

FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

GEMA MARTÍNEZ PERAL

FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS EN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

- **GENERALIDADES**. Organización del Laboratorio, materiales nuevos, control de calidad, métodos de siembra, tinciones...
- **BACTERIOLOGÍA**

2.1 SECCIÓN 1: ESPIROQUETAS

- **FAMILIA I**: TREPONEMA, BORRELIA
- **FAMILIA II**: LEPTOSPIRA

2.2 SECCIÓN 2: BACTERIAS GRAM-, AERÓBICAS/ MICROAEROFÍLICAS, MÓVILES, HELICOIDALES/ VIBRIOIDES (Campylobacter, Helicobacter pylori)

2.3 SECCIÓN 4: BACILOS Y COCOS GRAM-, AERÓBICOS

- **FAMILIA I**: PSEUDOMONADACEAE
- **FAMILIA VII**: LEGIONELLACEAE
- **FAMILIA VIII**: NEISSERIACEAE (Neisseria, Branhamella Catharralis, Acinetobacter)
- **OTROS GÉNEROS**: BRUCELLA, BORDETELLA

2.4 SECCIÓN 5: BACILOS GRAM-, ANAEROBIOS FACULTATIVOS

- **FAMILIA I**: ENTEROBACTERIACEAE (E. coli, Salmonella, Shigella, Yersinia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus, Morganella, Providencia, Citrobacter...)
- **FAMILIA II**: VIBRIONACEAE (Vibrio, Aeromonas, Pleisiomonas...)
- **FAMILIA III**: PASTEURELLACEAE (Pasteurella, Haemophilus, Actinobacillus,...)

2.5 SECCIÓN 9: RICKETTSIAS Y CLAMIDIAS

2.6 SECCIÓN 10: MICOPLASMAS

2.7 SECCIÓN 12: COCOS GRAM+

- **FAMILIA I**: MICROCOCCACEAE (STAPHYLOCOCCUS)
- **OTROS GÉNEROS**: STREPTOCOCCUS

2.8 SECCIÓN 13: BACILOS Y COCOS FORMADORES DE ESPORAS (Bacillus)

2.9 SECCIONES 14 Y 15: BACILOS GRAM+ NO FORMADORES DE ENDOESPORAS (Listeria, Corynebacterium, Lactobacillus, Gardenella,...)

2.10 SECCIÓN 16: MICOBACTERIAS

2.11 BACTERIAS ANAEROBIAS

- BACILOS GRAM+, ESPORULADOS: Clostridium
- COCOS ANAEROBIOS GRAM-: Veillonella
- COCOS GRAM+: Peptostreptococcus
- BACILOS GRAM-: Bacteroides / Fusobacterium
- BACILOS GRAM+ NO ESPORULADOS: Actinomices

2.12 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS. AGENTES ANTIMICROBIANOS

- MICOLOGÍA (Hongos)
- PARASITOLOGÍA
- VIRUS
- RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

6.1 MUESTRAS DE HECES. RECEPCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO

6.2 EXUDADOS

6.3 HEMOCULTIVO

UT 1. GENERALIDADES

- ESTRUCTURA DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA.

Está en función del tamaño y de la cantidad de trabajo que en él se realice. Está dividido en secciones y éstas pueden estar individualizadas o bien todas juntas.

Secciones del Laboratorio de Microbiología:

- Sección de toma de muestras: se toman las muestras a pacientes ambulatorios; allí se almacena el material necesario para la toma, que deberá ser revisado y repuesto periódicamente.
- Recepción y registro de muestras (independientemente del lugar donde se hayan recogido las muestras).
 - ♦ Registro y asignación de un número o código.
 - ♦ Primera evaluación de las muestras: las muestras, dependiendo del análisis que se vaya a realizar, deben cumplir una serie de requisitos y características fijadas en el Laboratorio. Se deben rechazar las que no cumplan ese criterio pues es posible que los resultados no sean correctos.
- Sección de siembra de muestras
 - ♦ Procesamiento inicial
 - ◇ Siembra (en el medio de cultivo más adecuado)
 - ◇ Tinción (en colorantes ácidos o básicos)
 - ◇ Técnicas especiales
 - ♦ Esquemas claros del procesamiento rutinario y procedimientos especiales: no son iguales de un Laboratorio a otro. Dependerá de la experiencia del profesional, entre otras cosas.
- Sección de medios de cultivo

- ◆ Preparación y lavado del material.
- ◆ Esterilización (tanto de los medios de cultivo como de los productos de desecho).
 - ◇ En seco (generalmente para material de vidrio)
 - ◇ En autoclave 121°C/1 atm (productos contaminados antes de desechar)
- Área de almacén de productos y reactivos.
- Sección de Bacteriología.
 - ◆ Se interpretan cultivos, tinciones y otras técnicas, realizando identificación y pruebas de sensibilidad (se refiere a qué tipo de antibiótico es sensible el microorganismo).
 - ◆ Técnicas de diagnóstico rápido para la detección de Ag/Ac directamente en las muestras:
 - ◇ Urocultivos (muestra = orina).
 - ◇ Coprocultivos y parásitos (muestra = heces).
 - ◇ Exudados y anaeróbios (muestras = secreciones)
 - ◇ Hemocultivos (muestra = sangre)
- Sección de Micobacterias. Debería estar aislada del resto del laboratorio con el fin de evitar la contaminación del resto del personal
 - ◆ Identificación y aislamiento de micobacterias (Ej. Tuberculosis).
- Sección de Micología.
 - ◆ Estudio de infecciones producidas por hongos:
 - ◇ Unicelulares (levaduras)
 - ◇ Filamentosos (Mohos)
- Sección de antibióticos.
- Sección de Serología o Inmunomicrobiología.
- Otras secciones: Virología y Biología Molecular.

• **NORMAS GENERALES DEL LABORATORIO.**

NORMAS:

- Calidad en las técnicas y en los resultados
- Seguridad e higiene en el trabajo

NIVELES DE SEGURIDAD BIOLÓGICAS según: las técnicas, los equipos de seguridad y la estructura del Laboratorio.

NIVEL 1– Laboratorios de enseñanza: Microorganismos no patógenos y oportunistas (se refiere a aquellos microorganismos que no son capaces de producir enfermedad en un individuo sano, pero si en determinadas condiciones de defensas bajas).

NIVEL 2– Microorganismos de peligrosidad potencialmente moderada.

NIVEL 3– Microorganismos de alto riesgo.

• **MATERIAL NECESARIO.**

- Medios de cultivo
- Placas de Petri (de vidrio y desechables)
- Morteros de porcelana o vidrio: para muestras de tejidos que necesitan ser machacadas antes de preparar el cultivo.

- Asas de siembra: nos permiten tomar la muestra y realizar la extensión en el medio de cultivo. Pueden ser redondas (al cargarla se forma, por capilaridad, una película en el asa) o pueden ser rectas. Estas últimas sirven para llevar a cabo el método de siembra en picadura que sirve para estudiar la movilidad de las bacterias. La movilidad se manifiesta porque hay un crecimiento hacia ambos lados de la línea de siembra.

APARATAJE BÁSICO.

- Cabinas de seguridad: para la siembra de muestras y minimizar en lo posible la contaminación como consecuencia de la manipulación de las muestras (Ej. Formación de aerosoles)
- Estufas de cultivo: sirven para conseguir unas condiciones óptimas de temperatura y permitir el crecimiento de microorganismos.
- Neveras–Congeladores: las neveras sirven para preservar las muestras cuando no se procesan inmediatamente al llegar al Laboratorio (2–8°C). Los congeladores sirven para conservar las cepas que luego nos servirán para compararlas con otras muestras nuevas.
- Microscopios
- Autoclave

• CONTROL DE CALIDAD.

Va dirigido a comprobar que los aparatos del Laboratorio trabajan adecuadamente. Son muy costosos, por este motivo no se realizan muy continuos, hay que buscar un equilibrio.

Para asegurar la calidad en el Laboratorio hay que actuar sobre cada uno de los procedimientos y materiales utilizados y para ello se utilizan las normas de calidad:

- **CONTROL DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS.** Se realiza en base a:
 - ◆ Manual que establezca las normas para obtener las muestras y el transporte de las mismas.
 - ◆ Establecer unos horarios fijos para la recepción de las muestras, así como criterios claros para el rechazo de las mismas.
 - ◆ Evaluar la calidad de las muestras.
 - ◆ Informar lo más rápidamente posible de los resultados más importantes con el fin de que el médico pueda actuar cuanto antes.
- **CONTROL DE CALIDAD DE LOS PROCEDIMIENTOS**
- **CONTROL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**
 - ◆ **Comerciales y preparados en el Laboratorio:**
 - ◇ Control de esterilidad de cada lote (autoclave o filtrado). En el proceso de esterilización se añadirá 1 placa control si hay menos de 100 unidades y 3 placas control si hay más de 300 unidades. Tras la esterilización las placas, en general, se dejan durante 24 horas a 37°C, y en caso del agar sangre se dejará, además de las 24 horas a 37°C, otras 24 horas a temperatura ambiente.
 - ◇ Control de crecimiento: se realiza cada vez que recibimos o preparamos un nuevo lote. Se lleva a cabo a través de un microorganismo control o cepas de colección. Para realizar la siembra se utiliza un inóculo reducido. El inóculo reducido es un inóculo estándar del cual hacemos una dilución al 1/10 de una suspensión del microorganismo con turbidez correspondiente al 0,5 de la escala de Mc Farland (la turbidez es proporcional al número de m.o formadores de colonias). Después de

preparar el inóculo estándar, se siembra con un asa de 0,001 mL.

- ◊ Control de las características selectivas: sembramos m.o que crecen en el medio que estamos controlando y m.o que no crecen en el. Si ambos crecen, el medio de cultivo no es bueno. El medio de cultivo selectivo sólo permite el crecimiento del m.o para el que ha sido creado.
- ◊ Control de las características bioquímicas (diferenciales): algunos medios de cultivo tienen en su composición sustancias que permiten un viraje de color dependiendo de la colonia que esté creciendo. Ej. Cuando el medio contiene lactosa, éste nos permite diferenciar entre las bacterias que usan la lactosa (viraje rosa) de las que no la usan (incoloro).

• REACTIVOS DE IDENTIFICACIÓN COMERCIALES O PREPARADOS:

Deben etiquetarse en el primer uso, poner la fecha de preparación y la caducidad. La frecuencia de los controles es la siguiente:

- ◆ Catalasa, Oxidasa, Coagulasa: siempre que se empieza o prepara un nuevo lote y semanalmente. Debe hacerse un control positivo y otro negativo.
- ◆ Discos de identificación: siempre que se utilice un nuevo lote.
- ◆ Colorantes de uso diario: una vez a la semana. Se realiza una tinción de Gram con un m.o que sabemos que es Gram+.
- ◆ Cepas control (cepas de colección como las ATCC u otras fuentes comerciales).

Mantenimiento de las cepas control:

- ◊ **Medio Cistina Triptica.**
- ◊ **Agar Triptica soja**: se realiza una siembra en profundidad y se cierran los tubos con parafina para evitar la contaminación. Se conserva a temperatura ambiente.
- ◊ **Agar sangre o Agar chocolate**: este último se utiliza para m.o delicados. Se obtiene a partir del agar sangre sometido a calentamiento.
- ◊ **Medio Cooked meat**: para m.o anaeróbicos.
- ◊ **Congelación**: se puede realizar o bien a partir de leche descremada o bien a partir de glicerol.
- ◊ **Liofilización.**
- **CONTROL DE APARATOS**: (Temperatura entre 23–29°C con una humedad que oscile entre el 30–50%)
- Control de temperatura en estufas, baños, neveras y congeladores. Para este control se realizan gráficos.
- Atmósfera de incubación:
 - ◊ En estufas de CO₂ (Ej. Estreptococos)
 - ◊ Atmósfera anaerobia: para m.o anaeróbicos estrictos (necesitan la ausencia total de O₂) (Ej. Clostridium). Para comprobar la ausencia de oxígeno se utilizan los indicadores.
- Cabinas de flujo laminar: sirven para evitar la contaminación de las muestras, pero no evitan la contaminación del manipulador.
 - ◊ Cambio periódico de filtros.
 - ◊ Control de lámparas ultravioletas: proporciona una cierta esterilidad.
- Autoclaves:
 - ◊ Control de la temperatura del ciclo completo que dependerá de la atm. que se consiga (1atm.) y que vendrá indicada por el aparato (120–125°C)
 - ◊ Control de esterilización mediante 2 tipos de procedimientos:

- Biológicos: mensual. Se usan esporas de bacillus (bacteria)
- Químicos: diario–semanal. Se usan indicadores.
- **Microscopios:** hay que limpiarlos inmediatamente después de usarlos y dejarlos tapados.
- **PRUEBAS DE CAPACIDAD:** son muestras simuladas con resultados conocidos. Se envían al Laboratorio sin que ellos lo sepan, con un m.o cuyos resultados son conocidos por los que envían el m.o. Luego se emite un comunicado y así se comprueba si realmente el Laboratorio funciona correctamente.
- **CONTROL DE CALIDAD EN SEROLOGÍA.**
 - ◊ Pruebas de capacidad para asegurar que el trabajo realizado es correcto.
 - ◊ Muestras de suero de titulación conocida.
 - ◊ Control estricto de la caducidad de los reactivos.
- **CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD (antibiogramas)**
 - ◊ Control de los medios de cultivo: pH (6,5–7,5), atmósfera de incubación, inóculo utilizado(105), tiempo y temperatura.
 - ◊ Antibióticos: pruebas de sensibilidad por:
- Difusión: discos (soporte sólido). Con concentración exacta.
 - ◊ Dilución (en polvo): hay que hidratarlos y así conseguimos la concentración necesaria.
 - ◊ Cepas control: Staphylococcus áureos (Gram+), Escherichia coli (Gram–), Psudomona aeruginosa (Gram+).

• **MEDIOS DE CULTIVO. PREPARACIÓN. CRECIMIENTO BACTERIANO**

5.1. DEFINICIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: Soporte que va a contener los nutrientes necesarios, así como unas condiciones óptimas de pH y humedad que permite el desarrollo y crecimiento de microorganismos. Pueden ser:

- **Sólidos:** al medio de cultivo sólido se le añade un agente gelificante o solidificante. Se preparan en erlenmeyer, se dejan enfriar y luego se pueden pasar o bien a una placa o bien a un tubo. Los gelificantes más habituales son:
 - Agar Agar: es un alga que se caracteriza por ser inerte frente a los microorganismos y porque es líquido a la temperatura de ebullición y solidifica entre los 45–50°C.
 - Gelatina.
- **Líquidos o caldos:** contiene los nutrientes y, en lugar de añadir el agar, tienen el agua que se utiliza para diluir el medio de cultivo. Se preparan en tubo.

5.2. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

La mayoría de los medios de cultivo se encuentran deshidratados y éstos se deben conservar de la siguiente forma:

- ◊ Frescos, secos, sin luz solar y algunos en nevera (Ej. Salmonella).
- ◊ Aperturas y cierres los menos posibles para que los productos no capten humedad.

Cuando los medios son preparados tanto por empresas como por el propio Laboratorio, se deben almacenar teniendo en cuenta:

- La temperatura ha de estar entre 2–8°C. Se conservarán entorno a 4–6 semanas.
- Si es necesario refundir, se hará al baño María o en autoclave 5 min.

5.3. PREPARACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO

Puesto que la mayoría de los medios de cultivo se encuentran deshidratados, para su preparación será necesaria la adición de agua destilada o desmineralizada con un pH próximo a 7.

Para preparar el medio de cultivo se utiliza un erlenmeyer limpio y enjuagado con agua destilada o desmineralizada. El volumen del erlenmeyer deberá ser el doble del volumen de medio de cultivo que queramos preparar.

PASOS A REALIZAR:

- Dependiendo del volumen de medio de cultivo que vayamos a preparar, pesar en un vidrio de reloj la cantidad necesaria del medio de cultivo deshidratado.
- Medir en una probeta la cantidad de agua destilada necesaria.
- Añadir parte del agua a un erlenmeyer adecuado al volumen que vamos a preparar.
- Añadir al erlenmeyer el medio de cultivo.
- Agitar hasta la disolución parcial y calentar un poco.
- Añadir el resto del agua que nos servirá para limpiar la superficie del objeto utilizado para pesar.
- Colocamos el erlenmeyer sobre el mechero, apoyado en una rejilla que permita la difusión del calor y calentamos durante un tiempo que vendrá determinado en el prospecto del producto.
- Por último se debe **esterilizar**.

Todos los medios de cultivo se preparan en erlenmeyer, independientemente de si es sólido o líquido. Lo que diferencia su preparación es la forma de esterilizar:

- Medios de cultivo SÓLIDOS en PLACA: se preparan y esterilizan en el erlenmeyer. Para la esterilización se coloca un tapón de algodón envuelto en una gasa, tapado con papel y sellado con una cinta adhesiva.
- Medios de cultivo SÓLIDOS O LÍQUIDOS en TUBO: se preparan en el erlenmeyer y se esteriliza en el tubo. Los tubos se llenan con un volumen que oscila entre los 5–10 mL (utilizamos una pipeta), se tapan con un tapón metálico y cubiertos con papel y cinta adhesiva. Se esterilizan colocados en una gradilla, aunque para aumentar la superficie se suelen colocar de forma inclinada.

Existen diferentes formas de esterilizar:

- **En Autoclave**: 15 min./1 atm./121°C en caso de material limpio.

20–30 min./1atm/121°C en caso de material contaminado.

- **Filtración**: mediante filtros de acetato de celulosa (0,22 μ m). Algunos nutrientes no pueden aguantar altas temperaturas, por eso se esterilizan primero así.
- **Tindalización**: 100°C/30 min. Se utiliza cuando están presentes nutrientes que, por sus características no pueden aguantar altas temperaturas.
- **CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

- **En función de su consistencia:**

- **Sólidos**: contienen agar (5–10% del total de nutrientes)
- **Líquidos**: aportamos agua.

- **Semisólidos:** contienen agar (<5–10%). Se utilizan cuando queremos observar movilidad bacteriana. Se hace en tubo y se utiliza la siembra en picadura con asa recta.

- **En función de su composición:**

- **Empíricos:** son aquellos en los que no se conoce exactamente su composición. Ya no se utilizan en los Laboratorios.
- **Químicamente definidos:** se conoce exactamente la composición y la concentración de cada uno de los nutrientes que componen el medio de cultivo.
- **Semisintéticos o complejos:** se conoce su composición y concentración pero puede variar de un lote a otro (los más utilizados).

- **En función del uso que se le da:**

- **Enriquecidos:** son aquellos medios en los cuales a un medio base se le añaden determinadas sustancias nutritivas que son necesarias para el crecimiento de un microorganismo exigente.
- **De enriquecimiento:** se utilizan solamente cuando se sospecha que el microorganismo de la muestra se encuentra en un número muy pequeño. Se le aporta los nutrientes y se espera que crezcan de 6 a 8 horas. Esto se utiliza, por ejemplo, cuando se sospecha la contaminación en alimentos por Salmonella.
- **Diferenciales:** incorpora determinadas sustancias que nos permiten diferenciar entre dos tipos de microorganismos. Ej. El agar de sal y manitol: nos permite diferenciar en el caso de los staphylococos, los que utilizan el manitol en su metabolismo de los que no. Si lo utilizan originan ácidos, con lo que el pH disminuye y el indicador vira de color.
- **Selectivos:** llevan incorporadas determinadas sustancias que inhiben el crecimiento de un microorganismo y facilita el crecimiento del microorganismo que nos interesa. Ej. Agar de sal y manitol: el NaCl (5%) inhibe el crecimiento de ciertos m.o y facilita el desarrollo de otros que crecen mejor en ese medio.
- **Transporte y mantenimiento:** se utilizan cuando la muestra no se puede procesar inmediatamente después de haberla tomado.

- **CRECIMIENTO BACTERIANO**

El crecimiento bacteriano necesita de una serie de sustancias y de ambientes que faciliten su desarrollo. Estas características pueden ser:

- **FÍSICAS**

- **Temperatura:** teniendo en cuenta la temperatura, podemos clasificar a los microorganismos en:
 - ◊ **Mesófilos:** son capaces de desarrollarse a temperaturas que pueden oscilar entre los 20–45°C. Temperatura óptima = 35–37°C.
 - ◊ **Termófilos:** son capaces de desarrollarse a temperaturas superiores a los 45°C.
 - ◊ **Sicrófilos:** son capaces de desarrollarse a temperaturas que oscilan entre 0–20°C.
- **PH:** el pH óptimo en el que se desarrollan la mayoría de los microorganismos es neutro, que oscila entre 6,5–7,5. Los m.o que se desarrollan a pH = 4 se denominan acidófilos.

En ocasiones, como consecuencia del metabolismo bacteriano, se producen residuos que acidifican el medio. Para mantener el medio neutro se utilizan tampones. El más utilizado es el de sales fosfato, que además sirven de alimento a los microorganismos,

- **Presión Osmótica:** es la presión que se origina por difusión o intercambio de soluciones de diferente concentración a través de una membrana. La mayoría de los microorganismos habitan en medios

hipotónicos. Su membrana debe ser selectivamente semipermeable para que se pueda dar ese fenómeno.

• QUÍMICAS

- **Oxígeno O₂**: a pesar de ser un elemento fundamental para la mayoría de los organismos, es bastante tóxico y con efectos corrosivos. Dependiendo de las necesidades de oxígeno que tiene un determinado microorganismo podemos clasificarlos en:

- ◊ **Aerobios obligados estrictos**: su metabolismo no puede desarrollarse en un medio sin oxígeno.
- ◊ **Anaerobios facultativos**: son capaces de realizar sus actividades metabólicas tanto en presencia como en ausencia de oxígeno
- ◊ **Anaerobios estrictos**: solamente son capaces de realizar sus funciones metabólicas cuando hay ausencia total de oxígeno, ya que su presencia es letal.
- ◊ **Anaerobio aereotolerantes**: no utilizan el oxígeno para el funcionamiento celular pero son capaces de desarrollarse en su presencia.
- ◊ **Microaerofílicos**: necesitan el oxígeno pero en pequeñas concentraciones.

- **Carbono**: es un elemento que forma parte de la estructura básica de la materia viva. Las fuentes a partir de las cuales los m.o obtienen este elemento son:

- Las proteínas (en forma de peptonas. Sirve para diferenciar m.o, por ejemplo, cuando tenemos un medio de cultivo con lactosa y peptonas).
- Los hidratos de carbono (fundamentalmente la glucosa y la lactosa. Se usa cuando no nos importa el tipo de m.o que crezca en ese cultivo).
- Los lípidos.

- **Nitrógeno, Fósforo y Azufre**:

- ◊ **Nitrógeno**: se necesita fundamentalmente para la síntesis de proteínas, es decir, para formar el grupo amino de los aminoácidos, pero también se utiliza para crear el DNA y el RNA. Las fuentes de obtención del nitrógeno son:

- ◊ Degradando material proteico e incorporando ese N a su metabolismo.
- ◊ Ión amonio NH₄⁺
- ◊ Nitratos: algunos organismos liberan ión nitrato NO₃⁻ y ellas lo aprovechan.
- ◊ N₂ gaseoso directo de la atmósfera.

- ◊ **Azufre**: se utiliza para sintetizar aminoácidos y vitaminas.

- ◊ **Fósforo**: la bacteria lo utiliza para sintetizar ácidos nucleicos y fosfolípidos de las membranas nucleares.

- **Potasio, Magnesio, Calcio**: Su función principal es que son necesarios como cofactores de las enzimas. Una enzima tiene una parte proteica (apoenzimas) y otra no proteica (cofactor). Esta última puede ser un ión metálico o una molécula orgánica compleja llamada coenzima. Los cofactores pueden dar o aceptar átomos requeridos por el sustrato.

- **Oligoelementos**: Hierro, Cobre, Zinc,. Participan como cofactores de las enzimas.

- **Factores orgánicos de crecimiento**: Compuestos orgánicos esenciales que el organismo es incapaz de sintetizar.

• DIVISIÓN BACTERIANA

La mayoría de las bacterias se dividen por fisión binaria, es decir que cada célula se divide dando lugar a otra idéntica.

FASES

- Elongación celular y duplicación del DNA cromosómico.
- La pared celular y la membrana plasmática, en la zona más próxima al centro se invaginan separando en dos regiones el DNA cromosómico.
- Las paredes en crecimiento se unen formándose dos células individuales.

Algunas especies de microorganismos, en lugar de reproducirse por fisión binaria, lo hacen por **Gemación**: se forma una protuberancia que aumenta de tamaño hasta que se aproxima al de la célula parental, separándose en ese momento. Así se reproducen las levaduras, que son un tipo de hongos unicelulares:

El otro tipo de hongos son los filamentosos, que se van a dividir mediante esporas situadas en los extremos de los filamentos.

• TIEMPO DE GENERACIÓN

Es el tiempo necesario para que una célula se divida. En la mayoría de las bacterias, ese tiempo es de 3 horas, aunque es variable, por ejemplo, el E. Coli tarda sólo 20 min. En dividirse, mientras que otras tardan más de 3 horas.

• FASES DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

- **Latencia**: horas o días. El microorganismo se adapta al medio. Hay un aumento de la actividad metabólica del microorganismo que se traduce en la síntesis de enzimas.
- **Logarítmica o crecimiento exponencial**: la bacteria está perfectamente adaptada al medio y se reproduce con la máxima actividad. Comienzan a manifestarse en la bacteria características visibles como el color y su actividad metabólica es muy activa.
- **Estacionaria**: es una fase de equilibrio que a la vez que se reproducen van muriendo en aproximadamente el mismo número. Se producen productos tóxicos debido a la propia muerte de las bacterias y a otros productos de desecho. Como consecuencia se agotan los nutrientes y cesa la reproducción.
- **Declive**: muerte de las bacterias debido a lo anterior.

5.9. MEDIDA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO. 2 Métodos:

- Métodos que se basan en el recuento del número de células presentes en una muestra. Generalmente se cuentan los m.o presentes en 0,1 mL o 1 mL en caso de ser muestras líquidas, o en 1 gramo en caso de que sean sólidas.
- Métodos que miden la masa total de la población de microorganismo. Esta masa será directamente proporcional al número de células.

Para el recuento de células se pueden utilizar tanto métodos DIRECTOS como INDIRECTOS.

MÉTODOS DIRECTOS

- **RECuento EN PLACA**: hay que tener en cuenta que cada bacteria va a dar lugar a una colonia. Solamente contaremos aquellas placas en las cuales el número de colonias se encuentre comprendido entre 30-300.

Supongamos que tenemos una muestra en la cual hay 10.000 bacterias en 1mL. Como se formarían 10.000 colonias y éstas no se pueden contar en 1 placa, se tiene que diluir. Por ejemplo, diluimos a 1/10: tomamos 1mL de la muestra y 9ml de disolvente. Ahora tendríamos 1.000 bacterias en 1ml por lo que será necesario

diluir otra vez a 1/10 con lo que nos quedaríamos con 100 bacterias en 1mL que ya podemos contar en la placa.

Una vez realizada la dilución seriada pertinente hay que llevarlo a un medio de cultivo. Esto se puede hacer por dos métodos:

- Siembra en masa:

- A partir de las disoluciones seriadas preparadas tomamos 1mL de cada una de ellas y lo depositamos en distintas placas de Petri vacías y estériles.
- Después añadimos un determinado volumen del medio de cultivo (10–20 mL) que tenemos en un baño María para evitar que se solidifique y agitamos la placa sobre la superficie de la mesa para homogeneizar y que las bacterias se distribuyan por toda la superficie de la placa.
- Dejamos solidificar y luego incubamos en la estufa durante 24 horas a 37°C.
- Transcurrido el tiempo realizamos el recuento. Vamos intentando contar las placas con las diferentes concentraciones de microorganismos hasta que damos con aquella en la que el número de m.o es el adecuado para poder ser contado. Supongamos que hay 270 unidades formadoras de colonia en la 4ª placa. ¿Cuál sería el número total de UFC por mL? Pues multiplicaríamos 270 por las diluciones 1/10 cuatro veces, es decir, por 10.000, por lo que el número total de microorganismos en 1 mL era de 2.700.000.

- Siembra en superficie:

- El medio de cultivo ya está solidificado en la placa.
- Preparamos las disoluciones seriadas y añadimos a cada placa 1 mL
- Para extender sobre la superficie de la placa el mL se utiliza un asa de Drigalski que se fabrica con pipetas Pasteur, calentando y doblándola. Debe estar esterilizada– La situamos en el centro de la placa y la giramos en círculo.

Con este método se pueden diferenciar los microorganismos ya que son claras las características de color u otras características de la colonia. Además nos ofrece la posibilidad de realizar la siembra desde las diluciones, cuando se sospecha que el número de diluciones es muy alto o si creemos que es bajo, se puede realizar directamente desde la muestra sin diluir.

- RECuento POR FILTRACIÓN: se utilizan habitualmente cuando el microorganismo está en muy pequeña cantidad en la muestra y se necesita mucho volumen de muestra. Para ello pasamos un determinado volumen de ésta (aprox. 100mL) a través de un filtro que no deja pasar a los m.o y se filtra al vacío (generalmente el diámetro del poro es de 0,05 μ m, aunque depende del tipo de m.o). Retiramos el filtro con unas pinzas estériles y lo depositamos directamente sobre el medio de cultivo. Incubamos y transcurrido el tiempo necesario realizamos el recuento.
- MÉTODO DE N.M.P. (Número más Frecuente): basado en un método estadístico. Dependiendo del número de m.o que sospechamos que puede tener la muestra existen distintas tablas de trabajo de números más probables. Se utiliza sobre todo en la industria, para el análisis de agua.
- MÉTODO DE RECuento DIRECTO AL MICROSCOPIO:

- ◊ Se basa en contar la superficie de un cuadrado de 1 cm de lado dibujado en un portaobjetos en el que hemos depositado 0,1 mL de muestra. Habría que contar el mayor número de campos posible y hacer una media teniendo en cuenta la cantidad añadida y el área del cuadrado.
- ◊ Utilizando una cámara de recuento.

MÉTODOS INDIRECTOS

- **ESPECTROFOTOMETRÍA:**
 - ◊ TRANSMITANCIA (T)
 - ◊ ABSORBANCIA (A) O DENSIDAD ÓPTICA

Determinamos la turbidez, que estará directamente relacionada con la cantidad de células presentes en la muestra. Se suele expresar en %T o bien como A o densidad óptica.

Calculamos la concentración de una muestra en función de la cantidad de luz que absorbe o que emite cuando la muestra es atravesada por un haz de luz.

Con los datos de Absorbancia podemos proponer una correlación entre A (eje de ordenadas) y el recuento hecho en placa (eje de abscisas). Con esto nos ahorraríamos hacer diluciones en muestras futuras, solamente tendríamos que interpolar.

- **ACTIVIDAD METABÓLICA:** Se basa en determinar la cantidad de microorganismo en función de alguno de los productos que se producen en el metabolismo bacteriano:
 - ◊ ÁCIDO
 - ◊ CO₂
 - ◊ ENSAYOS REDUCCIÓN: mide directa o indirectamente el consumo de O₂ (Ej. Leche + azul de metileno).
- **PESO SECO:** está indicado cuando lo que queremos hacer es la determinación de una masa bacteriana de formas filamentosas (Hongos–Mohos).

5.10. **MÉTODOS DE SIEMBRA**

MÉTODO GENERAL: TOMA DE MUESTRAS DE CULTIVO.

La mayoría de las veces, la muestra no se toma directamente de la muestra patológica (Ej. Torunda), sino que una vez obtenida la muestra sembramos en un medio general e incubamos durante 24 horas. De esta placa es de donde tomaremos la muestra para realizar el cultivo final. Por lo tanto estamos haciendo una RESIEMBRA.

• **Resiembra a partir de un medio LÍQUIDO:**

- Esterilizar el asa de siembra: introducimos el asa de siembra a la llama del mechero hasta que se ponga al rojo. Esperamos a que se enfríe.
- Destapar el tubo que contiene el medio líquido: se hace con la misma mano que cogemos el asa de siembra.
- Flameamos la boca del tubo: pasamos la boca de tubo por la llama del mechero.
- Introducimos el asa y cogemos la muestra.
- Volvemos a flamear la boca del tubo.
- Tapamos el tubo que contiene el medio líquido.
- Realizamos la siembra.
- Esterilizamos.

• **Resiembra a partir de un medio SÓLIDO:**

- Si el medio sólido se encuentra en un TUBO: el procedimiento es igual que en el caso de resiembra a partir de un medio líquido, salvo que la muestra se toma arrastrando el asa por la superficie del cultivo, teniendo especial cuidado de no coger sólo medio de cultivo.
- Si el medio sólido se encuentra en una PLACA:

- Esterilizamos el asa y esperamos a que se enfríe.
- Levantamos la tapa de la placa de Petri lo imprescindible para introducir el asa de siembra.
- Tomamos la muestra, pasando el asa sobre la superficie de las colonias obtenidas.
- Tapamos la placa de Petri.
- Realizamos la siembra.
- Esterilizamos.

Estos métodos generales se utilizan para INOCULAR o bien para AISLAMIENTO.

- PARA INOCULAR: la resiembra se puede hacer tanto en un medio de cultivo líquido como en un medio de cultivo sólido:
 - En un medio de cultivo LÍQUIDO:
 - ◊ Mediante un asa de siembra.
 - ◊ Con una pipeta estéril.
 - ◊ Con un hisopo o escobillón (varilla en cuyo extremo se sitúa una torunda).
 - En un medio de cultivo SÓLIDO:
 - ◊ En placa:
 - ◊ Siembra en masa (tb para recuento)
 - ◊ Siembra en superficie: (tb para recuento)

*Hisopo

*Inundación: se añade un volumen determinado sobre la superficie del medio de cultivo. Al cabo de cierto tiempo se retira con una pipeta estéril el líquido sobrante que no haya sido absorbido por el medio de cultivo.

- ◊ En tubo:
- ◊ En estría: deslizamos el asa por la superficie del medio de cultivo en zig-zag.
- ◊ En picadura.

- PARA AISLAMIENTO: Lo utilizamos cuando deseamos obtener colonias lo más separadas posibles y así poder identificar fácilmente el tipo de microorganismo presente en la muestra.
- Por dilución
- Por agotamiento:
 - ◊ Estría única.
 - ◊ Estría múltiple.

AISLAMIENTO POR AGOTAMIENTO

- **ESTRÍA ÚNICA:** Depositamos la muestra lo más alejado de nosotros y realizamos la siembra en forma de zig-zag. De esta forma vamos descargando la muestra del asa. Es importante no volver a repasar el trozo de medio de cultivo que ya hemos sembrado. Para conseguir que al final de la estría tengamos colonias aisladas es importante que al principio hagamos la estría más junta y que la cantidad de muestra tomada en el asa sea la adecuada.
- **ESTRÍA MÚLTIPLE:** En esta técnica de aislamiento por agotamiento se realizan varias estrías. Esto se puede llevar a cabo flameando el asa de paso en paso, es decir, de estría en estría, o sin flamear el asa. Además, dependiendo de la forma en la que hagamos las estrías, existen varios tipos de estriados:
- Estriado sobre cuatro cuadrantes: Se utiliza cuando queremos conservar algún microorganismo que nos interesa. Consiste en sembrar uno a uno los cuadrantes, sin flamear el asa entre estría y estría, de tal forma que en el cuarto cuadrante, al ir agotando la muestra del asa, tendremos los microorganismos aislados.
- Esterilizando asa entre siembra y siembra: Consiste en realizar un primer estriado en uno de los extremos de la placa, esterilizar el asa, girar un poco la placa y realizar otro estriado introduciendo el asa en el primer estriado para ir arrastrando la muestra y volver a repetir esta operación con un tercer estriado:
- Sin esterilizar el asa entre siembra y siembra: Se lleva a cabo igual que en el caso anterior salvo en que en esta técnica no se flamea el asa entre la realización de los estriados y por lo tanto no es necesario arrastrar la muestra de las primeras siembras:

6. LA CÉLULA PROCARIOTA. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA BACTERIANA

Células vivas:

- Procariotas: tienen prenúcleo (bacterias).
- Eucariotas: tienen un núcleo verdadero.

CÉLULAS PROCARIOTAS

- ♦ El material genético no se encuentra dentro de una membrana.
- ♦ Carece de orgánulos rodeados de membrana (Ej. Retículo endoplásmico).
- ♦ Sus paredes celulares contienen casi siempre peptidoglucano.
- ♦ Suelen dividirse por fisión binaria.
- ♦ Su DNA no está asociado a proteínas de la clase de las histonas (proteínas cromosómicas).

6.1 MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS

- ◊ Espiral: VIBRIOS; ESPIRILOS Y ESPIROQUETAS.
- ◊ COCOS
- ◊ BACILOS

COCOS:

Tienen normalmente forma esférica, aunque también podemos encontrarlos ovalados, alargados o con una de sus caras planas.

En función de la forma en que se agrupan los podemos diferenciar en:

- Diplococos: se agrupan por parejas.
- Tetradas: grupos de cuatro.
- Sarcinas: agrupación cúbica.
- Estafilococos: agrupación en forma de racimos de uva.
- Streptococos: las células bacterianas se observan formando una cadena.

BACILOS

Son células alargadas. En función de la forma en la que se agrupan, diferenciamos:

- Diplobacilos
- Streptobacilos
- Cocobacilos

En la mayoría de los casos suelen presentarse de forma aislada. A veces aparecen al microscopio formando una empalizada () o en forma de letras chinas ().

VIBRIOS

Son bacilos alargados en forma de coma. El más importante desde el punto de vista químico es el que produce el cólera.

6.2. ESTRUCTURA DE LA CÉLULA BACTERIANA

- **ESTRUCTURAS EXTERNAS A LA PARED CELULAR:**
- **GLUCOCÁLIX:** es un polímero gelatinoso que suele estar compuesto de polisacáridos o bien de polipéptidos, o de ambos. Si esta sustancia está adherida firmemente a la pared celular constituirá la Cápsula (que proporciona mayor virulencia). Si, por el contrario, está sin organizar y débilmente unido a la pared celular lo denominamos Capa Mucilaginosa.

Su función principal es la de permitir a la célula adherirse a una gran variedad de superficies.

- **FLAGELOS:** son largos apéndices filamentosos que impulsan a las bacterias. Permiten a la bacteria desplazarse en el medio donde se encuentra siempre y cuando el medio tenga una consistencia líquida. Al proceso de acercarse o alejarse a un estímulo se le denomina Taxis. Estos estímulos pueden ser químicos o luminosos y a su vez, los estímulos pueden ser positivos (atrayentes) o negativos (repelente).

La movilidad bacteriana se puede estudiar:

- ◆ En medio sólido: siembra en picadura.
- ◆ En fresco: usando un portaobjetos excavado.

En función de la disposición que tengan los flagelos, podemos dividir a las bacterias:

- ◆ **Flagelos Monótricos:** un solo flagelo en el exterior de la bacteria.
- ◆ **Anfríticos:** dos flagelos, uno en cada extremo.
- ◆ **Lofótricos:** dos o más flagelos en uno o ambos extremos de la bacteria.
- ◆ **Peritricos:** varios flagelos alrededor de toda la célula.
- ◇ **FILAMENTOS AXIALES:** son propios de las espiroquetas. Es una estructura que envuelve a la célula de un extremo a otro en forma de sacacorchos:

Permite la movilidad en aquellos medios que tienen una consistencia densa.

- **FIMBRIAS O PILI:** especie de vellosidades que generalmente rodean a la bacteria de forma parecida a los flagelos pero más cortos y más delgados:
 - ♦ Fimbrias comunes: permiten la adhesión a determinadas superficies.
 - ♦ Pili sexuales: permiten el intercambio entre dos células de material genético.

◊ **PARED CELULAR:** es una estructura compleja, semirrígida y que es responsable de la morfología característica de la célula. Además, envuelve al citoplasma protegiendo a las estructuras que se encuentran en el mismo.

Composición: está compuesta por un grupo de mucopolisacáridos que es el PEPTIDOGLUCANO. El peptidoglucano está formado por unidades repetidas de un disacárido unido a cadenas de 4 ó 5 aminoácidos. Los monosacáridos que forman este peptidoglucano son N-acetil glucosamina y el N-acetil murámico. Aparecen alternados formando cadenas y, a cada cadena del acetil murámico se une una cadena lateral de tetrapéptidos. Las cadenas laterales adyacentes de tetrapéptidos pueden unirse a través de puentes peptídicos cruzados de 4 a 5 aminoácidos.

En la mayoría de las **bacterias Gram+** la pared celular consta de varias capas de peptidoglucano. Esta disposición da lugar a una estructura muy rígida.

Las cadenas de peptidoglucano son considerablemente más espesas en las bacterias Gram+ que en las Gram-, además, las paredes celulares de las bacterias **Gram+** contienen ácidos teitoicos, que controlan la entrada y salida de cationes y tienen una función en el crecimiento celular.

Las **bacterias Gram-** contienen peptidoglucano, pero en una proporción muy pequeña y, además no poseen ácidos teitoicos. En las Gram-, el peptidoglucano se encuentra en el espacio periplásmico, que es el espacio existente entre la membrana citoplasmática y la membrana externa. Esta membrana externa está formada por lipoproteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos.

◊ **ESTRUCTURAS INTERNAS A LA PARED CELULAR:**

- **MEMBRANA CITOPLASMÁTICA:** es una delgada estructura que se extiende por dentro de la pared celular encerrando el citoplasma de la célula.

Composición: está formada principalmente por fosfolípidos y también por proteínas.

Estructura: se observa como una bicapa en la que las moléculas de fosfolípidos están dispuestas en dos filas paralelas formando una bicapa fosfolipídica. Cada molécula de fosfolípido consta de una cabeza polar que es hidrófila; y de una cola apolar hidrófoba.

Función: actuar como membrana selectiva a través de la cual entran y salen diferentes sustancias de la célula gracias a unas proteínas llamadas Porinas (especie de canales que permiten el paso de nutrientes al interior del citoplasma). Además, interviene en la degradación de nutrientes y en la producción de energía.

- **MESOSOMAS:** se observan generalmente como uno o más plegamientos asociados a la zona nuclear, que suelen estar próximos al lugar de división de la célula.
- **CITOPLASMA:** es todo lo que hay en el interior de la membrana citoplasmática. Está constituido principalmente por agua (80%) y contiene principalmente proteínas, azúcares y lípidos.
- **REGIÓN NUCLEAR:** contiene una única molécula larga y circular de DNA bicatenario que no está rodeado por una cubierta nuclear. Además, en la región nuclear también se encuentran plásmidos, que son elementos genéticos extracromosómicos.
- **RIBOSOMAS:** intervienen fundamentalmente en la síntesis de proteínas.

- **INCLUSIONES:**

- ◆ Corpúsculos metacromáticos (granos de volutina): su función principal es actuar como reserva del fósforo inorgánico.
- ◆ Gránulos de polisacáridos: contienen almidón. Se ponen de manifiesto con tinciones yodadas.
- ◆ Lípidos
- ◆ Gránulos de azufre
- ◆ Vacuolas de gas
 - ◇ **ENDOESPORAS:** son células especializadas que se encuentran en forma latente. Aparecen cuando las condiciones son desfavorables y se forman en el interior de la membrana celular y pueden tener diferentes localizaciones:
 - Terminal
 - Subterminal
 - Central

Suelen ser del género *Bacillus* y del género *Clostridium*. A veces, el diámetro de la espora es superior al de la bacteria y la deforma. Esto también ayuda a la identificación de una determinada bacteria.

7. OBSERVACIONES DE MICROORGANISMOS

7.1 OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS VIVOS

La finalidad de la observación de microorganismos vivos es, por un lado observar la movilidad bacteriana, su morfología, algunas estructuras y además nos permite la observación de huevos y quistes de algunos parásitos.

Para realizar la observación de m.o. vivos se puede utilizar directamente los productos patológicos, o bien cultivos procedentes de medios de cultivo sólidos o líquidos.

Métodos para la observación de microorganismos vivos:

- **Examen fresco**
- Preparaciones húmedas
- Gota pendiente
- Examen en fresco nigrosina (colorante similar a la tinta china)
- **Coloraciones vitales:** teñir células mediante colorantes muy diluidos.

Examen en fresco:

PREPARACIONES HÚMEDAS

- **Material patológico líquido o medio de cultivo líquido:** tomar una gota y depositarla sobre un portaobjetos limpio y cubrirla con un cubre. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión y poca luz (condensador abajo).
- **Material patológico sólido o medio de cultivo sólido:** colocamos sobre el porta una gota de agua destilada estéril y sobre ella añadimos el material a examinar que tomamos con un asa anteriormente esterilizada, y lo cubrimos con un cubre. Observamos al microscopio con el objetivo de inmersión y poca luz.

MÉTODO DE LA GOTA PENDIENTE

Necesitamos un porta excavado y cubreobjetos. Depositamos el material de estudio sobre el cubreobjetos, colocamos el porta excavado sobre el cubre y le damos la vuelta al porta. Observamos la gota pendiente en la

que veremos sobre todo la movilidad (objetivo de inmersión, poca luz).

EXÁMEN EN FRESCO CON NIGROSINA:

Depositamos sobre el porta una gota de la negrosina. Sobre la gota añadimos la muestra patológica y lo extendemos ligeramente para observarlo al microscopio. Veremos un fondo negro con formas blanquecinas de forma regular (si vemos formas transparentes de forma irregular se corresponden con trozos del porta que no han sido cubiertas por el tinte).

Coloraciones vitales: El colorante puro puede lesionar estructuras celulares, por eso se utilizan colorantes muy diluidos (1/1000; 1/10.000). El más utilizado es el Azul de Metileno. Realizaríamos la dilución pertinente del azul de metileno y en un porta limpio añadiríamos una gota del mismo. Sobre esta gota podremos añadir una gota del medio de cultivo líquido o bien formar una emulsión con la muestra sólida tomada de una placa de cultivo. Sobre la mezcla coloraríamos el cubre (sin presionarlo) y observaríamos al microscopio con el objetivo de inmersión. La adición del colorante también se puede hacer una vez colocado el cubre, con una pipeta cargada con el mismo y que va descargando el colorante por capilaridad.

7.2 PREPARACIONES FIJADAS Y TEÑIDAS

Objetivo: El objetivo de estas preparaciones es observar la morfología, la agrupación bacteriana y determinadas estructuras bacterianas.

Se pueden preparar directamente de la muestra clínica, o bien a partir de medios de cultivo sólidos o líquidos, donde se han desarrollado los microorganismos que vamos a estudiar.

Clasificación: Las tinciones se clasifican en:

- **Simples:** se utiliza un único colorante.
- **Diferenciales:** GRAM, A.A.R. (Ácido Alcohol Resistente)
- **Estructurales:** cápsulas, inclusiones, flagelos, esporas.

Fases generales de una tinción:

- **Realizar el frotis:** se trata de una extensión con el material patológico, ya sea directamente desde la muestra o de un medio de cultivo:
 - Si la muestra se encuentra en una torunda, se realiza el frotis directamente con ella sobre el portaobjetos.
 - Si el material procede de un medio de cultivo sólido, hacemos una emulsión con una gota de agua destilada estéril y la extendemos por el portaobjetos.
- 2. **Secado:** se realiza al aire. Es conveniente no coger mucho material para que seque antes. Si no está completamente seco, al lavar se desprenderá la muestra.
- 3. **Fijación.** Se puede llevar a cabo por dos procedimientos:
 - ♦ **Calor:** coagula las proteínas de las bacterias y esto fija a las bacterias al porta. Consiste en pasar el frotis (con la siembra hacia arriba) por la llama del mechero.
 - ♦ **Alcohol:** consiste en sumergir el porta con el frotis, generalmente en metanol durante 3–5 minutos.
- 4. **Coloración:** generalmente se utilizan colorantes básicos. Utilizaremos un solo colorante para las tinciones simples y dos o más para las tinciones estructurales. Consiste en ir añadiendo gotas sobre el

frotis hasta que éste quede cubierto y esperar un determinado tiempo.

5. Lavado: consiste en eliminar todo el colorante que no haya sido cogido por las bacterias. Se lavará hasta que no se desprenda el colorante. Es importante no aplicar el chorro de agua directamente en el frotis.

6. Secado y observación al microscopio con el objetivo de inmersión.

Tipos de Colorantes

- ◆ Según su procedencia, podemos clasificarlos en:
 - ◆ Naturales
 - ◆ Sintéticos
 - ◇ Según sus características químicas, los clasificamos en:
 - Ácidos: pícrico
 - Básicos: Azul de Metileno, Cristal Violeta, Safranina, Fucsina, etc
 - Neutros: Giemsa

Los colorantes son sales que están compuestas por un ión positivo y otro negativo, uno de los cuales es coloreado y se llama cromóforo. Este cromóforo es el ión positivo en los colorantes básicos, y el ión negativo en los colorantes ácidos.

Los colorantes ácidos serán repelidos por las bacterias porque éstas suelen tener un pH ácido, sin embargo tendrán tendencia por los colorantes básicos.

TINCIÓN SIMPLE

Utiliza un único colorante. Cualquier colorante básico nos sirve:

- ◆ Azul de Metileno ----- 1-5 minutos.
- ◆ Fucsina básica ----- 1-3 minutos.
- ◆ Safranina ----- 1-5 minutos.

Nos da una idea de la morfología y agrupación. El procedimiento para su preparación es igual que el procedimiento general. Se realizan sobre un cristalizado y un puente.

TINCIONES DIFERENCIALES

• TINCIÓN DE GRAM

Nos da una idea de la morfología, agrupación y, además, nos permite diferenciar entre las bacterias Gram⁺ y las Gram⁻. Con el simple hecho de saber si la bacteria es Gram⁺ o Gram⁻ podremos tener una idea de qué medicamento administrar a un enfermo en caso de urgencia.

Si la muestra patológica es a partir de la cual vamos a preparar la tinción, es importante que las muestras sean lo más recientes posibles.

Si la muestra procede de un medio de cultivo, es importante que sean muy recientes y que se encuentren en la fase de crecimiento exponencial. Si son muy antiguos, las bacterias Gram⁺ pueden parecer Gram⁻.

Colorantes: se utilizan 2 colorantes: uno primario y otro secundario o de contraste.

Procedimiento

- Extender, secar, fijar
- Cubrir con cristal violeta o violeta de genciana durante 1 minuto.
- Lavar
- Cubrir 1 minuto con lugol (se considera un mordiente, es decir que intensifica el colorante aplicado como primario. Generalmente es una mezcla de una solución yodurada).
- Lavar
- Decolorar (alcohol metanol-acetona al 50%): si nos pasamos en la decoloración podemos estropear las bacterias Gram+, a pesar del grosor de su pared, debido a la acetona.
- Lavar
- Cubrir con Safranina durante 1 minuto
- Lavar

10. Secar y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

Resultados:

Observamos unas bacterias que no se han decolorado y que veremos violeta o morado oscuro, que serán las bacterias Gram+. También veremos otras bacterias que sí se han decolorado porque han captado el colorante de contraste (safranina) y que se verán de color rojo. Éstas últimas son las Gram-.

El violeta cristal entra en el interior tanto de las Gram+ como de las Gram-. En el caso de las Gram+, se forma un complejo violeta cristal-lugol en su interior, y debido al espesor de la capa de peptidoglucano este complejo no consigue salir de la bacteria cuando se decolora.

Por el contrario, en las bacterias Gram-, el alcohol-acetona si consigue decolorarlas y expulsa el violeta de su interior. Por eso, cuando añadimos el segundo colorante (el de contraste) éste sí entra en el interior de las Gram- que se tiñen de rojo.

Si la muestra la tomamos de un medio de cultivo sólido o líquido, es importante coger una pequeña cantidad de inóculo y extenderla bien, ya que si no veremos un cúmulo de bacterias pero no distinguiremos las Gram+ de las Gram-.

• TINCIÓN A.A.R. (Ácido Alcohol Resistente)

Función: Se utilizan para teñir e identificar bacterias del género *Micobacterium* (Tuberculosis, *Lepae*) y *Nocardia*.

La diferencia fundamental de estos dos géneros con el resto es que su pared celular está constituida generalmente por CERAS, que son las que nos permiten diferenciar entre las que son Ácido Alcohol resistentes de las que no lo son.

Procedimiento:

- Extender, secar y fijar
- Cubrir la preparación con un colorante: Carbol Fucsina (Rojo).
- Para favorecer la penetración del colorante en la célula, hay que mantenerlo en la llama del mechero, con calor suave, durante aproximadamente 5 minutos. Enfriar.
- Lavar
- Decoloramos: utilizamos alcohol clorhídrico hasta que no sale más colorante.
- Lavar

- Aplicar el colorante de contraste: Azul de Metileno
- Lavar
- Secar y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

La extensión se hace con el asa de siembra por todo el porta. Para aplicar el calor se puede utilizar una varilla de vidrio con un algodón en uno de sus extremos que empapamos con alcohol.

Resultados:

Las bacterias ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTES se verán ROJAS.

Las bacterias NO ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTES se verán AZULES.

La diferencia con la tinción de Gram son las bacterias que estamos intentando identificar.

Al estar constituidas por ceras, hay que utilizar el calor para favorecer la penetración de la Fucsina a través de ellas. Lavamos y decoloramos: en este caso se utiliza una mezcla de alcohol y clorhídrico que es más enérgico que el de la tinción de Gram y saca la Fucsina que se haya quedado retenida de las bacterias NO ácido alcohol resistentes (que luego se teñirán con el colorante secundario). Las bacterias que son ácido alcohol resistentes retienen el colorante inicial.

¿Porqué el clorhídrico no extrae el colorante de las bacterias ácido alcohol resistentes?: Porque el colorante carbol Fucsina es más soluble en las ceras que en el alcohol clorhídrico.

TINCIONES ESTRUCTURALES

• **TINCIÓN DE CÁPSULAS**

Función: sirve para teñir cápsulas. Las cápsulas son un factor de virulencia (capacidad de producir infección).

Métodos:

- ♦ **Método de Hiss:**
 - ♦ Extender, secar, fijar
 - ♦ Cristal Violeta vapor fluente durante 1 minuto
 - ♦ Lavar con solución de Sulfato de Cobre
 - ♦ Secar y observar al microscopio con el objetivo de inmersión
- ◊ **Método de Anthony:**
 - Extender, secar, NO fijar
 - Violeta de Genciana durante 2 minutos
 - Lavar con Sulfato de Cobre al 20%
 - Secar y observar al microscopio
- **Método de Burry-tinta china**
 - ♦ Extender, secar, NO fijar
 - ♦ Aplicar Fucsina diluida durante 2 minutos (ó Safranina)
 - ♦ Lavar, secar
 - ♦ Aplicar la tinta china
 - ♦ Secar y observar al microscopio

La tinta china tiene unas partículas muy grandes que no entran al interior de la bacteria. Primero aplicamos el colorante primario (Fucsina) que tiñe las bacterias capsuladas de rojo y después aplicamos la tinta china. Al observarlas al microscopio podemos ver que hay zonas en blanco que no

se corresponden con las bacterias. Se diferencian de las bacterias porque éstas tienen un tamaño regular, mientras que las manchas son irregulares.

- **TINCIÓN DE CORPÚSCULOS METACROMÁTICOS**

- ◆ Método de Loeffler (se suele realizar con yogurt natural)
 - ◇ Extender, secar, fijar
 - ◇ Cubrir con colorante Loeffler durante 3 minutos (azul)
 - ◇ Lavar, secar y observar al microscopio

C. TINCIÓN DE FLAGELOS

La tinción de flagelos es difícil debido a que los flagelos se retraen con mucha facilidad y se adhieren a la pared celular. Se debe realizar a partir de cultivos recientes (12–18 horas) previamente sembrados en agar semisólido.

- ◆ Hay que preparar una suspensión del microorganismo en agua destilada mezclándolo suavemente hasta conseguir una suspensión de aspecto lechoso. En el caso de que se sospeche que el microorganismo pueda ser patógeno, se debe utilizar para hacer la suspensión agua formolada al 10%.
- ◆ Los portas deben estar perfectamente limpios y secos. Los colocamos ligeramente inclinados y depositamos 2 gotas de la suspensión en un extremo del porta. Si el portaobjetos está bien limpio, las gotas se extenderán formando una delgada película por toda la longitud del porta.
- ◆ Secar al aire. NO se fija.
- ◆ Cubrir la extensión con el mordiente de Rodees durante 3–5 minutos.
- ◆ Lavar por inmersión en agua destilada.
- ◆ Cubrir con una solución de nitrato amoniacal, calentar casi hasta ebullición y dejarlo actuar durante 3–5 minutos.
- ◆ Lavar por inmersión, secar y observar al microscopio.

Resultado: Se observarán los flagelos de las bacterias móviles, porque alrededor del flagelo precipita el nitrato amoniacal.

D. TINCIÓN DE ESPORAS

- ◆ Extender, secar y fijar
- ◆ Cubrir con Verde Malaquita. Calentar hasta emisión de vapor de 8–10 minutos. Será necesario ir reponiendo el verde, según se vaya evaporando.
- ◆ Lavar
- ◆ Cubrir con Fucsina

Resultados: La espora se teñirá de verde. En una misma preparación podremos observar: Bacterias no esporuladas (interior rojo); Bacterias esporuladas (espora verde y fondo rojo) ó solo la espora (verde).

8. CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

8.1 TAXONOMÍA

Es la parte de la Biología que establece las clasificaciones de los seres vivos

distribuyéndolos en grupos relacionados entre sí.

Objetivos fundamentales: clasificar y establecer relaciones y diferencias entre un grupo y otro de organismos.

Valor práctico: Nos ayuda a identificar organismos que ya están clasificados.

Nos proporciona: un lenguaje universal y una referencia común para la identificación

La Taxonomía establece **7 divisiones:**

1. REINO 5. FAMILIA
2. PHYLUM 6. GÉNERO
3. CLASE 7. ESPECIE
4. ORDEN

Estas 7 divisiones dan lugar a una jerarquía, que establece relaciones filogenéticas, las cuales tratan de poner de manifiesto un ancestro común a una determinada especie. **Ejemplo:** para el oso pardo

- ◊ REINO: Animal o Metazoos.
- ◊ PHYLUM: Cordados
- ◊ CLASE: Mammalia (Mamíferos)
- ◊ ORDEN: Carnívoro
- ◊ FAMILIA: Ursidae
- ◊ GÉNERO: Ursus
- ◊ ESPECIE: Ursus arctos

Para definir a un ser vivo, normalmente se dan género y especie (en latín o en griego), a esta información se la conoce como **nomenclatura científica ó nomenclatura binómica:**

- **GÉNERO:** Suele ser un nombre. Siempre en mayúscula.
- **ESPECIE:** Suele ser un adjetivo. Se escribe en minúscula. Refiriéndonos a las bacterias, la especie es la población de células con características similares. Dentro de una misma especie podemos encontrar las **ESTIRPES O CEPAS**, que son descendientes de una sola célula, y que pueden compartir o no características similares a las de la especie.

8.2 CLASIFICACIÓN DE LOS SERES VIVOS EN 5 REINOS

- ◊ **MONERAS:** Seres vivos unicelulares formados por células procariotas (sin membrana nuclear). Pueden ser autótrofos y heterótrofos (Ej. Micoplasmas; Cianobacterias; Bacterias).

- ◇ **PROTISTAS:** Seres vivos unicelulares formados por células eucariotas (con membrana nuclear). Pueden ser autótrofos y heterótrofos (Ej. Protozoos; algas microscópicas).
- ◇ **HONGOS:** Seres vivos pluricelulares de características intermedias entre vegetales y animales, ya que no poseen clorofila para hacer la fotosíntesis y son heterótrofos (Ej. Mohos; Levaduras; Hongos Superiores).
- ◇ **METAFITAS:** Seres vivos pluricelulares que obtienen su energía de la luz solar. Son autótrofos (Ej. Los vegetales).
- ◇ **METAZOOS:** Seres vivos pluricelulares que obtienen su energía a partir de los nutrientes que ingieren con la dieta. Son heterótrofos (Ej. Los animales).

8.3 **CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE M.O**

- ◆ **Morfología:** Bacilos, Cocos, flagelos, gránulos metacromáticos,...
- ◆ **Tinciones:** diferenciales como la de Gram y la del A.A.R. Serán válidas siempre y cuando las bacterias tengan pared celular.
- ◆ **Características bioquímicas:** Se refiere a los sistemas enzimáticos específicos de cada bacteria, que en función de una serie de sustratos que ponemos a disposición de esa bacteria nos proporciona un producto u otro con el que podemos identificarla. Utilizamos los medio de cultivo diferenciales. (Ej. Enterobacterias–Oxidasa negativa; Pseudomonáceas–Oxidasa positiva).
- ◆ **Serología:** Ciencia que estudia el suero. Generalmente estudia la respuesta inmunitaria de un individuo frente a sustancias que son capaces de producir una respuesta por su parte (inmunógenos). La técnica más utilizada es la aglutinación, que puede ser directa (enfrentamos las bacterias que queremos identificar frente a determinados antisueros) ó

indirectas (se utiliza el suero del paciente donde buscamos los Ac).

- ♦ Fagotipia: bacteriófago o fago ! virus bacteriano.

Queremos poner de manifiesto frente a qué fagos es sensible un determinado grupo de bacterias. El fago infecta la bacteria y acaba produciendo su lisis. Los fagos son muy especializados, es decir, que afectan a una determinada especie bacteriana o incluso a una cepa de esa especie bacteriana. La lisis es lo que se utiliza para la identificación de la bacteria.

Técnica: sobre una placa, que contiene el medio de cultivo adecuado para el microorganismo que queremos identificar, sembramos el m.o y marcamos en la superficie de la placa (por detrás) varios cuadraditos donde pondremos diferentes bacteriófagos que afectan al m.o sembrado. Los lugares donde no haya crecido el m.o serán aquellos que se correspondan con los fagos que afectan al m.o (se habrá producido la lisis de los m.o).

- Hibridación de ácidos nucleicos: las técnicas de hibridación se basan en que si dos especies son similares o están emparentadas, una de las partes de las secuencias de sus aminoácidos también será similar.

DNA: Macromolécula compuesta por unidades repetitivas llamadas nucleótidos. Se trata de una cadena bicatenaria unida por puentes de Hidrógeno.

Nucleótidos: compuestos de una base nitrogenada (A, T, G, C), un grupo fosfato y una desoxirribosa (suele ser una ribosa).

El procedimiento de hibridación lo que mide es la capacidad de las cadenas de DNA para hibridizar con las cadenas de DNA de otro organismo. Cuanto mayor es el grado de hibridación, mayor será el grado de parentesco. Esta técnica se utiliza para la identificación rápida de bacterias utilizando las llamadas sondas de DNA.

Técnica: calentamos el DNA con el fin de separar ambas cadenas y a continuación se mezclan para comprobar el grado de hibridación de las distintas cepas bacterianas, que podrá ser:

- Total: los microorganismos serán los mismos.
- Parcial: los microorganismos comparten similitudes.
- No hibridación: los microorganismos son totalmente diferentes.

Sondas de DNA:

- ◊ Cogemos un fragmento de DNA de un m.o cualquiera que ha sido clonada en otra bacteria (normalmente se utilizan los E.coli).
- ◊ Estos fragmentos de DNA se marcan con una sustancia fluorescente.
- ◊ Si queremos identificar una bacteria desconocida a partir de las colonias crecidas en un medio de cultivo extraeríamos su secuencia de DNA tomando una colonia.
- ◊ Mediante calor separamos las cadenas de DNA y estas cadenas separadas las ponemos en contacto con las sondas que teníamos marcadas. Las incubamos a una determinada temperatura para que se produzca la hibridación.
- ◊ Se observan al microscopio de fluorescencia y, si vemos formas fluorescentes es que ha habido hibridación, y por lo tanto quiere decir que la cadena de DNA de la bacteria desconocida es similar a la de la bacteria que hemos utilizado como sonda.

· Recombinación y transferencia genética:

Consiste en el intercambio de genes entre dos moléculas de DNA para formar nuevas combinaciones de genes en un cromosoma. Existen varias formas de recombinación:

- Transposición ó Transformación: los genes se transfieren como DNA desnudo en solución.
- Conjugación: mediada por plásmidos (elementos extracromosómicos que para su duplicación no necesitan del DNA de la célula). La conjugación requiere, o bien un contacto directo entre las células, o un contacto de tipo sexual opuesto.
- Transducción: el DNA pasa dentro de un fago.
 - Otros métodos para clasificar microorganismos:
 - ♦ Secuencia de aminoácidos
 - ♦ Análisis de proteínas mediante electroforesis. Puede ser unidimensional (no diferencia entre carga y tamaño) ó bidimensionales (separa la carga del tamaño)
 - ♦ Composición de bases de ácidos nucleicos.

9. FLORA HABITUAL NORMAL. PRINCIPIOS SOBRE ENFERMEDADES.

9.1 SIMBIOSIS: Es la relación existente entre un microorganismo y su huésped. Existen distintos tipos de relaciones simbióticas:

- COMENSALISMO: Uno beneficia. Otro ni se beneficia ni es perjudicado (Ej. Corinebacterias de la conjuntiva del ojo ó las Micobacterias de los genitales).
- MUTALISMO: Se benefician los dos (Ej. E.coli).
- PARASITISMO: Uno se beneficia, perjudicando al otro.

9.2 PRINCIPIOS SOBRE ENFERMEDADES

La ciencia que estudia la enfermedad es la PATOLOGÍA, que va a estar relacionada, por lo tanto, con la causa de la enfermedad (Etiología), con la forma en la que se desarrolla (Patogénesis) y se ocupa de los cambios, tanto estructurales como funcionales, y de las consecuencias finales para el organismo.

INFECCIÓN Y ENFERMEDAD

La **infección** es la invasión o colonización por microorganismos patógenos.

La **enfermedad** es una infección que provoca cualquier desviación del estado

de salud del individuo. Se puede manifestar por varios tipos de evidencias:

- Síntomas: Manifestaciones subjetivas (Ej. Dolor).
- Signos: Manifestaciones objetivas (Ej. Fiebre).

Al conjunto de síntomas y signos se le denomina SÍNDROME.

CRITERIOS PARA IDENTIFICAR ENFERMEDADES

· Según como se desarrollan, tanto en el huésped como en el seno de la población:

- TRANSMISIBLES: Pasan de un huésped a otro, generalmente por contagio directo o indirecto (Ej. Tuberculosis).
- CONTAGIOSAS: Pasan con facilidad de un huésped a otro (Ej. Gripe).
- NO TRANSMISIBLES: No pasan de un huésped a otro (Ej. Tétanos).
- Según la frecuencia:
 - ♦ ESPORÁDICA
 - ♦ EUDÉMICA: Es constante en una determinada comunidad o población.
 - ♦ EPIDÉMICA: Afecta a muchos en períodos cortos de tiempo.
 - ♦ PANDÉMICA: Se da en lugares diversos y afecta a la mayoría de la población.

3. Según la gravedad y duración:

- ♦ AGUDA: Los síntomas se manifiestan rápidamente en un corto período de tiempo.
- ♦ CRÓNICA: Se desarrolla lentamente durante un tiempo prolongado (meses, años o no desaparece nunca).
- ♦ SUBAGUDA: Características entre medias de la aguda y la crónica.
- ♦ LATENTE: El sujeto está infectado por un microorganismo patógeno sin que manifieste ningún signo de la enfermedad.

4. Según el grado en que el cuerpo del huésped resulta afectado:

- ♦ GENERALES O SISTÉMICAS: son producidas o bien por el propio microorganismo, o bien por sus productos. La enfermedad es diseminada por el sistema circulatorio ó por el sistema linfático.
- ♦ LOCALES: Están limitadas a un lugar concreto del organismo. Dan lugar a un Foco de Infección que puede localizarse en la vía sanguínea o en la vía linfática.
 - ◇ Septicemia: Es generalizada. La multiplicación del microorganismo se puede producir en el torrente circulatorio
 - ◇ Bacteriemia: Afecta de forma generalizada. Se produce en el foco de infección y se disemina por el torrente circulatorio.
 - ◇ Toxemia (toxinas)
 - ◇ Viremia (virus)

5. Según el estado de las defensas:

- **INFECCIÓN PRIMARIA:** Producida por un microorganismo con el cual no había estado en contacto el paciente. Se relaciona con las enfermedades agudas.
- **INFECCIÓN SECUNDARIA:** Producida sobre, o al mismo tiempo, que la infección primaria. Se produce por microorganismos oportunistas.
- **INFECCIONES INAPARENTES O SUBCLÍNICAS:** Relacionadas con las enfermedades latentes. Al estar incontroladas no se pueden llevar a cabo actuaciones para su curación ya que no tenemos un diagnóstico.

DISEMINACIÓN DE INFECCIONES

Para que se produzca la diseminación de una infección es necesario que se den una serie de aspectos:

- ◆ Que exista un RESERVORIO
- ◆ Que exista una VÍA DE TRANSMISIÓN
- ◆ Que haya un determinado NÚMERO DE MICROORGANISMOS
- ◆ Que exista un INDIVIDUO SUSCEPTIBLE

Si alguno de estos eslabones se puede evitar (siendo más importantes el reservorio y el sujeto susceptible), podremos evitar la diseminación.

Reservorio: Fuente continua de infección que debe reunir por un lado unas condiciones adecuadas para el desarrollo y multiplicación del m.o y por otro es necesario que se produzca una oportunidad para la transmisión.

¿Qué puede actuar como reservorio?

- ◆ Humanos (forma directa o indirecta)
- ◆ Animales: zoonosis (contacto; ingestión de alimentos contaminados; insectos)
- ◆ Inanimados (agua; suelo)

Vía de Transmisión: es la forma a través de la cual el m.o pasa del reservorio al huésped:

- ◆ **Por contacto:**
 - ◇ Directo: transmisión de persona a persona.
 - ◇ Indirecto: objetos inanimados (fómites) como toallas, sábanas, vajillas,...
 - ◇ Gotitas: las que no se proyectan más allá de 1 metro del individuo.
 - **Por sustancias de uso común:** reservorio inerte (agua, alimento, sangre)
 - **Aérea:** por gotas que se proyectan a más de 1 metro.

- Núcleos opticales
- Partículas de polvo
 - ◆ Vectores: suelen ser artrópodos. Son un medio de transporte. Llevan directamente los microorganismos desde el reservorio al huésped. La forma de actuación puede ser mecánica (moscas) o biológica (picadura: el m.o sufre algún tipo de multiplicación en el interior del vector, y la infección se produce o bien por inyección o gracias a la picadura, que deja un hueco y el individuo, al rascarse, facilita la entrada del m.o).

ENFERMEDADES NOSOCOMIALES

Son todas aquellas enfermedades que se adquieren durante la estancia de un sujeto en el hospital. Aproximadamente del 5–15% de los pacientes ingresados en un hospital suele padecer algún tipo de enfermedad nosocomial.

Por regla general suelen ser causadas por microorganismos de la flora normal que penetran en el interior del organismo como consecuencia de algún procedimiento médico de los que habitualmente se realizan a una persona hospitalizada (Ej. E.coli y Pseudomonas).

También se pueden producir por contacto directo entre paciente–paciente y entre paciente–personal del hospital.

Los fómites también pueden actuar como reservorios y vehículos de transmisión (jeringas, catéteres,...)

DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Para que la enfermedad se pueda desarrollar son necesarios un reservorio, que se produzca la invasión, que exista un determinado número de m.o y que exista un sujeto susceptible.

Aún en el caso de que se dieran todos los factores anteriores, el sujeto susceptible debe cumplir unos factores de predisposición para que, además de la infección, se produzca o desarrolle la enfermedad:

- ◆ Sistema inmunitario deprimido como consecuencia de tratamientos médicos o algún tipo de enfermedad (cáncer, VIH,...)
- ◆ Ambiente Laboral

- ◆ Alimentación
- ◆ Factores genéticos
- ◆ Sexo
- ◆ Clima
- ◆ Higiene ambiental y personal

Una vez instaurada la enfermedad se suceden una serie de fases:

- ◆ Período de incubación: desde que el organismo penetra en el cuerpo hasta que se manifiesta la enfermedad
- ◆ Período prodrómico: se manifiestan moderadamente los signos y los síntomas
- ◆ Fase aguda
- ◆ Fase de mejoría: comienzan a desaparecer signos y síntomas
- ◆ Fase de convalecencia: se recupera el estado de salud.

9.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD MICROBIANA

PATOGENICIDAD: Capacidad que tiene un m.o de producir una enfermedad. Está relacionada con unos determinados mecanismos. Para que el m.o desarrolle estos mecanismos es necesario que exista una Vía de entrada, a través de la cual el m.o penetra en el organismo y que deberá ser óptima y preferente (Ej. Legionella: vía preferente la respiratoria):

- ◆ Mucosas (gastrointestinal; genitourinaria; respiratoria y conjuntiva)
- ◆ Piel
- ◆ Parenteral: heridas, mordeduras, cortes, pinchazos,...

VIRULENCIA: Término cuantitativo que se relaciona con el número de microorganismos que se requiere para causar la infección. Se suele expresar como:

LD50: número de microbios que producen la muerte en el 50% de los animales de experimentación en condiciones normalizadas.

ID50 ó DLM (Dosis Letal Mínima): Dosis necesaria para producir una infección demostrable en el 50% de los animales de experimentación.

INFECTIVIDAD: Capacidad que tiene un microorganismo de iniciar la enfermedad penetrando a través de mucosas o de la piel.

ADHERENCIA: Capacidad que tienen los microorganismos de adherirse a receptores específicos de las células mediante unas sustancias llamadas adhesinas que se encuentran generalmente en el glucocálix o en las fimbrias.

PRESENCIA DE CÁPSULAS EN EL MICROORGANISMO: Constituye un factor de virulencia porque impide la fagocitosis (dificulta la adhesión de los fagocitos al m.o).

PROTEÍNA M: Forma parte de la pared celular. Impide la adhesión de los fagocitos, impidiendo la fagocitosis. En algunos individuos se

encuentran Ac específicos frente a la proteína M en cuyo caso, esos Ac contrarrestan los efectos de la proteína M de forma que se puede producir la fagocitosis.

ENZIMAS: Son generalmente extracelulares y su acción consiste en destruir células y destruir material intercelular. Algunas de ellas son:

- ♦ **LEUCOCIDINAS:** Su mecanismo de acción es sobre los neutrófilos y macrófagos. Principalmente las poseen m.o pertenecientes a Estafilococos y Estreptococos. Las de los Estreptococos producen la degradación de los lisosomas del huésped, con lo que se produce una liberación de enzimas hidrolíticas que, a su vez, dañan a otras estructuras celulares (aumentan las lesiones).
- ♦ **HEMOLISINAS:** Principalmente las poseen los Estafilococos, Estreptococos y Clostridium. Su mecanismo de acción es específico para distintos tipos de glóbulos rojos.
- ♦ **COAGULASAS:** Generalmente producidas por m.o del género Estafilococo, transforman el fibrinógeno en fibrina y dan lugar a coágulos.
- ♦ **QUINASAS:** 2 tipos: Estreptoquinasas (fibrinolisisina) y Estafiloquinasas.
- ♦ **HALURONIDASAS:** Actúan sobre el ácido hialurónico (ácido que se encuentra entre las células funcionando como elemento de cohesión o sostén entre las células).
- ♦ **COLAGENASA:** Actúan sobre el colágeno.

9.4 LESIONES EN EL HUÉSPED

Las lesiones en el huésped se producen como consecuencia de los mecanismos de patogenicidad anteriores y pueden dar lugar a:

- ♦ **LESIÓN DIRECTA:** Se produce en un sitio concreto.
- ♦ **REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD:** Alergia (inmediata o retardada)
 - ◊ TIPO I: anafilácticas
 - ◊ TIPO II: citotóxicas (Ej. Incompatibilidades sanguíneas)
 - ◊ TIPO III: inmunocomplejo (Ej. Factor reumatoideo)
 - ◊ TIPO IV: células efectoras tipo T
- **TOXINAS:** Transportadas por el sistema circulatorio o linfático hacia lugares lejanos de donde se produjo la lesión (una infección local pasa a ser una infección sistémica). Las toxinas se pueden clasificar en EXOTOXINAS Y ENDOTOXINAS.

EXOTOXINAS: Son material proteico, fundamentalmente enzimas, que se producen como consecuencia del crecimiento y del metabolismo de la célula, y que son liberadas al medio exterior. La mayoría de ellas están producidas por bacterias Gram+.

La capacidad para producir exotoxinas viene dada por la presencia de genes tóxicos que se encuentran en plásmidos bacterianos.

Son solubles en los fluidos corporales, lo que permite su rápida dispersión por el organismo.

Su acción consiste en destruir o bien determinadas partes de la célula, o bien inhibiendo alguna de las funciones metabólicas de la célula.

Dependiendo del mecanismo de acción, se clasifican en:

- ◆ Citotoxinas: Mata o altera funciones celulares.
- ◆ Neurotoxinas: Impiden la transmisión normal de impulsos nerviosos.
- ◆ Enterotoxinas: Producen lesiones en las células que revisten en tracto gastrointestinal.

Exotoxinas más importantes:

- ◇ TOX. DIFTÉRICA: Producida por *Corinebacterium diptheriae*. Sólo se produce cuando está infectada por un fago lisogénico portador de un gen tox. Es una proteína formada por dos tipos de polipéptidos:
 - Polipéptido A: Es el activo. Capaz de producir la lesión (impide la fabricación de proteínas, es por lo tanto, una Citotoxina)
 - Polipéptido B: Solamente actúa permitiendo la unión de la toxina a la célula.
- TOX. ERITROGÉNICA: Producida por el *Streptococcus pyogenes*, que tiene genes para sintetizar 3 tipos de citotoxinas (A, B, C). Lesionan los capilares sanguíneos bajo la piel.
- TOX. BOTULÍNICA: Producida por el *Clostridium botulinum*. Es una toxina que no se libera al exterior hasta que no se produce la muerte celular. Es una neurotoxina que bloquea la transmisión de impulsos nerviosos desde los nervios hasta el músculo. Como consecuencia se produce una parálisis por falta de tono muscular.
- TOX. TETÁNICA: Producida por el *Clostridium tetani*. Su acción se ejerce sobre el Sistema Nervioso Central, generalmente sobre células nerviosas que controlan la contracción de diversos músculos esqueléticos dando lugar, en el individuo, a contracciones musculares incontroladas características del tétanos.
- ENTEROTOXINA COLÉRICA: Producida por el *Vibrio cholerae*. Formada por dos polipéptidos (A,

B). Actúa sobre las células epiteliales que recubre el intestino dando lugar a una excesiva producción de agua y electrolitos.

- **TOX. TERMOLABIL:** Producida por el E.coli cuyo mecanismo es similar al de la toxina colérica. La Enterotoxina estafilocócica es producida por el Estafilococo aureus con un mecanismo similar al de la toxina colérica.

ENDOTOXINAS: Forman parte de la porción externa de la pared celular de la mayor parte de las células Gram⁻. La endotoxina se encuentra en los lipopolisacáridos en forma de lípido A.

Los efectos solamente se producen como consecuencia de la muerte bacteriana y posterior liberación de las endotoxinas. Todas ellas producen los mismos signos y síntomas independientemente del microorganismo que las produzca y la respuesta del huésped es siempre la misma: fiebre, debilidad y dolor generalizado.