

Tema 5.-Pruebas bioquímicas para cocos Gram (+)

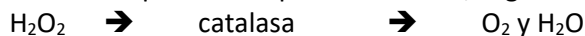
Los cocos Gram (+), tanto aerobios como anaerobios, se desarrollan por lo común bastante bien en medios no selectivos convencionales como el Agar sangre, mientras que son inhibidos en medios selectivos como el Mc Conkey y el SS por su contenido en sales biliares.

La primera consideración práctica que se tiene en cuenta es determinar si es un estafilococo o un estreptococo, lo que se hace según las características siguientes:

	ESTAFILOCOCO	ESTREPTOCOCO
Aspecto de las colonias	Lisas, grandes, de 2-3 mm, convexas, opacas y con frecuencia pigmentada	Menores de 2mm de diámetro, puntiformes, translúcidas o semiopacas.
Hemólisis en Agar-Sangre	La β -hemólisis en estafilococos es menor en relación con el tamaño de las colonias que las de los estreptococos hemolíticos	
Disposición de las células en el Gram	Racimos ("stafilo"= racimo de uva)	Pares o Cadenas
Reacción de la catalasa	Catalasa +	Catalasa -

REACCIÓN DE LA CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone el H_2O_2 en, según la reacción:



El H_2O_2 se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los Hidratos de Carbono. Si se deja acumular, el H_2O_2 es letal para las células bacterianas, excluyendo los estreptococos. La mayoría de las bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas poseen actividad catalasa. La prueba no se puede realizar sobre Agar sangre, ya que los eritrocitos tienen actividad catalasa.

Prueba en portaobjeto

Con una aguja de punción o un asa de platino, se transfieren células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un porta, se añaden una o dos gotas de una solución de H_2O_2 al 3% y la rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indican reacción (+).

Método en tubo o placa de Agar

Se añaden 1 o 2 gotas de solución de H_2O_2 al 3% directamente sobre la superficie de una placa o pico de Agar. Al igual que en la prueba en porta, la aparición rápida de burbujas indica reacción +.

Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintos de la catalasa capaces de descomponer el H_2O_2 , unas pocas burbujas diminutas formadas a los 20-30 segundos no se consideran prueba +.

IDENTIFICACIÓN DE ESTAFILOCOCOS

Ante el reconocimiento de una colonia de estafilococo, la primera consideración es determinar si es estafilococos aureus o no, ya que es una causa común de enfermedad infecciosa en el hombre. Del género estafilococo, sólo el estafilococo aureus produce coagulasa y tiene capacidad para producir ácido a partir del manitol.

Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una enzima capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible en un sistema analítico adecuado. La coagulasa funciona “in vivo”, produciendo una barrera en el sitio de la infección estafilocócica, lo que sirve para localizar los microorganismos en absesos. La coagulasa se presenta de 2 formas:

- Forma libre.
- Forma fija (factor de aglutinación) unida a la pared celular bacteriana.

Para la realización de la prueba, se utiliza plasma humano o de conejo obtenido de una muestra de sangre fresca. Se recomienda el producto comercial liofilizado. No se debe emplear sangre citratada ya que los microorganismos que utilizan el citrato (estreptococo faecalis) pueden dar una reacción falsa +

Prueba de la coagulasa, prueba en portaobjeto o estudio de la forma fija

- 1.- Colocar una gota de agua destilada o solución fisiológica estéril sobre un portaobjetos.
- 2.- Con asa de platino, se emulsiona una muestra del microorganismo con el agua.
- 3.- Colocar una gota de plasma junto a la gota de suspensión bacteriana y mezclar bien.
- 4.- La formación inmediata de un precipitado granular o de grumos blancos a los 15-20 segundos significa prueba +.

La prueba se considera – si no se observa aglutinación a los 2 o 3 minutos. Esta prueba se considera sólo **presuntiva** y todos los cultivos que den resultados – o + tardíos, deben verificarse mediante la prueba en tubo, debido a que algunas cepas de estafilococo aureus producen coagulasa libre que no reacciona en la prueba en el porta.

Prueba de la coagulasa, prueba en tubo o estudio de la forma libre

- 1.- Colocar 0,5ml de plasma en un tubo estéril.
- 2.- Añadir 0,5ml de un cultivo puro en caldo del microorganismo a investigar o emulsionar una colonia sólida tomada con asa de platino.
- 3.- Mezclar por rotación suave del tubo evitando remover o agitar el contenido.
- 4.- Colocar el tubo en un baño de agua a 37°C.

La reacción se considera (+) ante cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo en 1-4 horas. Se recomienda observar el tubo a intervalos de 30 minutos, ya que algunas cepas de estafilococo aureus pueden formar fibrinolisisina que disuelve el coágulo recién formado.

Otras cepas sólo pueden producir suficiente coagulasa como para dar una reacción + después de 18-24h de incubación, por lo que las pruebas negativas a las 4h deben observarse después de este periodo de incubación.

Prueba de fermentación del manitol

El Agar-Manitol salado (medio de Chapman) es un medio altamente selectivo para aislamiento de estafilococos patógenos en cultivos mixtos. Este medio aprovecha la capacidad de los estafilococos de desarrollarse en presencia de una alta concentración de NaCl (7,5%) y la del estafilococo aureus de fermentar el manitol.

Las colonias de estafilococo aureus forman un halo amarillo en el Agar circulante, lo que indica la producción de ácido a partir del Manitol.

Prueba de la DNasa

El DNasa Agar es un medio que sirve para la demostrar la presencia de Desoxirribonucleasa (DNasa) producida por el Stafilococcus Aureus patógeno (coagulasa positivos). Se emplea para la identificación de Stafilococcus Aureus y Serratia (existe una correlación entre la liberación de toxina y la DNasa por el Stafilococcus Aureus).

- 1.- Hacemos una siembra en botón en una placa de DNasa de la colonia a estudio.
- 2.- Incubamos 18-24h.
- 3.- Al terminar la incubación, añadimos HCl al 10%, azul de toluidina o verde metilo.

→ HCL al 10%: añadimos HCl al 10% a la siembra en botón y hasta que quede cubierta.

La prueba es (+) si aparece un halo transparente alrededor de la siembra en botón. Es debido a que el ácido precipita el DNA del medio y este adquiere un color opaco, mientras que alrededor de la siembra en botón que han liberado la enzima DNasa el medio permanece transparente.

→ Azul de toluidina: la prueba se considera (+) si aparece un halo rojizo alrededor de la siembra y el resto es azul.

→ Verde Metilo: La prueba es (+) si el halo es muy claro alrededor de la siembra en botón y el resto de la superficie del medio es verde intenso.

Catalasa Cocos Gram (+)	(+) Estafilococo	Coagulasa	(+) Estafilococo Aureus
			(-) Estafilococo Epidermidis
		Manitol	(+) Estafilococo Aureus
			(-) Estafilococo Epidermidis
	DNasa	(+) Estafilococo Aureus	
		(-) Estafilococo Epidermidis	
	(-) Estreptococo		

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS

La identificación inicial está orientada a evaluar el tamaño y aspecto de la colonia individual en medio de cultivo primario y el tipo y grado de hemólisis producida en Agar-sangre.

Los estreptococos producen 2 hemolisinas:

- **Estreptolisina O:** que es antigénica y oxigenolábil (se destruye en presencia de O₂)
- **Estreptolisina S:** que es no antigénica y oxigenoestable.

Algunas cepas de estreptococos no producen estreptolisina S y sus propiedades hemolíticas pueden pasar inadvertidas en cultivos incubados aeróbicamente. Se recomienda practicar en el medio varias punciones en ángulo de 45° con el hilo de inoculación al estriar los cultivos, con el fin de hacer penetrar algunas bacterias por debajo de la superficie donde prevalecen condiciones relativamente anaeróbicas, o bien, se puede colocar un cubre estéril en la superficie del Agar sobre una porción de inóculo para evitar el contacto de las colonias que desarrollan debajo del vidrio con el O₂ atmosférico.

Las reacciones hemolíticas pueden variar según la especie del animal del cual proviene la sangre y del tipo de Agar-base utilizado para preparar Agar-sangre. El Agar-base empleado para el Agar-sangre debe ser un producto de infusión libre de azúcares reductores como glucosa, fructosa, galactosa y muchas pentosas, ya que éstos inhiben la acción lítica de los estreptococos sobre los hematíes del medio por disminución del pH, debido a que la estreptolisina S es inactivada a pH bajo.

La **α-hemólisis** es un tipo de hemólisis incompleta, producida por algunas cepas de estreptococo (estreptococo Viridans o verdes), en la cual los hematíes que rodean las colonias son parcialmente dañados pero no lisados, por lo que hay un característico enverdecimiento del medio debido a la presencia de compuestos del tipo de la biliverdina, dado que los hematíes del Agar-sangre no se destruyen del todo en la reacción α-hemolítica como ocurre en la reacción β-hemolítica. Ambas pueden ser diferenciadas microscópicamente examinando las zonas de hemólisis y observando la presencia o ausencia de hematíes intactos.

En las zonas α-hemolíticas aparecen los contornos de membrana de los hematíes y en las zonas β-hemolíticas no quedan contornos celulares.

→Halo verde= α-hemólisis

→Halo blanco o transparente= β-hemólisis

En la mayoría de los laboratorios, sólo se identifican rutinariamente los grupos A, B y D, ya que dichos grupos son responsables de la mayoría de las infecciones humanas.

Identificación del estreptococo del grupo A

El método más común para identificación de estreptococo del grupo A es el uso de discos de papel impregnados de una pequeña cantidad de Bacitracina, colocados sobre una porción de inóculo en un medio de Agar-sangre. Se incuba el medio a 18-24h a 37°C.

La aparición de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano de unos 15 mm de diámetro alrededor del disco de Bacitracina es característica del grupo A.

Esta técnica sólo puede ser utilizada en cultivos puros y no para identificación de estreptococos que crecen en cultivos mixtos.

Un 5-15% de los estreptococos susceptibles a la Bacitracina pueden pertenecer a grupos distintos del grupo A. Esta proporción, relativamente alta, de resultados positivos, se puede reducir evaluando con cuidado el tipo de hemólisis producida.

Identificación del estreptococo del grupo B

Se debe sospechar la presencia de estreptococo del grupo B cuando se aísla un estreptococo β -hemolítico y la prueba de la bacitracina no presenta una zona de inhibición del desarrollo.

La confirmación de que se trate de un estreptococo del grupo B se realiza mediante la prueba de CAMP (Factor de Monofosfato de Adenina Cíclica).

Prueba de CAMP

La actividad β -hemolítica del estafilococo se ve intensificada por la acción de un factor extracelular producido por el estreptococo del grupo B, llamado factor CAMP.

La prueba se lleva a cabo en Agar-sangre ovina. La sangre ovina lavada, resuspendida en solución fisiológica, aporta los resultados más claros.

Se realiza trazando una estría del estreptococo por identificar en forma perpendicular a otra estría de una cepa de estafilococo aureus, conocida como productora de β -hemólisis. Ambas líneas no deben tocarse, las placas inoculadas se deben incubar a atmósfera ambiente, la zona de intensificación de lisis asume la forma de una cabeza de flecha en la intersección de ambas estrías.

Identificación de estreptococo del grupo D

Los estreptococos del grupo D pueden ser α o β -hemolíticos, pero son comúnmente no hemolíticos (se llaman γ -hemolíticos). Estos estreptococos se dividen en 2 grupos:

- Enterococos
- No enterococos

Los estreptococos del grupo D se pueden diferenciar con facilidad de todos los estreptococos por su capacidad de hidrolizar la Esculina en presencia de bilis al 4%.

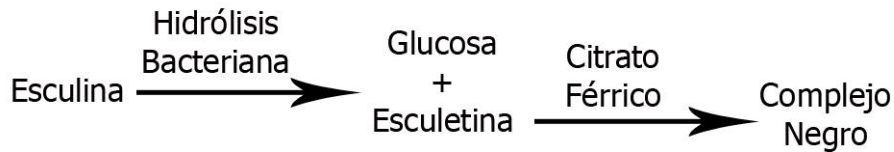
Prueba de la Bilis-Esculina

Se utiliza el medio bilis-esculina que se prepara en tubos en pico de flauta.

Este medio está compuesto de:	Peptona	5 g
	Extracto de carne	3 g
	Bilis de Buey	40 g
	Esculina	1 g
	Citrato férrico	0,5 g
	Agar	15 g
	Agua destilada csp	1000 ml

Procedemos de la siguiente forma: Tras inocular el microorganismo a estudio, se incuba el medio durante 24-48h a 37°C.

Las bacterias capaces de desarrollarse en bilis y de hidrolizar Esculina producen glucosa y Esculetina, la cual reacciona con el citrato férrico para formar un complejo marrón oscuro o negro, produciendo un ennegrecimiento difuso del medio bilis-esculina.



Una vez identificados los estreptococos pertenecientes al grupo D [reacción bilis-esculina (+)] es necesario determinar si es un enterococo o una especie de no enterococo. Los enterococos desarrollan y producen ácido en caldo infusión de corazón que contiene NaCl al 6,5%. Los no enterococos son inhibidos en esta concentración de sal.

Cocos Gram (+) Catalasa (-)	Bacitracina (+) Estreptococo A	
	CAMP (+) Estreptococo B	
Estreptococo	Bilis esculina (+) Estreptococo D	Crece en caldo Infusión de corazón es Enterococo
		Es inhibido su crecimiento en caldo Infusión de corazón es No enterococo

IDENTIFICACIÓN DEL NEUMOCOCO

En tinciones de muestras biológicas, los neumococos aparecen como diplococos Gram (+). En infecciones importantes, la presencia de neumococos puede ser confirmada y serotipificada mediante la reacción de Neufeld. La presencia de cápsulas prominentes (muy aumentadas) alrededor de los neumococos es sugestiva de virulencia.

La **reacción de Neufeld** se realiza mezclando cantidades aproximadamente iguales de muestra (esputos, sedimentos de LCR...) con suero antineumocócico. Se examina la mezcla al microscopio con objetivo de inmersión. Si la reacción es positiva la cápsula de los neumococos aparece bastante prominente, comparadas con las de la misma muestra mezclada con solución salina, utilizado como control.

La identificación inicial de neumococos se lleva a cabo, más comúnmente, observando el aspecto de las colonias en Agar-sangre, después de 18-24h de incubación.

Las cepas virulentas con abundante polisacárido capsular producen colonias húmedas, mucoides y transparentes.

Las cepas de neumococo, escasamente capsuladas, forman colonias pequeñas, redondas y translúcidas, convexas al principio pero con el tiempo desarrollan una depresión central por autólisis. Las colonias están siempre rodeadas de una zona de α -hemólisis, de 2-3mm.

Las pruebas definitivas para identificación de neumococo son:

- La prueba de susceptibilidad a la optoquina
- La prueba de solubilidad en bilis

Prueba de susceptibilidad a la optoquina

La optoquina es un derivado de la Quinina que inhibe selectivamente el desarrollo del neumococo a muy bajas concentraciones (5 µl/l ó menos).

La optoquina puede inhibir a otros estreptococos α-hemolíticos pero sólo a mayores concentraciones. La optoquina tiene acción detergente, por lo que ocasiona una inhibición del desarrollo neumocócico por alteración de la tensión superficial.

La prueba se desarrolla de la siguiente manera:

- Utilizando un asa de platino, se toma una porción de una colonia bien aislada del germen a estudio y se estría en una placa de Agar-sangre ovina.
- Se coloca un disco de optoquina en el centro del área estriada.
- Invertir la placa e incubar a 37°C, 18-24 horas.
- El desarrollo del neumococo (*Streptococcus pneumoniae*) es inhibido por el disco de optoquina. La zona de inhibición es de 15 mm ó más. Si el organismo presenta una zona de 10mm o menos, se debe investigar la solubilidad en bilis.

Prueba de solubilidad en bilis (en caldo o en placa)

Las sales biliares del tipo del desoxicolato de Sodio y taurocolato de Sodio tienen capacidad de lisar selectivamente al neumococo cuando se añaden a las células bacterianas que desarrollan en un medio de cultivo artificial.

El neumococo produce una enzima autolítica que explica la depresión central característica de las colonias más viejas desarrolladas en Agar. Se cree que la adición de sales biliares acelera este proceso.

Prueba en caldo

Debido a que el desoxicolato de Sodio puede precipitar a un pH de 6,5 o menos, el caldo debe tener un pH estabilizado en 7 para evitar una reacción falsa negativa.

Se realiza de la siguiente manera:

- 1.- Transferir 0,5ml de un cultivo de 18-24h en caldo de enriquecimiento a 2 tubos limpios. Añadir NaOH 0,1 Normal para ajustar el pH a 7 si es necesario.
- 2.- Añadir una gota de rojo fenol a cada uno de los tubos.
- 3.- Añadir 0,5ml de desoxicolato de Na o taurocolato de Na al 10% a uno de los tubos.
- 4.- Añadir 0,5ml de solución salina normal estéril al otro tubo.
- 5.- Agitar ambos tubos suavemente y colocarlos en la incubadora o baño maría a 37°C.
- 6.- Reacción positiva: se produce un aclaramiento visible del cultivo turbio en 3h. El tubo con solución salina debe permanecer turbio.

Prueba en placa

- 1.- Sobre una colonia bien aislada del microorganismo a estudio en una placa de Agar-sangre ovina, colocar una gota de desoxicolato de Na al 2%.
- 2.- Sin invertir la placa, incubarlo a 35°C durante 30 minutos.
- 3.- Reacción positiva: una colonia soluble en bilis desaparece, dejando en su lugar un área parcialmente hemolizada.
- 4.- Reacción negativa: la colonia queda intacta.