

ANEXO

DE

MEDIOS

DE

CULTIVO

ÍNDICE:

AGAR C.L.D.E.....	3
AGAR E.M.B.....	4
AGAR MAC CONKEY.....	4
AGAR <i>SALMONELLA</i> - <i>SHIGELLA</i>	5
AGAR BAIRD PARKER.....	6
AGAR SANGRE.....	7
AGAR SANGRE AZIDA.....	8
AGAR MÜELLER HINTON.....	8
CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO.....	9
AGUA DE PEPTONA.....	9
AGUA DE PEPTONA ALCALINA (Caldo de enriquecimiento).....	9
CALDO SELENITO.....	9
CALDO CISTINA - SELENITO.....	10
CALDO BASE CON TETRACIONATO (Mueller Kauffman).....	10
CALDO MAC CONKEY.....	11
AGAR PARA RECUENTO EN PLACA.....	¡Error! Marcador no definido.

AGAR C.L.D.E.

a. Utilidad:

Este medio da buen desarrollo de todos los patógenos urinarios y permite la detección de contaminantes como *differoides*, *lactobacillus* y *Micrococcus*, que indican un dato de gran valor en lo referente al modo de obtención de la muestra.

b. Fórmula:

Peptona. 4 g
Extracto de carne. 3 g
l-Cistina..0,128 g
Tripteina 4 g
Azul de Br Timol.. 0,02 g
Lactosa. 10,0 g
Agar. 15,0 g
Agua destilada c.s.p.... 1000 ml
pH:. 7,3

c. Principio:

El déficit de electrolitos tiene por objeto lograr la obtención de colonias bien aisladas del género *Proteus*, ya que impide el deslizamiento de estos organismos.

La lactosa del medio, permite detectar los *Coliformes* contaminantes en orina, que fermentan la lactosa, los que se reconocen fácilmente por el cambio de color del medio, que vira a amarillo.

En materia fecal puede reemplazar al agar lactosa púrpura de bromo cresol aislamiento de bacterias Gram negativas, en especial del género *Proteus*.

d. Características:

Color: verde.
Distribución: en placas.
Siembra: para aislamiento por estrías.
Incubación: 24/48 hs a 37°C en atmósfera normal.
Usos: detección de infecciones urinarias.

e. Descripción de las colonias:

- Colonias amarillas: Fermentadoras de lactosa.

- Colonias azules o celestes: no fermentadoras de lactosa.

Escherichia coli: Colonias amarillas, opacas con una ligera profundidad en el centro, de alrededor de 1 a 2 mm. de diámetro, fermentadoras de lactosa.

Klebsiella sp: Colonias extremadamente mucoides, variando de un color amarillo hasta un azul blanquecino.

Proteus sp: Colonias traslúcidas, usualmente más pequeñas que las de *Escherichia coli*.

Salmonella sp: Colonias chatas azul verdoso.

Pseudomonas aeruginosa: Colonias verdes con superficie mate, filamentosa en la periferia.

Streptococcus faecalis: Colonias amarillas de aproximadamente 0,5 mm. de diámetro.

Staphylococcus aureus: Colonias amarillas profundas de aproximadamente 0,75 mm. de diámetro, coloreadas uniformemente.

Staphylococcus coagulans negativo (*epidermidis*): Colonias amarillo pálido o blancas, más opacas que las de *Streptococcus faecalis*, a veces con palidez en la periferia.

Corynebacterium sp: Colonias grises muy pequeñas.

f. Control de calidad:

Escherichia coli:

Fermentación de lactosa.

Proteus mirabilis o *vulgaris*:

Inhibición del Spreading y no fermenta lactosa.

AGAR E.M.B.

(El agar E.M.B. según Levine no contiene sacarosa).

a. Utilidad:

Este medio es un medio diferencial recomendado para la detección y aislamiento de bacterias patógenas intestinales gramnegativas.

b. Composición:

Peptona de caseína	10 g
Lactosa.	5 g
Sacarosa..	5 g
Fosfato de potasio.	2 g
Eosina..	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agar Agar.	1,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH:.	7,1 +/- 0,1

c. Principio:

La incorporación de sacarosa aumenta la diferenciación de patógenos (*Salmonella* y *Shigella*: sacarosa negativos) de la flora acompañante (*Proteus vulgaris*, *Citrobacter*, *Aeromona* hidrófila-lactosa negativos, sacarosa positivos). Otros integrantes de la familia *Proteus* no fermentan sacarosa o lo hacen tardíamente.

Los colorantes que contiene este medio inhiben a la flora gram positiva. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* pueden crecer en forma de colonias puntuales incoloras características. Estos colorantes actúan como indicador dando una buena diferenciación de las bacterias lactosa positivas de las negativas, las primeras, son negras o poseen centros oscuros con periferia transparentes incoloras. La proporción de ambos colorantes ha sido calculada

para obtener un máximo de diferenciación y un mínimo de toxicidad.

Cándida albicans desarrolla colonias plumosas o en forma de telarañas en 24 a 48 hs. de incubación en atmósfera de CO₂.

d. Características:

Color: violáceo.

Distribución: en placas.

Siembra: por estría (para aislación).

Incubación: 24 a 48 hs a 37 °C y atmósfera normal.

Usos: aislación de *Enterobacterias*.

e. Descripción de las colonias:

Escherichia coli: Colonias de 2 a 3 mm. de diámetro, con brillo metálico verdoso en luz reflejada, y centro oscuro hasta negro en luz refractada.

Enterobacter aerógenas: Colonias de 4 a 6 mm. de diámetro, con centro pardo grisáceo en luz refractada; sin brillo metálico.

Salmonella y *Shigella*: colonias transparentes, ambarinas.

Staphylococcus coagulasa positivos: Colonias como "punta de alfiler", incoloras.

Cándida albicans: Colonias en forma de telaraña o de pluma.

f. Control de calidad:

Escherichia coli:

Fermentan la lactosa

Salmonella y *Shigella*: No fermentan la lactosa

AGAR MAC CONKEY

a. Utilidad:

Medio diferencial que se recomienda para detección y aislamiento de todo tipo de bacterias de disentería, tífus y paratífus, en muestras de materia fecal, orina, etc.

b. Fórmula:

Peptona.. 17 g
Proteosa peptona.. 3 g
Lactosa. 10 g
Sales Biliares. 1,5 g
Cloruro de Sodio 5 g
Agar Agar.. 13,5 g
Rojo neutro.. 0,03 g
Cristal Violeta 0,001 g
Agua destilada c.s.p.. 1000 ml
pH: 7,1

Preparación:

Rehidratar 50 g de medio en 1.000 ml. de agua destilada fría, calentar hasta ebullición para disolución completa. Distribuir en frascos y esterilizar en autoclave.

c. Principio:

Las sales biliares y el violeta cristal inhiben la flora gram positiva. La lactosa, junto con el indicador de pH, sirven para la comprobación de la degradación de dicho azúcar. Las colonias de microorganismos

fermentadores de lactosa son color rojas rodeadas de una zona de bilis precipitada. Los no fermentadores forman colonias incoloras y los débilmente fermentadores forman colonias ligeramente rosadas en 24 a 48 hs.

d. Características:

Color: rojizo.
Distribución: en placas.
Siembra: por estrías.
Incubación: 24-48 hs. a 37°C.
Uso: detección de Gram negativos.

e. Descripción de colonias:

Salmonella, Shigella: incoloras, transparentes.

Escherichia coli: grandes, rojas, halo turbio.

Enterobacter, Klebsiella: grandes, rosadas, mucosas.

Enterococcus, Staphylococcus: diminutas, de crecimiento aislado, opacas.

f. Control de calidad:

Escherichia coli:
Fermentadora de lactosa.
Salmonella y Shigella: No fermentadora de lactosa.

AGAR SALMONELLA - SHIGELLA

a. Utilidad:

Es un medio selectivo que se recomienda para el aislamiento de *Salmonellas* y *Shigellas* en materia fecal y otros materiales.

b. Fórmula:

Extracto de carne.....5 g
Peptona 5 g
Lactosa. 10 g
Mezcla de sales biliares.. 8,5 g
Citrato de sodio... 10 g
Citrato de hierro. 13 g
Agar... 13,5 g
Verde brillante. 0,33 g

Rojo neutro...0,025 g
Tiosulfato.....0,8 g
Agua destilada c.s.p.. 1000 ml
pH:...7

Preparación:

Agregar 63 g de medio deshidratado a 1 litro de agua destilada, remojar 15 min., hervir 3 minutos, dejar enfriar a 50°C y distribuir. NO SE AUTOCLAVA.

c. Principio:

Debido a la concentración de lactosa que tiene, se obtiene una buena diferenciación entre los

organismos *Coliformes* que fermentan la lactosa de los que no lo hacen.

Se observa a las 18-24 horas en busca de colonias transparentes e incoloras de las bacterias no fermentadoras de lactosa.

Las fermentadoras de lactosa no inhibidas presentan colonias color rojo o rosado debido al indicador rojo neutro.

El Verde brillante, la bilis de buey y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben a la flora acompañante. Con el tiosulfato e iones hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias.

A las 48 hs. de incubación a 37°C se hace una nueva observación en busca de las productoras de sulfhídrico.

d. Características:

Color: amarillo rojizo.

Distribución: en placas.

Siembra: por estrías (aislamiento).

Incubación: 24 y 48 horas a 37°C.

AGAR BAIRD PARKER

a. Utilidad:

Es un agar selectivo recomendado por el aislamiento y diferenciación de estafilococos en alimentos y materiales farmacéuticos.

b. Composición:

Peptona de caseína..10 g
 Extracto de carne...5 g
 Extracto de levadura... 1 g
 Piruvato de sodio...10 g
 Glicina...12 g
 Cloruro de lítico...5 g
 Agar-Agar... 15 g
 Agua destilada c.s.p. 1000 ml

Aditivos:

Emulsión de yema de huevo.. 50 ml
 Telurito de K. 0,105 g

Usos: detección de *Salmonellas* y *Shigellas*.

e. Descripción de las colonias:

Shigellas y *Salmonellas*: Colonias incoloras, transparentes, las *Salmonellas* productoras de SH₂, dan colonias transparentes con centro negro.

Proteus: Colonias transparentes con centro negro.

Escherichia coli: Colonias rosadas hasta rojas.

Enterobacter aerógenos: Colonias mayores que las *Escherichia coli* color cremoso blanquecinas, opacas, mucosas.

f. Control de calidad:

Escherichia coli: Inhibición del crecimiento.

Salmonella typhimurium: Desarrollo y producción de SH₂.

Sulfametacina. .0,05 g

c. Principio:

El cloruro de lítico y el telurito activan inhibiendo la flora acompañante, mientras que el piruvato favorece selectivamente el desarrollo de estafilococos. Las colonias de *Staphylococcus* toman una coloración negra debido a la reducción de telurito a telurio y se producen halos alrededor de las mismas, debido a la lipólisis y meteólisis.

d. Características:

Preparación: Disolver 58 g/l, esterilizar en autoclave, enfriar a 50-45°C y añadir 50 ml/l de yema de huevo, 3 ml/l de solución al 3,5% de

telurito de K y eventualmente 50 mg/l de sulfametacina, se vierte en placas.

Siembra: Por diseminación en superficie.

Incubación: 24 a 48 hs. a 37°C.

e. Interpretación:

Staphylococcus aureus: Colonias negras, convexas, 1 a 5 mm de diámetro, borde estrecho blanquecino, rodeadas por un halo claro de 2 a 5 mm. Dentro del halo presencia de anillos opacos no visibles antes de 48 hs.

Staphylococcus epidermidis: Colonias negras, forma irregular. Después de 24 hs., presencia de zonas opacas alrededor de las colonias.

Micrococcus: Crecimiento ocasional muy pequeñas, pardas o negras, ausencia de halos claros.

Bacillus: Colonias pardo - oscuras, opacas, con halos claros.

Levadura: Colonias blancas, sin halos claros.

AGAR SANGRE

a. Utilidad:

Diferenciación de *Estreptococcus* según su hemólisis y de *Stafilococcus* según coloración (no totalmente característico).

b. Preparación:

1. Fundir el medio base y dejarlo enfriar a 45°C.

2. Agregar asépticamente 5% de sangre desfibrinada estéril.

3. Homogeneizar con movimiento de rotación, evitando la formación de espuma.

c. Características:

Fraccionamiento: En placas.

Siembra: Por estrías.

Incubación: A 37°C durante 24 hs.

d. Descripción de colonias: Según hemólisis y tamaño.

Colonias puntuales:

Alfa: La colonia esta rodeada por una zona de eritrocitos parcialmente lisados (la hemoglobina pasa a metahemoglobina), generalmente acompañada por una

coloración verdosa. *Neumococcus* y *Estreptococcus* alfa hemolítico.

Beta: La colonia presenta, alrededor una zona clara que indica la lisis completa de los eritrocitos. La propiedad hemolítica se debe a la acción de dos hemolisinas. La estreptolisina O, es antigénica y oxígeno lábil, la estreptolisina S, no es antigénica pero es oxígeno estable.

Gamma: No existe hemólisis aparente ni coloración.

Colonias medianas:

Staphylococcus aureus (patógeno): Presenta coloración amarilla, generalmente de consistencia mantecosa y de hemólisis variable.

Staphylococcus epidermidis (no patógeno): Con coloración blanca y traslúcida.

Colonias grandes:

Micrococcus: muy pigmentadas y distintos colores.

e. Comentarios:

El agar base debe ser libre de dextrosa, ya que el ácido producido por su fermentación inactiva la estreptolisina, impidiendo ver todas las hemólisis.

Preferentemente se debe usar sangre de conejo o caballo por poseer menor cantidad de inhibidores; mientras que la humana contiene más cantidad de anticuerpos y otros factores como sustancias antibacterianas, antibióticos o exceso de ion citrato.

En hisopados de garganta se recomienda el uso de sangre de carnero, por su acción inhibitoria del crecimiento de *Haemophilus haemolyticus*, comensal muy común en este sector.

Se debe tener especial cuidado con la temperatura a la cual se le agrega sangre al medio base, debido a que a mayor temperatura se formaría AGAR CHOCOLATE, medio que se utiliza para el crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*.

AGAR SANGRE AZIDA

a. Utilidad:

Para el crecimiento de bacterias Gram positivas.

b. Preparación:

Agregar 2 ml. de una solución de Azida sódica al 1% cada 100 ml. del medio agar sangre.

c. Principio:

La azida actúa como inhibidor de Gram negativos.

d. Características:

Siembra: Por estrías.

Incubación: A 37°C durante 24 hs.

AGAR MÜELLER HINTON

a. Utilidad:

Para ensayo de sensibilidad o resistencia de agentes patógenos frente a antibióticos y sulfonamidas. Como medio base.

b. Fórmula:

Infusión de carne	5,0 g	
Caseína hidrolizada	17,5 g	
Almidón.....	1,5 g	
Agar....	15,0 g	
Agua destilada c.s.p.....		1000 ml
pH 7,4		

c. Principios:

La composición garantiza condiciones favorables de crecimiento para m.o. y ser de ácido p-amino benzoico (antagónico de las

sulfonamidas), permite medir la sensibilidad a la misma.

La presencia de Almidón evita el pasaje de las cepas a forma rugosa.

d. Características:

Esterilización: En autoclave 15 min. a 121°C.

Fraccionamiento: En placas o en tubos (En pico de flauta).

Siembra: Por estrías y en forma masiva cuando es para ensayos de sensibilidad y resistencia.

Incubación: A 37°C durante 24 hs.

e. Comentarios:

Para cualquiera de los dos tipos de fraccionamiento no se debe refundir más de una vez el medio.

CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO

AGUA DE PEPTONA

- a. Utilidad: Peptona... 1 g
Sirve como diluyente y también Agua destilada.. 1000 ml
es utilizado para preenriquecimiento. pH. 7
- b. Fórmula: Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

AGUA DE PEPTONA ALCALINA (Caldo de enriquecimiento)

- a. Utilidad: Peptona. 10 g
Permite el desarrollo de vibrios e Cloruro de sodio. 10 g
inhibe el desarrollo de flora Agua destilada c.s.p 1000 ml
acompañante. pH.: 8,6 a 9,0
- b. Fórmula: c. Características:
Esterilización: 15 minutos a 121°C.

CALDO SELENITO

- a. Utilidad: Las especies de *Proteus* y *Escherichia* no se inhiben indefinidamente, con el selenito de sodio, cuando se sospechase que la cantidad de estos microorganismos es grande conviene hacer los sub-cultivos en E.M.B. y con 6 a 18 hs. de incubación.
Para enriquecimiento de *Salmonellas* a partir de materia fecal, orina, etc. El efecto inhibitor del caldo selenito no se produce si están presentes gran cantidad de desechos, por lo que la mejor técnica a seguir es: disolver 2 a 4 gr. de materia fecal en solución fisiológica estéril, dejar sedimentar y agregar al caldo selenito 1 a 2 ml. del sobrenadante.
- b. Fórmula: Selenito ácido de sodio (anhidro).. 4 g
Fosfato monosódico. 10 g
Fosfato disódico. 10 g
Peptona. 5 g
Lactosa... 4 g
Agua destilada c.s.p 1000 ml
pH. 7
Preparación: La incubación del caldo selenito a 43°C produce una mayor recuperación de *Salmonella parathypi* B. Para aislamiento de *Salmonellas* en orina, el caldo se debe preparar en concentración doble y agregar igual cantidad de orina.
- c. Principio: El medio así preparado es color paja, (pero si se sobrecalienta se forma un sedimento de color rojo ladrillo, de selenio precipitado) a partir de este medio se deben efectuar subcultivos en E.M.B., en SS y W.B. (bismuto sulfito agar).
- d. Control de calidad: *Salmonella* sp. , *Shigella* sp.
Escherichia coli.

CALDO CISTINA - SELENITO

Utilidad:

Para enriquecimiento de *Salmonellas* a partir de heces, alimentos y otros materiales.

b. Fórmula:

Peptona de caseína..5 g
L (-) Cistina.. 0,01 g
Lactosa.. 4 g
Fosfato disódico... 2 g
Selenito ácido de sodio 4 g
Agua destilada c.s.p. 1000 ml
pH: 7

Preparación:

Disolver 23 g en un litro (calentando a 60°C, como máximo), esterilizar por filtración y distribuir en tubos. NO ESTERILIZAR AL AUTOCLAVE.

c. Principio:

El selenito inhibe el crecimiento de bacterias *Coliformes* y *Enterococcus* en las primeras 6-12 horas que siguen al inicio de la incubación.

d. Características:

Incubación: Hasta 24 hs. a 37°C o a 43°C.

Al cabo de 6-12 hs. (y eventualmente al cabo de 18-24 hs.) se siembra en medios de cultivos selectivos.

e. Control de calidad:

Salmonella sp. *Shigella* sp.
Escherichia coli

CALDO BASE CON TETRATONATO (Müller Kauffman)

a. Utilidad:

Este medio es muy útil para enriquecimiento de materiales sospechosos de contener bacilos del género *Salmonella*.

Al cabo de dicho tiempo se replica en estría en placas con agar SS para buscar la presencia de *Salmonellas*.

b. Fórmula:

Proteosa peptona.. 5 g
Sales biliares.. 1 g
Carbonato de calcio 10 g
Tiosulfato de sodio... 30 g
Agua destilada c.s.p... 100 ml

c. Solución iodo iodurada:

Iodo.....20 g
IK.....25 g
Agua destilada....100 ml

d. Solución verde brillante:

Verde brillante.....1 g
Agua destilada....100 ml

e. Instrucciones:

Fraccionar en tubos a razón de 10 ml. Calentar hasta ebullición en baño María a vapor fluente. Enfriar a 45°C y agregar a cada tubo 0,2 ml de solución iodo iodurada y 0,2 ml de solución verde brillante.

El medio sin solución iodo iodurada puede conservarse, no así al que se ha agregado dicha solución, ya que una vez agregada la misma debe ser utilizado dentro de las 24 hs. de su preparación y tampoco puede ser calentado posteriormente.

f. Principio:

Las sales biliares estimulan el crecimiento de bacterias intestinales. El verde brillante inhibe la flora acompañante gram positiva.

g. Control de calidad:

Salmonella sp. *Shigella* sp.
Escherichia coli.

CALDO MAC CONKEY

a. Utilidad:

Medio selectivo para ensayo previo orientativo de *E.coli* 5 gérmenes *Coliformes*, y para determinación del título de *Coliformes* totales y/o fecales en leche y agua.

b. Fórmula: (g/litro)

Peptona de caseína	.20	g
Lactosa	10	g
Bilis de buey, desecada	5	g
Purpura de bromocresol	0,01	g
Agua destilada c.s.p...	1000	ml
pH:	.7,1 + 0,1	

Preparación:

Disolver 35 gr./lt., distribuir en tubos con campanitas Durham y esterilizar al autoclave.

c. Característica:

Color: Púrpura.
Distribución: 10 ml por tubo.

Siembra: 1 ml del material a ensayar. Si fuera necesario utilizar volúmenes mayores de la muestra.

Incubación: 48 hs. a 37°C.

d. Principio:

Este caldo contiene lactosa, cuya degradación con formación de ácido y formación de gas, señalan la presencia de *E.coli*. El gas que se produce se recoge en las campanitas de Durham y el ácido se comprueba por viraje del indicador al color amarillo. La bilis de buey favorece el crecimiento de bacterias intestinales.

e. Interpretación:

Producción de gas ácido: Sospecha de presencia de *E.coli*.

Producción de ácido: Sospecha de presencia de *Coliformes* sin solamente

existencia de *E.coli*.