

I. INTRODUCCIÓN

Se denomina coprocultivo a la siembra de una muestra adecuada de heces en medios de cultivo apropiados para el desarrollo de bacterias entéricas patógenas. Muestra adecuada es aquella que ha sido recolectada durante el periodo agudo de la enfermedad, cuando es más fácil comprobar presencia de pus, moco o sangre, y antes de la administración de antimicrobianos.

Para realizar el examen se emplean heces que no tengan más de media hora de obtenidas, o muestras tomadas directamente del recto con un hisopo de algodón. Cuando las siembras no se pueden efectuar de inmediato o la muestra demora en llegar al laboratorio, se aconseja emulsionar aproximadamente 1g de heces en 1° ml de un líquido conservador, o bien, depositar en éste el hisopo rectal.

El líquido o solución conservadora se prepara de la siguiente manera:

NaCl 4.2 g

K₂HPO₄ 3.1 g

KH₂PO₄ 1.0 g

Glicerol 300 ml

H₂O 700 ml

Este líquido, al que se le añade rojo fenol, se distribuye en tubos, que se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120° C. Las muestras tomadas mediante hisopado rectal pueden ser portadas en tubos que contengan medio de Cary-Blair, colocando el hisopo en su interior.

Medios de cultivo

Para facilitar el aislamiento de bacterias entéricas patógenas se utilizan medios de enriquecimiento y medios selectivos. Los más empleados son los siguientes:

- Medios de enriquecimiento
- Caldo con tetrationato (Mueller y Kauffmann). Este método posee la propiedad de inhibir o destruir el crecimiento de *Salmonella* y *Shigella*. Contiene, entre otros, tiosulfato de sodio, sales biliares y yodo, el cuál actúa sobre el medio para determinados géneros, en especial *Salmonella*; de aquí su uso como paso previo a la siembra en placas de medios selectivos.
- Caldo con selenito (Leifson). Posee selenito, ácido de sodio que inhibe parcialmente al grupo coliforme durante las primeras horas de cultivo (12 a 24 horas), y permite el rápido desarrollo de salmonelas y shigellas.

Selenito sódico 4 g

Peptona 5 g

Manitol 4 g

Fosfato disódico anhidro (Na₂HPO₄) 10 g

Agua destilada 1000 ml

2. Medios selectivos

- Agar SS (salmonella–shigella). Este medio selectivo, empleado para aislar *Salmonella* y *Shigella* ejerce una buena inhibición sobre agentes coliformes, sin limitar el desarrollo de los patógenos gramnegativos. Se utiliza especialmente junto al agar–sulfito de bismuto, para siembra de materiales provenientes de medios enriquecedores, como caldo tetrationato y caldo con selenito. Contiene sales biliares, lactosa, citrato y tiosulfato sódico, citrato férrico, verde brillante y rojo neutro como indicador. *Shigella* y *Salmonella*, como también otros agentes que no fermentan la lactosa, aparecen como colonias lisas, transparentes a opacas; las pocas colonias fermentadoras de la lactosa que se pueden desarrollar tienen color rojo y un centro negro. Conviene señalar que la bilis o las sales biliares inhiben el crecimiento de microorganismos grampositivos y esporulados sin interferir en el crecimiento de los bacilos gramnegativos.
- Agar MacConkey. Es un medio selectivo–diferencial que contiene sales biliares, las cuales inhiben la flora grampositiva. Los agentes del grupo coliforme dan colonias de color rojo, debido a que fermentan la lactosa. En cambio, *Salmonella* y *Shigella* sp. forman colonias incoloras.
- Agar XLD (Xilosa–Lisina–Desoxicolato). Medio indefinido, mixto, sólido y diferencial. En él crecerán microorganismos quimioheterótrofos formadores de sulfhídrico a partir de sulfato. En la receta aparece rojo fenol, en el cual actúa el indicador de pH.

Se pueden presentar tres tipos de anomalías intestinales:

- Infección intestinal ! Debida a la producción de cambios ecológicos por la acción directa del microorganismo.
- Intoxicación alimentaria ! Producida indirectamente por el microorganismo a través de la producción de toxinas, antes de la ingestión por la persona.
- Toxiinfección alimentaria ! Producida por el microorganismo a través de la producción de toxinas, después de su ingestión por la persona.

Hay que tener en cuenta la biota presente en condiciones normales. Así:

- Lactantes (alimentación materna).

Altos niveles de *Bifidobacterium*

Bajos niveles de *E.coli* y Enterobacterias

- Lactantes (alimentación artificial)

Altos niveles de grampositivos

Bajos niveles de *Bifidobacterium*

- Niños y adultos

Predominancia de Anaerobios

Anaerobios Facultativos y Aerobios:

% *E.coli* " 80%

% Enterococos " 14%

% *Staphylococcus* y *Streptococcus* " 4%

% Otros " 2%

" Dieta rica en proteínas: predominancia de biota Grampositiva.

" Dieta rica en hidratos de carbono: predominio de Gramnegativa.

II. TOMA Y OBSERVACIÓN DE MUESTRAS

Una vez tomada la muestra como se mencionó anteriormente procedemos a la observación de la muestra. Ésta ha de hacerse a dos niveles:

- **Macroscópicamente.**

Se comprueba su olor, consistencia, presencia de mucus, sangre, restos de alimentos sin digerir.

- **Microscópicamente.**

Sometemos la muestra a una tinción simple con azul de metileno. Esto nos permite comprobar la presencia o ausencia de leucocitos. Así:

" presencia de leucocitos ! la infección ha cursado con inflamación intestinal. Se trata por tanto de microorganismos invasivos como *Salmonella*, *Shigella* o ETEC.

" ausencia de leucocitos ! significa que no ha habido inflamación por lo que la infección puede ser debida a virus (Rotavirus) o a bacterias productoras de toxinas (*Vibrio cholerae*).

III. REALIZACIÓN DE LA PRÁCTICA

Vamos a realizar un análisis de heces. En primer lugar haremos un examen macroscópico de las heces y a continuación sembraremos en agar SS, en agar XLD y en agar MacConkey. Paralelamente vamos a sembrar *E.coli* en estos dos medios. Finalmente haremos una tinción de Gram.

IV. RESULTADOS

- **Examen macroscópico**

- color marrón claro
- olor normal
- consistencia intermedia
- pocos restos de alimentos
- ausencia de sangre
- ausencia de mucus

- **Examen microscópico**

B.1 Placa XLD: heces

Medio indefinido, mixto, sólido y diferencial. En él crecerán microorganismos quimioheterótrofos

formadores de sulfhídrico a partir de sulfato. En la receta aparece rojo fenol, en el cual actúa el indicador de pH.

Resultados ! Medio muy virado a rosa. Colonias negras.

B.2 Placa SS: heces

Este medio selectivo, empleado para aislar *Salmonella* y *Shigella* ejerce una buena inhibición sobre agentes coliformes, sin limitar el desarrollo de los patógenos gramnegativos. *Shigella* y *Salmonella*, como también otros agentes que no fermentan la lactosa, aparecen como colonias lisas, transparentes a opacas; las pocas colonias fermentadoras de la lactosa que se pueden desarrollar tienen color rojo y un centro negro.

Resultados ! aparecen colonias transparentes o lisas con un punto negro por lo que son lactosa negativa.

B.3 Placa XLD: *E.coli*

Resultados ! aparecen colonias incoloras negras, por lo que son lactosa negativa y sulfhídrico positiva

B.4 Placa SS: *E.coli*

Resultados ! La mayoría de las colonias están muy aisladas y se ha formado sulfhídrico. Aparecen de color negro con un halo blanco alrededor. Son lactosa negativa porque si fuera lactosa positiva hubiera aparecido una tonalidad más rosada. Prácticamente no hay *E.coli*, es un medio muy selectivo, por lo que para coprocultivo se utiliza casi siempre medio SS.

B.5 Placa MacConkey

Es un medio selectivo–diferencial que contiene sales biliares, las cuales inhiben la flora grampositiva. Los agentes del grupo coliforme dan colonias de color rojo, debido a que fermentan la lactosa. En cambio, *Salmonella* y *Shigella* sp. forman colonias incoloras.

Resultados ! Aparecen colonias incoloras por lo que son microorganismos lactosa negativa. Podemos sospechar que se trata de *Salmonella*.

Vamos a identificar ahora, a partir de una colonia determinada de la

placa de XLD los microorganismos que observemos.

Resultados ! cocobacilos gramnegativos

Finalmente vamos a tomar una colonia de la muestra de coprocultivo y vamos a hacer una identificación mediante una prueba llamada Api20E para Enterobacterias. Consiste en una tira en la cual encontramos diferentes pocillos. En cada uno de éstos hay una serie de reactivos que reaccionarán con la muestra dando unas características que nos llevan a la identificación del microorganismo. Así:

- ONPG "**
- ADH +**
- LDC +**

- ODC +
- CIT "
- H₂S +
- URE "
- TDA "
- IND "
- VP "
- GEL "
- GLU +
- MAN +
- INO +
- SOR +
- RHA +
- SAC "
- OXI "
- MEL +
- AMY "
- ARA +

Resultado ! *Salmonella*