

## TECNICAS UTILIZADAS EN EL DIAG

### NOSTICO BACTERIOLOGICO

Pasante M. V. Ricardo Flores

Pasante M. V. Pascual Rojas

### MANEJO DE TEJIDOS

Al recibir muestras para estudio bacteriológico, la gran mayoría de las veces no podemos saber las condiciones en que fueron tomadas. - Prácticamente es imposible evitar contaminaciones en una necropsia de campo, por lo que es condición indispensable aseptizar las muestras por quemadura, realizándose el siguiente procedimiento:

1. - Se colocan las muestras (vísceras) en una charola
2. - Se calienta al rojo vivo un caudín de cobre o bien una espátula ancha de metal.
3. - El caudín se aplica sobre la superficie del órgano procurando quemar una superficie aproximada de por lo menos 10 cm<sup>2</sup>.
4. - Se introduce el asa de platino o bien la punta de una pipeta -- Pasteur estéril, con el fin de tomar el material que será inoculado en los medios de cultivo. Cuando la víscera en cuestión posee una superficie muy sólida que impide introducir el asa o la pipeta con facilidad, es necesario hacer un pequeño corte sobre el órgano con un bisturí o tijeras previamente estérilizadas a la flama.
5. - Si se desea hacer inoculación en medios líquidos, debe cortarse un trozo pequeño del órgano por abajo de la superficie quemada.

6. - Una vez obtenido el inóculo, éste se siembra en medios sólidos de MacConkey y Agar Sangre. Estos son los medios usados en estudios de bacteriología "Ciega aerobia". De acuerdo con la orientación clínico-patológica del caso se deberán usar medios específicos.
7. - Las placas de Agar Sangre y MacConkey, deben incubarse durante 18-24 horas a 37°C; pasado este tiempo se hace la lectura y clasificación de colonias.
8. - Se hacen frotis a partir del crecimiento y se tiñen con el método de Gram y, posteriormente tinciones específicas.
9. - Una vez seleccionado el germen, se hacen las pruebas bioquímicas correspondientes

## TECNICAS DE TINCION

### Tinción de Gram (Modificación de Hucker)

1. Hacer el frotis y fijarlo con calor suave.
2. Cubrir con Cristal Violeta durante 2 minutos.
3. Lavar con agua destilada.
4. Cubrir la preparación durante 1 minuto con Lugol.
5. Lavar con agua destilada.
6. Decolorar con Alcohol Acetona, hasta que la preparación ya no desprenda colorante (aproximadamente 30 segundos).
7. Lavar con agua destilada.
8. Cubrir con Safranina durante 10 segundos.
9. Lavar con agua destilada, secar con papel filtro y observar. Gram positivos de color azul. Gram negativos de color magenta violáceo.

### Preparación de las Substancias.

1. Sol. Madre de Cristal Violeta
 

Cristal Violeta	10	gm.
Alcohol Etilico (95%)	100	ml.
2. Solución de Oxalato
 

Oxalato de Amonio	1	gm.
Agua destilada	100	ml.

Mezclar 20 ml. de la solución No. 1 con 80 ml. de la solución No. 2.
3. Lugol
 

Yodo (en cristales)	1	gm.
Yoduro de Potasio	2	gm.

Disolverlo completamente en 10 ml. de agua destilada y después agregar agua suficiente para completar 200 ml. Guárdese en frascos color ámbar.
4. Decolorante
 

Alcohol Etilico (95%)	250	ml.
Acetona	250	ml.
5. Contraste
 

Safranina	2.5	gm.
Alcohol Etilico	100	ml.

La solución madre de Safranina debe diluirse en agua destilada en proporción de 1:4.

La Safranina puede ser substituida por Fucsina Fenicada diluida. Se usa una solución de Fucsina Fenicada (según el método de Ziehl Neelsen) y se diluye en agua destilada en proporción de 1:10 ó 1:20.

## II. Tinción de Azul de Metileno Alcalino de Loeffler.

1. Hacer el frotis y fijarlo con calor suave.
2. Cubrir la preparación con el colorante, durante 3-5 minutos.
3. Lavar con agua destilada.
4. Secar con papel filtro y observar al microscopio.  
Bacterias de color azul.

### Preparación de las Substancias:

Azul de Metileno	0.5 gm.
Solución de Hidróxido de Potasio al 1%	1.0 ml.
Alcohol	30.0 ml.
Agua	100.0 ml.

Calentar el agua a 50°C y colocar el colorante agitando. Agregar los otros componentes y filtrar.

## III. Método de Ziehl-Neelsen (ácido resistentes).

1. Hacer el frotis y fijarlo con calor suave.
2. Cubrir la laminilla con un papel filtro.
3. Se cubre la preparación con Fucsina Fenicada y se coloca en la -- platina de Koch, se calienta con flama leve durante 5 minutos. El papel se elimina lavando la preparación con agua destilada. No debe permitirse la ebullición del colorante.
4. Decolorar la laminilla con varias aplicaciones de Alcohol Acido, - hasta obtener un color rosa pálido.  
El Alcohol Acido debe aplicarse hasta que ya no haya eliminación de colorante. Usualmente bastan 2 minutos.
5. Lavar con agua y aplicar Azul de Metileno durante 20-30 segundos.
6. Lavar con agua destilada y dejar secar. Observar con lente de inmersión.

### Preparación de las Substancias:

1. Fucsina Fenicada  
Fucsina Básica 0.3 gm.  
Alcohol Etilico 10.0 ml.  
Esta solución se mezcla con Fenol (en cristales fundidos) 5.0 ml.  
Agua destilada 95.0 ml.
2. Alcohol Acido  
Acido Clorhídrico (concentrado) 3.0 ml.  
Alcohol Etilico (95%) 97.0 ml.
3. Contraste  
Azul de Metileno (certificado) 0.3 gm.  
Agua destilada 100.0 ml.

## IV. Fucsina fenicada (Prueba rápida para diagnóstico de Vibrio)

1. Hacer el frotis y fijarlo con calor suave.
2. Se cubre con colorante 1-2 minutos.
3. Lavar con agua destilada.
4. Secar con papel filtro y observarlo a inmersión.

La Fucsina se prepara igual que para el método de Ziehl-Neelsen.

## V. Tinción de Soltys

( Se usa para observar la cápsula de Bacillus anthracis. Tiene la -- ventaja de matar al germen a la vez que preserva la cápsula).

### Procedimiento

1. Hacer el frotis.
2. Fijar con Zenker durante 3-4 minutos.
3. Lavar con agua.
4. Teñir con Azul de Metileno boricado durante 10 minutos.
5. Lavar y observar. Los bacilos se tiñen de azul y la cápsula se -- observa de color rosa pálido.

### Preparación de Substancias.

- a) Solución de Zenker  
Cloruro de Mercurio 5.0 gm.  
Bicromato de Potasio 2.5 gm.  
Sulfato de Sodio 1.0 gm.  
Agua destilada 100.0 ml.
- b) Azul de Metileno boricado  
Azul de Metileno 2.0 gm.  
Bórax 5.0 gm.  
Agua destilada 100.0 ml.

## VI. Método de Hansen (Brucella)

1. Hacer el frotis y fijarlo.
2. Teñirlo con Azul de Metileno 2 minutos
3. Lavar con agua destilada.
4. Teñir con solución acuosa de Safranina al 1%, durante 7 segundos.
5. Lavar con agua destilada, secar y observar.

Las Brucellas se tiñen de color azul. Otras bacterias, de color -- rojo.

### Preparación de Substancias.

- a) Azul de Metileno .3 gm.  
Agua destilada 100.0 ml.

- b) Hidróxido de Potasio (KOH) al 0.04%  
 Antes de usarse se mezclan 3 ml. de Azul de Metileno con 10 de KOH.
- c) Safranina 1.0 gm.  
 Agua destilada 100.0 ml.

Determinación de Sensibilidad Antibiótica  
 (Antibiograma)

Los medios de cultivo usados para la realización de esta prueba son medios sólidos como el Agar nutritivo y Triptosa Agar, los cuales se caracterizan por su aspecto traslúcido, permitiendo efectuar la lectura con mayor precisión.

Se hace una suspensión en solución salina estéril o caldo nutritivo, con los gérmenes obtenidos, ya sea de placas con cultivos puros o bien a partir del material en estudio. Una vez hecha la suspensión se humedece con ésta un hisopo estéril el cual se frota suavemente sobre la placa de Agar nutritivo o Triptosa. Con una pinza estéril se toma un disco de antibióticos y se coloca sobre la placa con inóculo y después se incuba a 37°C durante 24 horas y se hace la lectura.

La interpretación de esta prueba se hace valorando las áreas de inhibición de crecimiento bacteriano en torno al antibiótico correspondiente.

Medios de cultivo	Gram Positivas	Gram Negativas
Gelosa Sangre en condiciones normales	Colonias grandes Staphylococcus B. anthracis B. antracoides	Col. grandes Bordetella Coliformes Pseudomonas Friedlanders (rugosas) Proteus (extendidas en olanes) Paracolón
Gelosa Sangre en condiciones especiales	Clostridia (anaerobiosis)	Col pequeñas Pasteurella Haemophilus
MacConkey	Staphylococcus (rojas) Anthrax Antracoides	Brucella Vibrio (mezcla de gases)
	Streptococcus (muy pequeñas y rojas) Listeria (muy leves)	Salmonella (gris) Coli (rojo) Pseudomona (rosadas) Proteus (gris) Friedlanders (rosadas) Paracolón (rosadas)