesis/Art%C3%ADculo/la-resistencia-de-las-bacterias-los-antibi%C3%B3ticos>
- 3) Figura 1.3. Industria Cervecera y Vinatera. Disponible en:
<http://www.nytimes.com/es/2015/10/15/la-estrategia-detras-de-la-fusion-entre-anheuser-busch-inbev-y-sabmiller-los-dos-gigantes-de-la-cerveza/>
- 4) Figura 1.4. Célula Procariota. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/maritzajohanna2/conferencia-3-celula-bacterianafisiologia-bacteriana-copia>
- 5) Figura 1.5. Capsula Bacteriana. Disponible en:
<http://revistaavances.com/secuenciados-los-genes-responsables-de-la-produccion-de-capsula-en-haemophilus-parasuis/>
- 6) Figura 1.6. Citoplasma bacteriano. Disponible en:
<http://www.biologiacitoplasma.edu.ar/bacterias/micro3.htm>
- 7) Figura 1.7. Pared Celular. Disponible en:
<https://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/Pared+celular+gram>
- 8) Figura 1.8. Glucocaliz. Disponible en:
<https://www.Estructurasbacterianas.html.mx>
- 9) Figura 1.9. Clasificación de Flagelos. Disponible en:
https://www.Flagelos_bacterianos.com/scene/757491499460984832
- 10) Figura 1.10. Fimbrias y Pili. Disponible en:
<http://www.Paredcelular,estructurasexternas.net/post/cienciaeducacion/9952613/Genetica-Bacteriana.html>

- 11) Figura 1.11. Genoma bacteriano. Disponible en:
<http://www.ADNbacter.net/post/ciencia-educacion/3/Genetica-Bacteriana.html>.
- 12) Figura 1.12. Membrana citoplasmática. Disponible en:
<http://www.anatolandia.com/2014/05/membrana-plasmatica-celula.html>
- 13) Figura 1.13. Mesosoma Septal. Disponible en:
<http://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/Mesosoma>
- 14) Figura 1.14. Ciclo de endosporas bacterianas. Disponible en:
<http://www.google.com.mx/search?q=cicloendosporas&tbm>
- 15) Figura 1.15. Grafica de tasa de crecimiento bacteriano. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/biologiaibc/nutricion-cultivo-y-crecimiento-microbiano>
- 16) Figura 1.16. Tasa de crecimiento en respuesta a diferentes temperaturas. Disponible en:
<http://www.Microbiologiacrecimientobacter/13agfisicos.htm>.
- 17) Figura 1.17. pH bacteriano para su crecimiento. Disponible en:
<http://www.Microbiologia.edu.ar/bacterias/nutric~2.htm>
- 18) Figura 1.18. Célula en solución isotónica. Disponible en:
<http://www.Celula+en+solución+isotonica&tbm>
- 19) Figura 1.19. Fijación de N₂ en solución isotónica. Disponible en:
<http://www.Fijación de Nitrógeno. com/curso-microbiologia-organismos-2-2/microbiologia-aislar-bacterias>
- 20) Figura 1.20. Medios de Cultivo deshidratados. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/dianamolinao/medios-d-cultivo>
- 21) Figura 1.21. Medios de cultivo según su origen. Disponible en:
<http://wwwmedios-de-cultivos>
- 22) Figura 1.22. Medios de cultivo según su consistencia. Disponible en:
<http://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiología/índice/preparación-de-medios-de-cultivo>

- 23) Figura 1.23. Medios de cultivo complejos. Disponible en:
<http://www.mercantillab.com.pe/categoriaproducto/microbiologia/medios-de-cultivo/>
- 24) Figura 1.24. Componente de un medio de cultivo complejo.
Disponible en:
<http://www.saquear.net23.net/16804/mediosdecultivo.html>
- 25) Figura 1.25. Agar sal y manitol. Disponible en:
<http://bacteriologia.blogspot.mx/2011/12/estafilococo-patogeno-staphylococcus.html>
- 26) Figura 1.26. Diferenciación de colonias bacterianas. Disponible en:
<http://microbiologia501.blogspot.mx/>
- 27) Figura 1.27. Siembra por estría cruzada. Disponible en:
<https://microrosa.wikispaces.com/file/view/Siembra+PRACT5.pdf>
- 28) Figura 1.28. Método de vaciado en placa. Disponible en:
<http://microedufun.blogspot.mx/2014/10/tecnicas-de-vaciado.html>
- 29) Figura 1.29. Método por dilución para aislado de colonias.
Disponible en:
<https://www.google.com.mx/search?q=metodo+por+dilucion&tbm>.
- 30) Figura 1.30. Siembra bacteriana por picadura. Disponible en:
<http://microbiologia/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>
- 31) Figura 1.31. Siembra por Inoculación. Disponible en:
<http://labdemicrobiologia.wix.com/scientist-site>
- 32) Figura 1.32. Inoculación por agitación. Disponible en:
<http://www.Tipos de siembra. %C3%ADa/medio>
- 33) Figura 1.33. Crecimiento de colonias en agar sangre. Disponible en:
<http://paratecnicosdelaboratorio.blogspot.mx/p/galeriafotografica.html>

- 34) Figura 1.34. Morfología colonial. Disponible en: [http://www. Tipos de coloniasF/identificacao-bacterias](http://www.Tipos de coloniasF/identificacao-bacterias)
- 35) Figura 1.35. Tipos de hemolisis en agar sangre de carnero. Disponible en: <http://paratecnicosdelaboratorio.blogspot.mx/p/galeria-fotografica.html?view=snapshot>
- 36) Figura 1.36. Colorantes ácidos y básicos. Disponible en: <http://microbiologiavip.blogspot.mx/2012/02/cuestionario-tinciones.html>
- 37) Figura 1.37. Tinción de Gram. Disponible en: http://www.123rf.com/photo_38530457_gram-staining-gram-positive-cocci.html
- 38) Figura 1.38. Tinción de BAAR. Disponible en: <http://T.BAAR/tropical/contenido/capitulo5/capitulo37/figuras/37-0003-es.html>
- 39) Figura 1.39. Tinción Negativa. Disponible en: <http://bioimagenesT.negativa.bioucm.es/galerias/bacterias>.
- 40) Figura 1.40. Tinción de Rojo Congo. Disponible en: <http://www.T.congo.org/7congreso/trabajoexperimentaldelaboratorio>.
- 41) Figura 1.41. Tinción de Leiffson. Disponible en: <http://1014quimicalocomocion.blogspot.mx/>
- 42) Figura 1.42. Tinción de Seaffer- Fulton. Disponible en: <https://www.google.com.mx/search?q=seaffer-fulton>.
- 43) Figura 1.43. Tinción de Granulos metacromaticos. Disponible en: http://www.corynebacterium_micro/sesiones/Gram_archivos/morfo.html.
- 44) Figura 1.44. Morfología bacteriana. Disponible en: <http://Morfologia Colonial. u1-t3-morfologa-bacteriana-aranguren-yudy-martnez-emilio-ivarez-isabel-2014>.

- 45) Figura 1.45. Agrupación de cocos. Disponible en:
<http://tecnicasbacteriologicasbasicas.blogspot.mx/2009/09/morfologia-y-estructura-bacteriana.html>
- 46) Figura 1.46. Pruebas Bioquímicas Manuales Api. Disponible en:
<http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/LabV/API/api.html>
- 47) Figura 1.47. Sistema automatizado microscan. Disponible en:
<http://www.quimilabmexico.com/microscan.html>
- 48) Figura 1.48. Cinética exponencial. Disponible en:
<http://microbiologia.blogspot.mx/2014/10/curva-del-crecimiento.html>
- 49) Figura 1.49. Esterilización por calor húmedo autoclave. Disponible en:
<http://www.medicalhs.com/esterilizadores/historia/>
- 50) Figura 1.50. Ultrapasteurización. Disponible en:
<http://metodologia2011.blogcindario.com/2011/05/index.html>
- 51) Figura 1.51. Estufa por calor seco. Disponible en:
<http://instrumentosdelaboratorio.org/estufa-de-laboratorio>
- 52) Figura 1.52. Esterilización por filtración. Disponible en:
<http://quimicaterceroliceo42.blogspot.mx/2012/05/metodos-de-separacion-de-fases.html>
- 53) Figura 1.53. Endosporas de Clostridium. Disponible en:
<http://www.Endosporas microbiol/farma3/bacterio teoricas.html>
- 54) Figura 1.54. Esterilización ionizante. Disponible en:
<http://Esterilización.net/jackelinegarcia/radiacion-ionizante>.
- 55) Figura 1.55. Radiación ultravioleta. Disponible en:
<http://www.ecured.cu/Radiaci%C3%B3n ultravioleta>
- 56) Figura 1.56. Bacteria lisada de *E. coli*. Disponible en:
<http://www.cdc.gov/ecoli/>
- 57) Figura 1.57. Experimento de Frederick Griffin. Disponible en:
<http://www.Frederickgriffin.pr.gov.br/portals/cadernos/pde/pdebusca/>

- 58) Figura 1.58. Transferencia de información genética. Disponible en: <http://es.slideshare.net/diegomaier/genetica-gacteriana>
- 59) Figura 1.59. Conjugación bacteriana. Disponible en: <http://www.geneticabacteriana.net/fmedin1/bacterias>
- 60) Figura 1.60. Transducción bacteriana. Disponible en: <http://es.slideshare.net/trecemicro/genetica-bacteriana>
- 61) Figura 1.61. Bacteriófago en conjugación lisogénica. Disponible en: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagos.htm>
- 62) Figura 1.62. Antibióticos. Disponible en: <http://revistaactual.com.mx/cuidado-con-los-antibioticos/>
- 63) Figura 2.1. *Staphylococcus*. Disponible en: <https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus>
- 64) Figura 2.2. *Staphylococcus* tipos de hemólisis. Disponible en: http://bacteriologia.blogspot.mx/2011_12_01_archive.html
- 65) Figura 2.3. Estructura antigénica de *Staphylococcus*. Disponible en: <http://es.slideshare.net/joelsack/staphylococcus-y-otros-cocos-gram-positivos>
- 66) Figura 2.4. Mecanismo de acción de proteína A de *S. aureus*.
Disponible en: <http://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus/>.
- 67) Figura 2.5. Lesiones en la piel causada por *Staphylococcus*.
Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica>.
- 68) Figura 2.6. Impétigo causada por *S. aureus*. Disponible en: http://farmacias-medicinasalud.blogspot.mx/2011_11_01_archive.html.

- 69) Figura 2.7 Formación de absceso en piel. Disponible en:
<http://www.infectologiapediatrica.com/blog/2010/11/absceso-cutaneo-piel-y-tejidosblandos/>.
- 70) Figura 2.8. Síndrome de piel escaldada. Disponible en:
<http://dermas.info/?derma=sindrome-piel-escaldada-estafilococo>
- 71) Figura 2.9. Síndrome de Shock Tóxico. Disponible en:
<https://STTS.Staphylococcus aureus infección.net>
- 72) Figura 2.10. Infecciones causadas por *Staphylococcus*.
Disponible en: <http://infeccionstaphylococcusmx/2013/08/impetigo-una-epidemia-en-el-verano.html> .
- 73) Figura 2.11. Cultivo faríngeo, Nasal y Vaginal. Disponible en:
<http://clnicos189.blogspot.mx/2013/04/toma-de-muestra-y-cultivo-de-exudado.html>
- 74) Figura 3.1 *Streptococcus*. Disponible en:
<http://www.bacteriainphotos.com/beta-hemolytic-streptococcus.html>
- 75) Figura 3.2. Rebeca Cralling Lancefield. Disponible en:
[http://www.ecured.cu/Rebecca Craighill Lancefield](http://www.ecured.cu/Rebecca_Craighill_Lancefield)
- 76) Figura 3.3. Micrografía de *Streptococcus pyogenes* del grupo A.
Disponible en: <http://www.gettyimages.es/detail/foto/streptococcus-pyogenes>
- 77) Figura 3.4. Micrografía de *Streptococcus agalactiae* del grupo B.
Disponible en: <http://www.gettyimages.es/detail/foto/streptococcus-agalactiae>
- 78) Figura 3.5. Micrografía de *Streptococcus Dysgalactiae* del grupo C.
Disponible en:
<http://www.gettyimages.es/detail/foto/streptococDysgalactiae>.
- 79) Figura 3.6. Micrografía de *Enterococcus* del grupo D. Disponible en:
<http://www.gettyimages.es/detail/foto/enterococcus>
- 80) Figura 3.7. Micrografía de *Streptococcus anginosus* del grupo F.
Disponible en: <http://www.gettyimages.es/detail/foto/S.anginosus>

- 81) Figura 3.8. Micrografía de *Streptococcus sanguis* del grupo H. Disponible en: <http://www./photo/streptococcus-sanguis-high-res- stock>.
- 82) Figura 3.9. Micrografía de *Streptococcus pneumoniae*. Disponible en: https://www.Streptococcus_pneumoniae.html.
- 83) Figura 3.10. Micrografía de *Streptococcus mutans*. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_pneumoniae
- 84) Figura 3.11. Colonias de *Streptococcus* β -hemolíticos en ASC al %. Disponible en: <http://www.bacteriainphotos.com/beta-hemolytic-streptococcus.html>
- 85) Figura 3.12. Estructura antigénica de *Streptococcus*. Disponible en: http://www.losmicrobios.com.ar/microbios/?page_id=1349
- 86) Figura 3.13. Mecanismo de acción de proteína M de *Streptococcus*. Disponible en: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/449/2/Fiebre-reumatica>
- 87) Figura 3.14 Antígenos proteicos de sustancia M,T y R. Disponible en: <http://es.slideshare.net/antares2000a/aclase-antigenos-micro-2014>
- 88) Figura 3.15. Toxina eritrogenica. Disponible en: <https://www.saludymedicinas.com.mx/centros-de-salud/dolor-fiebre/esquemas/escarlatina.html>
- 89) Figura 3.16. Prueba cuantitativa de antistreptolisina. Disponible en: <http://www.laboratoriomledesma.com/2011/03/analisis-de-antiestreptolisinas-aslo.html>.
- 90) Figura 3.17. Estreptolisina O y S. Disponible en: <http://www.medicinabc.com/2013/01/las-caracteristicas-del-estreptococo.html#axzz4CueGWTIQ>.

Fotografías de *Staphylococcus* y *Streptococcus* de importancia clínica tomadas en laboratorio 1 planta alta de la UMIEZ

FOTO 4.1 Agar Sal y Manitol. Colonias de *S. aureus*

FOTO 4.2 Agar S-110. Colonias de *S. aureus*

FOTO 4.3 Agar Soya Trypticaseina. Colonias de *S. aureus*

FOTO 4.4 Agar Sangre de Carnero al 5 %. Colonias de *S. aureus*

FOTO 4.5 *Staphylococcus aureus*. Tinción de Gram

FOTO 4.6 *Staphylococcus aureus*. Prueba de catalasa

FOTO 4.7 Resultados de pruebas bioquímicas de *Staphylococcus aureus*
TSI, MIO, SIM LIA

FOTO 4.8 Resultados de pruebas bioquímicas de *Staphylococcus aureus*
Citrato de Simmons, Urea, RM-VP

FOTO 4.9 Prueba de Coagulasa en tubo de *S. aureus*

FOTO 4.10 Prueba de Coagulasa en placa de *S. aureus*

FOTO 4.11 RF + Glucosa con campana de Durham

FOTO 4.12 RF + Lactosa con campana de Durham

FOTO 4.13 RF + Manitol con campana de Durham

FOTO 4.14 RF + Xilosa con campana de Durham

FOTO 4.15 RF + Sorbitol con campana de Durham

FOTO 4.16 RF + Trehalosa con campana de Durham

FOTO 4.17 RF + Maltosa con campana de Durham

FOTO 4.18 Agar Sal y Manitol. Colonias de *S. epidermidis*

FOTO 4.19 Agar S-110. Colonias de *S. epidermidis*

FOTO 4.20 Agar Soya Trypticaseina. Colonias de *S. epidermidis*

FOTO 4.21 Agar Sangre de Carnero al 5 %. Colonias de *S. epidermidis*

- FOTO 4.22** *Staphylococcus epidermidis*. Tinción de Gram
- FOTO 4.23** Prueba de Catalasa. *S epidermidis*
- FOTO 4.24** Resultados de pruebas bioquímicas de *Staphylococcus epidermidis*
TSI, MIO, SIM LIA
- FOTO 4.25** Resultados de pruebas bioquímicas de *Staphylococcus epidermidis*.
Citrato de Simmons, Urea, RM-VP
- FOTO 4.26** RF + Glucosa con campana de Durham.
- FOTO 4.27** RF + Lactosa con campana de Durham
- FOTO 4.28** RF + Xilosa con campana de Durham
- FOTO 4.29** RF + Manitol con campana de Durham
- FOTO 4.30** RF + Sorbitol con campana de Durham
- FOTO 4.31** RF + Trehalosa con campana de Durham
- FOTO 4.32** RF + Maltosa con campana de Durham
- FOTO 4.33** AST. Colonias de *S. pyogenes*
- FOTO 4.34** Agar Chocolate. Colonias de *S. pyogenes*
- FOTO 4.35** Agar Estreptosel. Colonias de *S. pyogenes*
- FOTO 4.36** Agar Sangre. Colonias de *S. pyogenes*
- FOTO 4.37** Tinción de Gram *S. Pyogenes*
- FOTO 4.38** Streptococcus pyogenes. Sensible a Bacitracina
- FOTO 4.39** Paquete de Sensidiscos de Bacitracina (0.04 unidades)
- FOTO 4.40** *Streptococcus Pyogenes*. Prueba de Catalasa
- FOTO 4.41** Resultados de pruebas bioquímicas de *Streptococcus pyogenes*
TSI, MIO, SIM LIA
- FOTO 4.42** Resultados de pruebas bioquímicas de *Staphylococcus pyogenes*.
Citrato de Simmons, Urea, RM-VP
- FOTO 4.43** RF + Glucosa, con Campana de Durham

- FOTO 4.44** RF + Lactosa, con campana de Durham
- FOTO 4.45** RF + Xilosa, con campana de Durham
- FOTO 4.46** RF + Manitol, con campana de Durham
- FOTO 4.47** RF + Sorbitol, con campana de Durham
- FOTO 4.48** RF + Trehalosa, con campana de Durham
- FOTO 4.49** RF + Maltosa, con campana de Durham
- FOTO 4.50** Prueba de CAMP
- FOTO 4.51** Agar Casman. Colonias de *S. agalactiae*
- FOTO 4.52** Agar Soya Trypticaseina. Colonias de *S. agalactiae*
- FOTO 4.53** Agar Estreptosel. Colonias de *S. agalactiae*
- FOTO 4.54** Agar Sangre de Carnero al 5%. Colonias de *S. agalactiae*
- FOTO 4.55** *Streptococcus agalactiae*. Gram Positivos. Cadenas Largas
- FOTO 4.56** Paquete de Sensidiscos de Optoquina
- FOTO 4.57** *Streptococcus agalactiae*. Prueba de Sensibilidad a Bacitracina
(Bac) y Optoquina (Opt)
- FOTO 4.58** *Streptococcus agalactiae*. Prueba de catalasa
- FOTO 4.59** Resultados de pruebas bioquímicas de *Streptococcus agalactiae*
TSI, MIO, SIM LIA
- FOTO 4.60** Resultados de pruebas bioquímicas de *Staphylococcus agalactiae*
Citrato de Simmons, Urea, RM-VP
- FOTO 4.61** RF + Glucosa con Campana de Durham
- FOTO 4.62** RF + Lactosa con Campana de Durham
- FOTO 4.63** RF + Manitol con Campana de Durham
- FOTO 4.64** RF + Xilosa con Campana de Durham
- FOTO 4.65** RF + Trehalosa con Campana de Durham

FOTO 4.66 RF + Sorbitol con campana de Durham

FOTO 4.67 RF + Maltosa con campana de Durham

ANEXOS.

FOTO 5.68 Esterilización de asa para Preparación de frotis

FOTO 5.69 Cristal violeta (Colorante primario)

FOTO 5.70 Lavado con agua corriente

FOTO 5.71 Yodo de lugol (Mordente)

FOTO 5.72 Lavado con agua corriente

FOTO 5.73 Alcohol- Acetona (Decolorante)

FOTO 5.74 Lavado con agua corriente

FOTO 5.75 Safranina (Contraste)

FOTO 5.76 Lavado con agua corriente

FOTO 5.77 *S. aureus*. Prueba coagulasa positivo

FOTO 5.78 Prueba de CAMP

FOTO 5.79 Prueba de catalasa positivo. Formación de burbujas de Oxígeno

FOTO 5.80 Prueba Bioquímica de MIO

FOTO 5.81 Prueba Bioquímica de SIM

FOTO 5.82 Prueba Bioquímica de LIA

FOTO 5.83 Prueba Bioquímica de Citrato de Simmons

FOTO 5.84 Prueba de Urea de Christensen

FOTO 5.85 Prueba Bioquímica de RM/VP

FOTO 5.86 Preparación de 8 Carbohidratos

FOTO 5.87 Prueba control de Carbohidratos Campana de Durham.