

Medios de Cultivo para Enterobacterias.



*LIC. EDUARDO ANTONIO VALDÉS
RAMOS, MSC.*

*Instituto de Medicina Tropical
Pedro Kouri*

Objetivos



- Conocer el funcionamiento de los principales medios de cultivo utilizados en el aislamiento e identificación de las enterobacterias.

Medio de transporte



- Preparación no nutriente , semisólida muy reductora que inhibe las reacciones enzimáticas autodestructoras dentro de las células y también previene los efectos de la oxidación, manteniendo las muestras en status quo.
- **No hay multiplicación de microorganismos.**

Medio de transporte de Cary-Blair

- Transportar muchos agentes patógenos entéricos bacterianos, incluidos aislamientos de *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio cholerae*.
- La consistencia semisólida facilita el transporte.
- El medio preparado puede ser almacenado a temperatura ambiente hasta 1 año.
- Debido a su alto pH (8,4), es un medio de elección para el transporte y la preservación de *V. cholerae*.



Medios de Transporte



- El agua de peptona alcalina puede utilizarse para el transporte de *V. cholerae*, pero este medio es inferior al de Cary-Blair y debe utilizarse solamente cuando el último no esté disponible.
- **El agua de peptona alcalina no debe utilizarse si el subcultivo va a demorarse más de 6 horas desde el momento en que se obtuvo la muestra**, porque hay otros microorganismos que pueden crecer por sobre los vibrios después de 6 horas.
- El tampón (*buffer*) de salina glicerol (BSG), que es el medio de transporte que se utiliza para *Shigella*, no es apropiado para transportar aislamientos de *V. cholerae*.
- Las desventajas adicionales del tampón de salina glicerol son que este solamente se puede utilizar 1 mes después de haber sido preparado y, por ser un medio líquido, es más dado a derramarse o desparramarse durante el transporte.

Colocación de las heces en el medio de transporte



- Enfríe el medio de transporte durante 1 a 2 horas en un refrigerador o caja nevera antes de utilizarlo.
- Obtenga una pequeña cantidad de heces insertando en ellas un hisopo de punta de algodón estéril o de poliéster y rotándolo.
- Inserte inmediatamente el hisopo que contiene material fecal dentro del medio de transporte.
- Empuje el hisopo completamente hasta el fondo del tubo del medio de transporte.
- Rompa la parte superior del palillo con los dedos y deséchelo.
- Ponga nuevamente la tapa de rosca en el tubo del medio de transporte y ciérrela bien.
- Coloque el tubo en el refrigerador o en la caja nevera.

Medios de Enriquecimiento



Contiene agentes físicos o químicos que suprimen el crecimiento de microorganismos no deseados y facilita el crecimiento de un tipo microorganismo.

- ✓ Caldo Selenito (biselenito de sodio)
- ✓ Agua de Peptona Alcalina (pH, NaCl)
- ✓ Caldo GN (desoxicolato de sodio y citrato de sodio)
- ✓ Caldo Tetracionato (Tetracionato)

Caldo Selenito

- Inhibe el crecimiento de las bacterias entéricas coliformes y enterococos durante las 6-12 h de incubación.
- No inhibe *Salmonella* sp.,
Proteus sp. ni
Pseudomonas sp.



Agua de Peptona Alcalina

Inhibidores:

- pH 8,4 – 8,6
- NaCl 1 %

Inhibe el crecimiento de la flora acompañante durante las 6 h de incubación



Medios de Aislamiento



- MacConkey (Agar Violeta Rojo Bilis, XLD. Eosina Azul de Metileno EAM).
- Agar Desoxicolato (Agar Desoxicolato Citrato ADC)
- Agar SS (Agar Sulfito Bismuto, Agar entérico de Hektoen)
- Agar TCBS

MacConkey

Carbohidrato

- Lactosa 1 %

Inhibidores

- Cristal violeta → Gram+ (Enterococos)
- Sales biliares → Gram+ (Enterococos)

Indicador pH

- Rojo neutro → rojo (pH ácido)



Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

Carbohidratos

- Xilosa 0.35 %
- Lactosa, sacarosa 0.75 %
- Lisina 0.5 % (LDC)

Inhibidores

- Sales biliares → Gram+
- (Enterococos)
- Tiosulfato de Sodio → Coliformes
- Citrato de Sodio → Coliformes

Indicador pH

- Rojo fenol

Indicador H₂S

- Citrato de amonio ferrico III



Agar SS

Carbohidrato

- Lactosa 1 %

Inhibidores

- Sales biliares → Gram+ (Enterococos)
- Tiosulfato de Sodio → Coliformes
- Citrato de Sodio → Coliformes
- Verde Brillante → Coliformes

Indicador pH

- Rojo neutro → rojo (pH ácido)

Indicador H₂S

- Citrato férrico



TCBS



Carbohidrato

- Sacarosa 1%

Inibidores:

- pH 8.6 – 8.8
- NaCl 1 %
- Bilis de Buey → Gram+
- Tiosulfato de Sodio → Coliformes
- Citrato de Sodio → Coliformes

Indicador pH

- Azul de Timol
- Azul de Bromotimol



Medios Diferenciales



- Agar Hierro de Kligler (KIA), Agar Hierro Tres Azúcares (TSI)
- Agar Hierro Lisina (LIA)
- Agar Citrato
- Agar Urea
- Motilidad
- Agua de Triptona (Indol)
- Fermentación de azúcares
- Prueba de Descarboxilasa

KIA y TSI

- Utilización solamente de glucosa: viraje del fondo a amarillo (acidificación del rojo fenol), la pendiente no cambia, la producción de gas se traduce por la aparición de burbujas que pueden, en algunos casos fermentar el medio.
- Utilización de lactosa: viraje de la pendiente y fondo a color amarillo.
- Producción de H₂S: da origen a un ennegrecimiento del medio que aparece en la zona fondo-pendiente o a nivel de la picadura.

En cuñas de agar hierro triple azúcar o en agar hierro de Kligler, los aislamientos de *S. Typhi* producen característicamente una cuña alcalina (roja, "K"), el extremo (tope) amarillo (amarillo, "A") y pequeña cantidad de agar ennegrecido (H₂S, +) en el sitio de inoculación de la cuña y en la línea de inoculación. **No** produce gas (G).



LIA

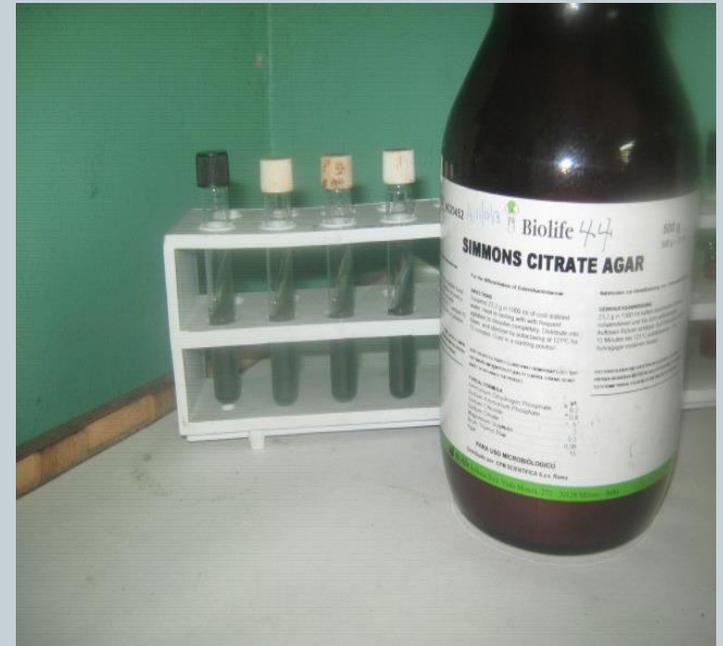


- Los microorganismos positivos a la lisina descarboxilasa producen un color púrpura en el medio de LIA (tubo de la derecha).
- Los microorganismos negativos a la lisina producen un color amarillo (ácido) en el fondo (tubo de la izquierda).



Agar Citrato

- La utilización del Citrato de sodio en aerobiosis (pendiente), libera Sodio (Na^+) que al unirse con los radicales OH y CO_2 forma NaOH y NaCO_3 (alcalino). El medio se torna Azul



Indol-Motilidad

Principio: Facultad de oxidar el Triptófano metilindol (escatol) indol.

Mecanismo: Indol y Escatol + reactivo de prueba (Kovacs, Erlich) Color rosado (en forma de anillo).

Recursos:

- Tubos con caldo Triptona al 1-2% ; pH 7,2 - 7,4.

Reactivo de Kovacs:

1. Alcohol amílico, butílico o isoamílico puro (150 mL)
2. p-dimetil-amino benzaldehido (10 g)
3. HCl concentrado (50 ML)

Interpretación:

Negativa: No se observa turbiedad ni crecimiento a partir de la línea de picadura. (izquierda)

Positiva: Turbiedad difusa o líneas de crecimiento lineal visible que se apartan de la picadura central. (derecha)



Agar Urea

Principio: Facultad de hidrolizar la urea(NH₂-CO-NH₂).

Mecanismo:

- $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$;
- $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4\text{OH}$ (alcalino)

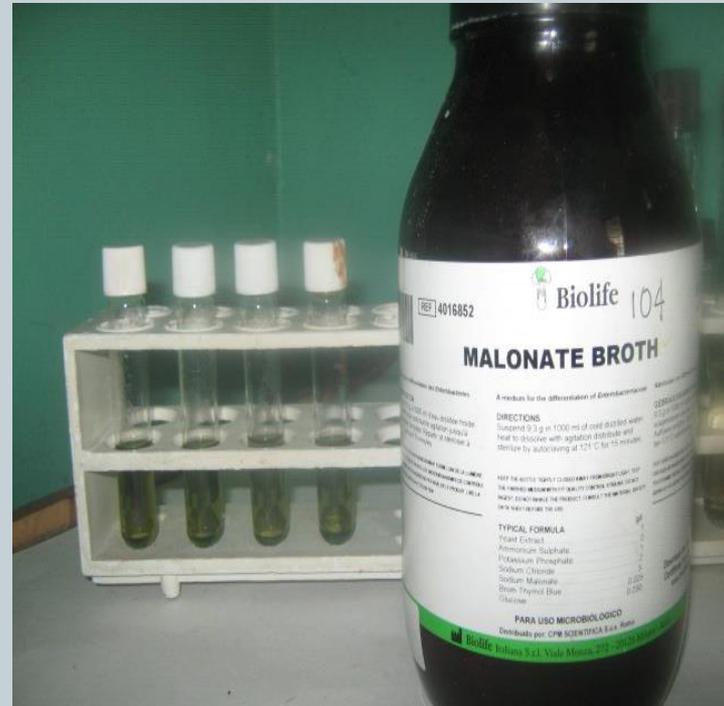
Productores de ureasa

- Klebsiella
 - Proteus
- Los cultivos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio, que muestra un color entre rosáceo y rojo.
- Los microorganismos ureasa negativos no cambian el color del medio, el cual es entre amarillo pálido y rosado. *S. typhi* siempre es ureasa negativa.



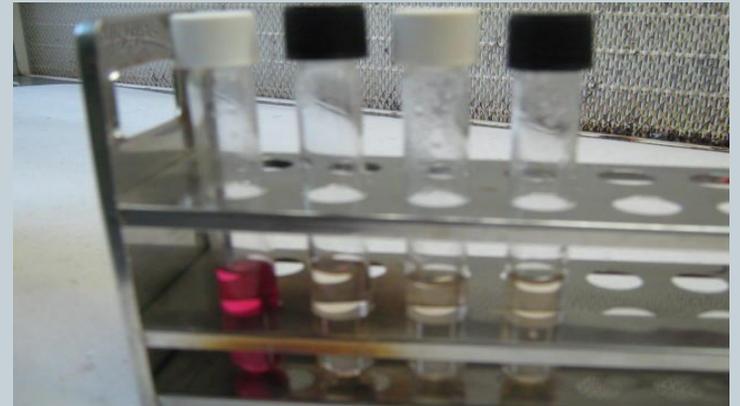
Utilización del Malonato

- La utilización del malonato de sodio, libera Sodio (Na^+) que al unirse con los radicales OH y CO_2 forma NaOH y NaCO_3 (alcalino). El medio, se torna Azul



Agua de Peptona Andrade

<u>Fórmula</u>	<u>g/L</u>
Peptona	10.0
Extracto de Carne	3.0
Cloruro de Sodio	5.0
Ind. Andrade	10 mL

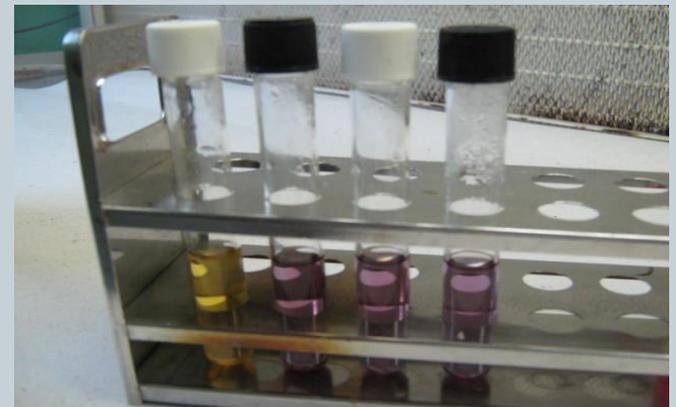
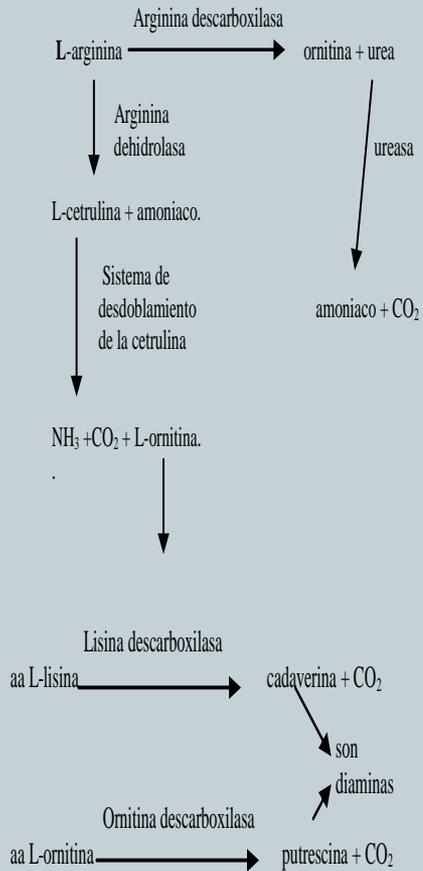


Indicador de Andrade



- Disolver 0,5 g Fuscina ácida en 100 mL dH₂O.
- Agregar 16 mL NaOH 1N.
- Dejar reposar por 24 h.
- Puede ser necesario añadir 1 o 2 gotas de NaOH 1N si la fuscina no está decolorada.
- Guardar en frasco ámbar.
- Usar 10 mL por cada litro de medio de cultivo.

Medio Descarboxilasa de Moeller

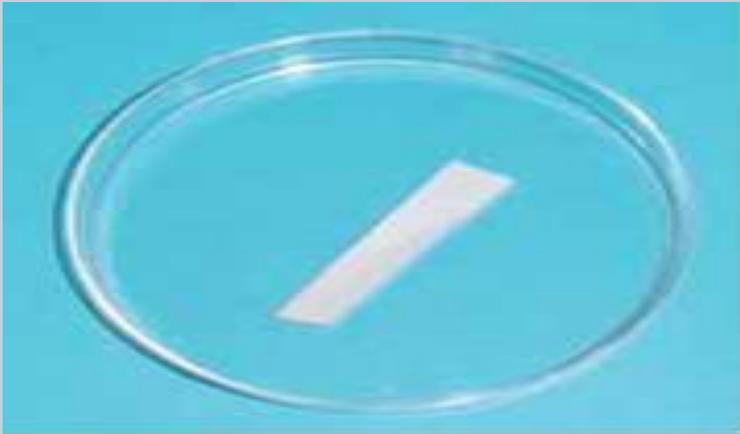


Oxidasa

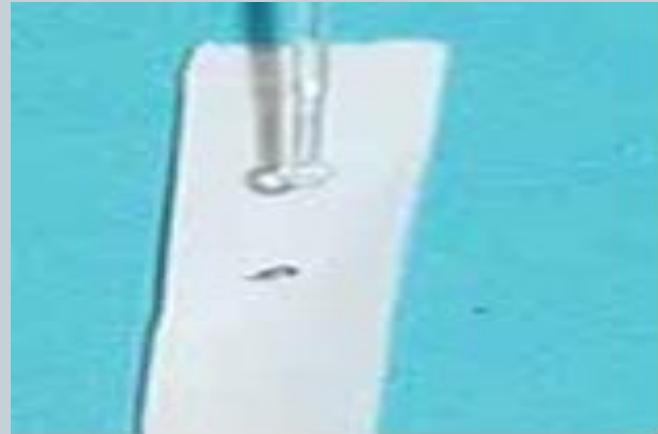


La prueba de oxidasa usa el reactivo de Kovacs (una solución al 1% [p/vol] de N, N,N', N' -tetrametil-p-dihidroclorofenilendiamina) para detectar la presencia de citocromo c en la cadena respiratoria de la bacteria; si el reactivo de la oxidasa es catalizado, se torna púrpura.

- Coloque el papel de filtro tratado con oxidasa de Kovac en una placa de Petri.



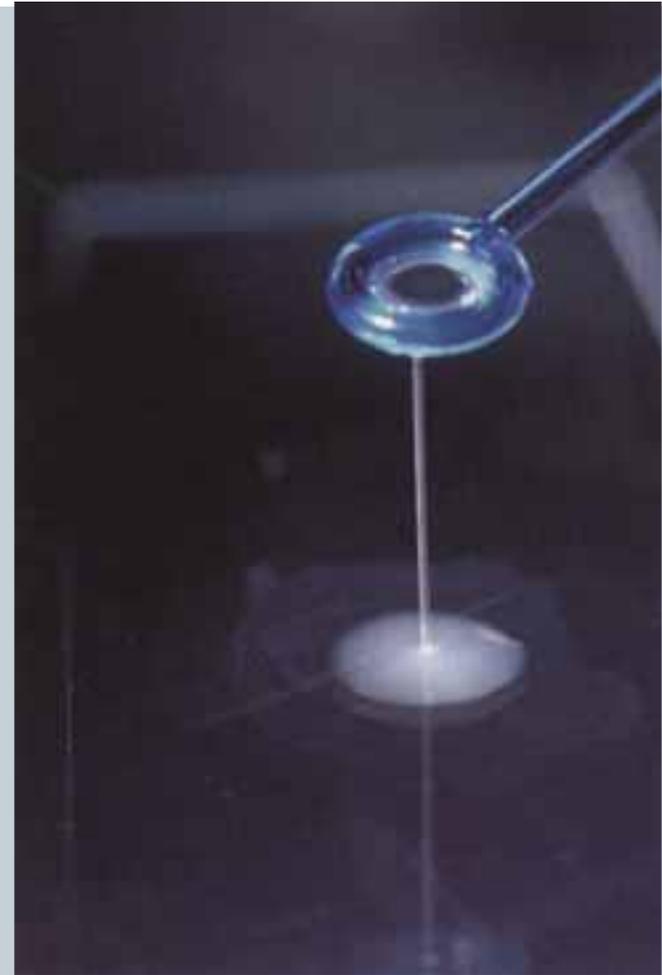
- Prepare el inóculo y toque el papel de filtro con el asa. En 10 segundos se detecta la reacción positiva con oxidasa de Kovacs por un cambio de color a morado en el área del papel de filtro donde el crecimiento fue frotado .
- La prueba de la oxidasa se puede hacer en papel de filtro o en un hisopo.



Prueba de la Cuerda

La prueba de la cuerda puede desarrollarse en una lámina de vidrio o en una placa plástica de Petri, suspendiendo un crecimiento de 18–24 horas en agar infusión de corazón (u otro medio no inhibidor) en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%.

Si el resultado es positivo, las células bacterianas serán lisadas por el desoxicolato de sodio, la solución perderá turbidez y el ADN se desprenderá de las células lisadas, causando la viscosidad de la mezcla. Se formará una “cuerda” mucoide cuando se introduzca lentamente un asa de inoculación en la suspensión



Bibliografía



- Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. CDC, OMS, 2004.
- Métodos básicos de laboratorio en Bacteriología clínica. OMS, 1993.
- Métodos bacteriológicos. En: " Gradwohl. Sonnenwirth, Jarret. Métodos y diagnóstico del laboratorio Clínico". Tomo 3. Cap.70. pp. 1237-1240. 1985
- Manuales de Medios de Cultivo.