



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

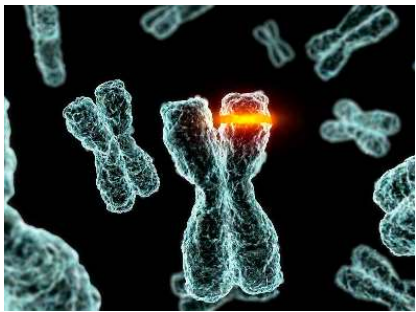


Laboratori de Microbiologia

Curs acadèmic 2019-2020

Departament de Microbiologia i Ecologia

Facultat de Ciències Biològiques



Prof. Dr. María Consuelo Pina Pérez
e-mail: maria.c.pina@uv.es

Laboratori de Microbiologia



❖ Materials que han de portar els alumnes

- Bata de laboratori
- Quadern de laboratori
- Llibreta de laboratori
- Retolador permanent *Waterproof*
 - Calculadora
- Regle mil·limètric (0-30 cm)
 - Encenedor
- Càmera fotogràfica (mòbil)





❖ LABORATORI MICROBIOLOGIA

Riscos biològics

- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Escherichia coli* O157:H7
- ✓ *Mycobacterium leprae*
 - ✓ *Bacillus cereus*
 - ✓ *Bacillus anthracis*



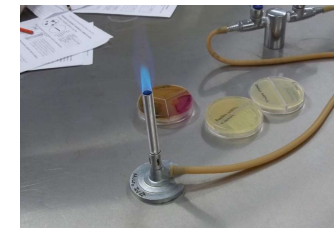
Riscos químics



- ✓ Colorants
- ✓ Intercaladors DNA
- ✓ Antibiòtics
- ✓ Alcohol

Riscos físics

- ✓ Flama encenedor
- ✓ Radiació UV

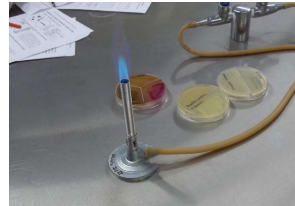


Laboratori de Microbiologia



❖ Normes generals

- **RISCOS BIOLÒGICS - QUÍMICS - FÍSICS**
- **Utilització obligatòria de la bata** – Equip de protecció individual (EPI)
- Absolutament prohibit menjar, beure o fumar als laboratoris
- Minimitzar el nombre d'objectes que entren al laboratori
- **Mostres correctament etiquetades/identificades – SEMPRE!!**
- Al finalitzar el treball s'ha de netejar la bancada i rentar-se les mans amb sabó.
- Abans d'eixir es comprovarà que els cremadors i les claus de pas del gas de les bancades estan tancades.





❖ Normes específiques material biològic

- Està prohibit extraure materials de cap tipus del laboratori de Microbiologia.
- **NO** es pot **abocar a les piques** cap material que continga microorganismes.
- **NO** es poden **llançar a les papereres normals** els materials biològics.
- Els **recipients adequats per a posar el material biològic** estaran assenyalats degudament.

} *Necessitat d'esterilització*

Qualsevol accident,
abocament de líquids, ruptura de recipients o contacte amb
cultius haurà de ser
comunicat al professorat immediatament.





❖ Classificació dels microorganismes segons RISC



PARA LA EVALUACIÓN Y
PREVENCIÓN DE LOS
RIESGOS RELACIONADOS
CON LA EXPOSICIÓN A
AGENTES BIOLÓGICOS

Grup de Risc 1: Microorganismes que tenen poques possibilitats de produir malalties en humans i animals. Per tant, el risc d'exposició individual i poblacional es reduït o inexistent. *Exemple: Bifidobacterium spp., Lactobacillus plantarum, Saccharomyces cerevisiae.*

Grup de Risc 2: Microorganismes que poden provocar malalties en humans i animals. Tenen poques probabilitats de suposar un risc greu per al personal de laboratori, població, o medi ambient. L'exposició pot provocar una infecció greu, però existeixen mesures preventives i terapèutiques efectives, i el risc de propagació és molt limitat. Risc individual moderat o poblacional baix. *Exemple: Campylobacter jejuni, Salmonella enteritidis.*

Grup de Risc 3: Microorganismes que solen provocar malalties humanes i animals greus, però que ordinàriament no es propaguen d'un individu a un altre. Existeixen mesures preventives i terapèutiques eficaces. Risc individual elevat i risc poblacional baix. *Exemple: E. coli O157:H7, Salmonella typhi, Yersinia pestis, Brucella carnis, Bacillus antracis.*

Grup de Risc 4: Microorganismes que solen provocar malalties greus en humans o animals, i que es transmeten fàcilment d'un individu a un altre, de manera directa o indirecta. Normalment no existeixen mesures preventives i terapèutiques eficaces. Risc individual alt i risc poblacional alt. *Exemple: Virus Ebola*



❖ Materials per a l'ús en Laboratori de Microbiologia

RECIPIENTS PER AL CULTIU DE MICROORGANISMES

- Tubs d'assaig
- Plaques Petri
- Flascons
- Altres: tubs d'Eppendorf



MATERIALS PER A EFECTUAR TRANSFERÈNCIES I INOCULACIONS

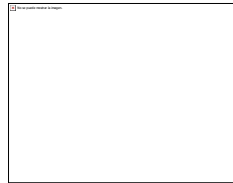
- Anses de sembra metàl·liques
- Anses colzades de vidre o metall (plàstic d'un sol ús) (anses de Digrafsky)
- Pipetes volumètriques i pipetes Pasteur





❖ Materials d'ús en Laboratori de Microbiologia

→ Cultiu pur: **AXÈNIC**



MEDIS DE CULTIU

Solucions de nutrients i minerals per a promoure el creixement microbià

Formulació

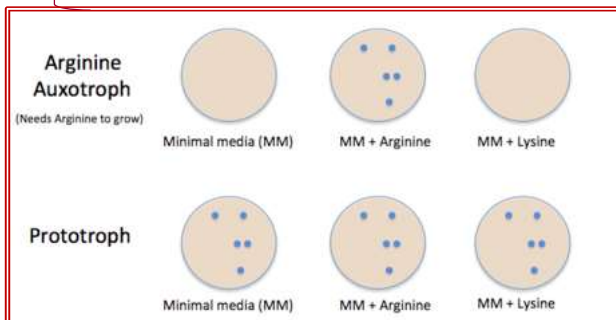
- Sintètics o definits, glucosa, amoni, acetat sòdic → **Protòtrofs**
- Complexos (extractes de carn o llevat) → **Auxòtrofs**

Estat físic

- Líquids (brous) – estèrils en flascons o tubs
- Sòlids en placa (agar > 1.5 % (p/v) sòlid a 45 °C)
- Semisòlids (agar 0.2-0.3 % (p/v))

Aplicació

- Generals
- Enriquits
- Diferencials
- Selectius
- Cromogenis





❖ Materials d'ús en Laboratori de Microbiologia

Preparació de medis de cultiu



Medis de cultiu en pols
(+factors addicionals)



Reconstituïció seguint les
instruccions del fabricant



Esterilització (121 °C, 20 min)





■ SESSIÓ I. Mètodes d'esterilització



❖ Mètodes d'esterilització



Esterilització: Eliminació de microorganismes viables d'un determinat substrat

CALOR

AGENTS QUÍMICS

FILTRACIÓ ESTERILITZANT

RADIACIONS (UV, ionitzant)

- Etanol 70 °
- Lleixiu

✓ Per productes líquids

Seca

- ✓ Flameig
- ✓ Forns de calor seca (Pasteur)



Humida

- ✓ Autoclau
- ✓ Tindalització

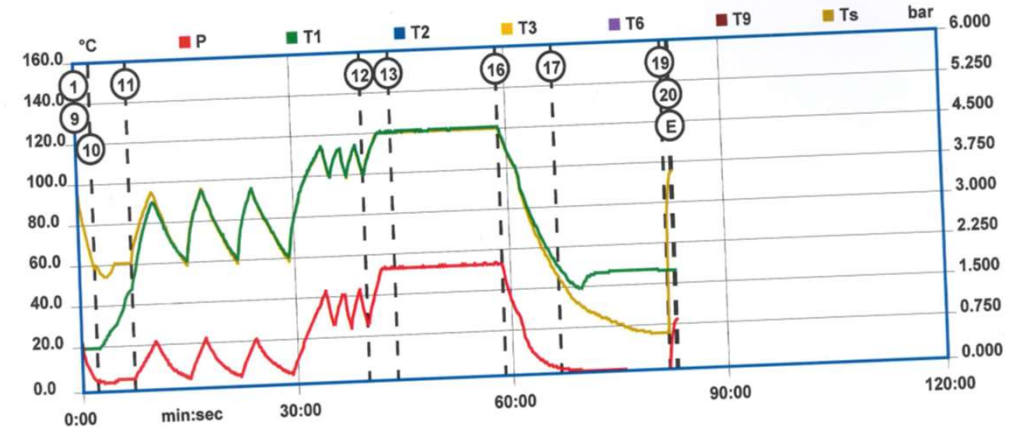
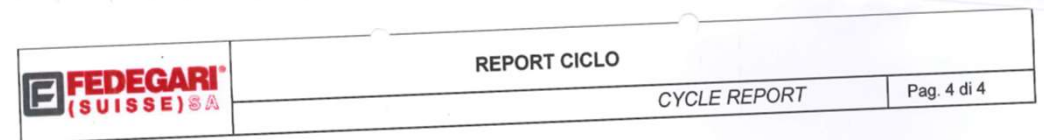




CICLE D'ESTERILITZACIÓ HUMIDA



| prog. t. NF) | phase name | T1 min. | T1 max. |
|--------------|---------------------|---------|---------|
| 0000:00 01) | PREPARATION | 21.2 | 21.2 |
| 0000:00 09) | INITIAL VACUUM | 21.7 | 21.7 |
| 0002:11 10) | TIMED VACUUM | 21.2 | 49.5 |
| 0007:11 11) | STEAM PULSES | 49.5 | 115.0 |
| 0039:52 12) | HEATING | 100.2 | 121.2 |
| 0043:45 13) | STERILIZATION | 121.2 | 121.2 |
| 0058:45 16) | FINAL VACUUM | 52.5 | 121.2 |
| 0066:31 17) | DRYING VACUUM | 41.1 | 51.1 |
| 0081:31 19) | ATMOSPHERIC BALANCE | 48.4 | 48.4 |
| 0082:34 20) | CYCLE END | 48.5 | 48.5 |
| 0082:44 E) | END | 48.5 | 48.5 |



Autoclave S/N NBA409BA
Cycle Number 119

Program Number P02
Program Name SOLIDES 121C



Efecte del tractament tèrmic en la inactivació de les espores bacterianes

Factors de resistència

1. Protecció del DNA per SASPs (*small acid-soluble-proteins*)
2. Acumulació de cations divalents, Ca^{2+} i Mn^{2+}
3. Deshidratació del cor de l'espora.
4. Magatzems d'àcid dipicolínic (DPA) al "cor" de l'espora

Efecte de les altes temperatures





Esterilització per calor en microbiologia:

| Microorganisme | Condicions |
|---|---------------------|
| Majoria de cèl·lules vegetatives, bacteris, fongs i llevats | 80 °C, 5-10 min |
| Bacil tuberculós | 58 °C, 30 min |
| <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> | 60 °C, 60 min |
| Espores patògenes | 100 °C, pocs minuts |
| Espores patògenes <i>Clostridium botulinum</i> | 100 °C, 5,5 h |
| <i>Clostridium</i> i <i>Bacillus</i> sapròfits | 120 °C, 15 min |

- Desnaturalització de proteïnes
- Fusió de lípids de membrana
- Trencada d'enllaços, com ponts d'hidrogen



Pèrdua de viabilitat cel·lular

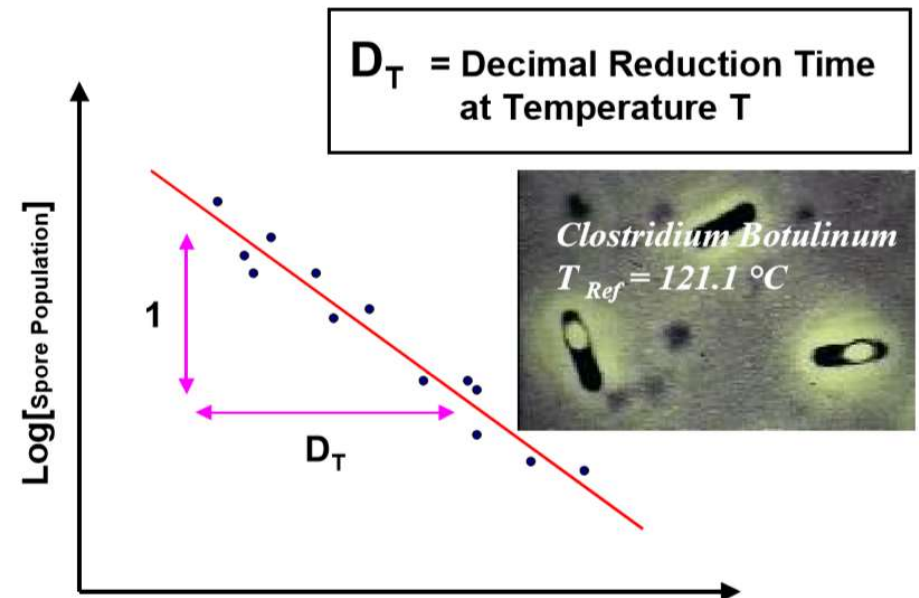


Espores resistents a la calor - *Bacillus stearothermophilus* / *Clostridium Botulinum*

DT = **Temps de reducció decimal** (Temps en minuts requerit en un tractament tèrmic constant per a reduir el nombre de microorganismes supervivents per un factor de 10 – (90% reducció població microbiana (1 \log_{10} reducció))

- Reducció 1 cicle logarítmic = reducció del 90 % població
- Reducció 2 cicles logarítmics = reducció del 99 % població
- Reducció 3 cicles logarítmics = reducció del 99.9 % població

B. stearothermophilus – D_t 1.5 – 2.5 min





Efecte de les RADIACIONS IONITZANTS / NO IONITZANTS

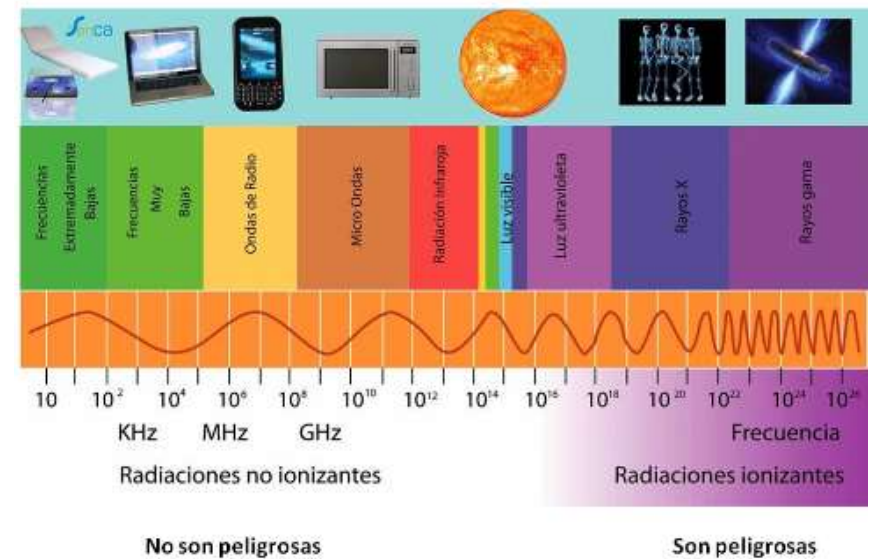
Radiacions ionitzants (major energia): raigs X i raigs γ
Canvis iònics en les estructures dels éssers vius. Alta capacitat de penetració

Esterilització

- material farmacèutic
- material medicoquirúrgic (guants de cirurgia, xeringues, agulles, bisturís, catèters, pròtesis)
- Aliments envasats (espècies, productes en pols)

Radiacions no ionitzants (menor energia): Ultraviolada
Ones electromagnètiques, no produeixen ionitzacions de manera directa al seu pas al través de la matèria orgànica.

- ✓ Afecten proteïnes i àcids nucleics
- ✓ Absorció radiació UV per ADN
- ✓ Baix poder penetrant
- ✓ Desinfecció ambients: llums als hospitals i a les cabines de flux laminar





- SESSIÓ II. Transferències de mostres i cultius en condicions asèptiques



PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES



Mostra a estudiar



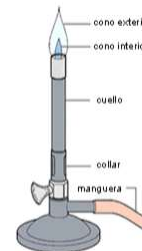
Material estèril



Material contaminat

Treballar en condicions d'asèpsia

- Cabines de seguretat biològica de flux laminar
- Banc de laboratori:
 - Extrepar les condicions de desinfecció
 - Treballar a la flama



10-15 cm àrea estèril

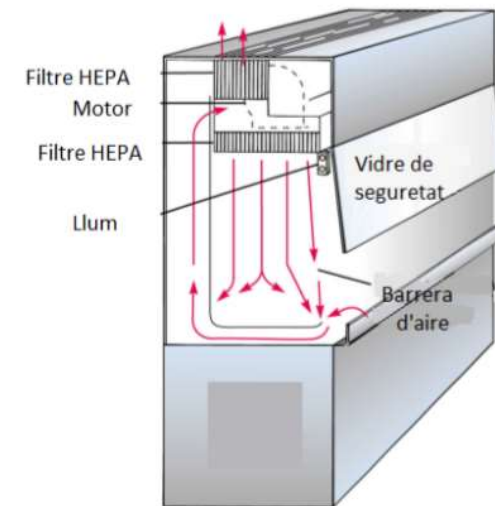


❑ CONJUNT DE PROCEDIMENTS EMPRATS AL LABORATORI DE MICROBIOLOGIA



Preservar les propietats de les:

- Mostres tractades al laboratori
- Material estèril d'ús al laboratori
- Puresa soques microbianes



1. Dipositar material estèril i material contaminat en zones adequades
2. No afavorir contaminacions creuades – esterilitzar l'ansa de sembra
3. Evitar corrents d'aire al laboratori
4. Material (tubs i plaques) tapats – no exposats a l'ambient



PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

MATERIALS ESTÈRILS



Mostra a estudiar



Material estèril



Material contaminat



Treballar en condicions d'asèpsia



PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

Tècniques per a realitzar transferències (inoculacions i sèmres)

Líquid a líquid

- Ansa redona (quantitats mínimes).
- Pipetes (volums majors)

Líquid a sòlid

- Tub d'agar inclinat: ansa redona
- A placa
 - Estriat: ansa redona.
 - Superfície completa: amb pipeta i ansa colzada

Sòlid a líquid

Ansa rodona

Sòlid a sòlid

- A tub d'agar inclinat: amb ansa redona
- A tub de medi semisòlid: per picadura amb ansa recta
- A placa: estries amb ansa redona

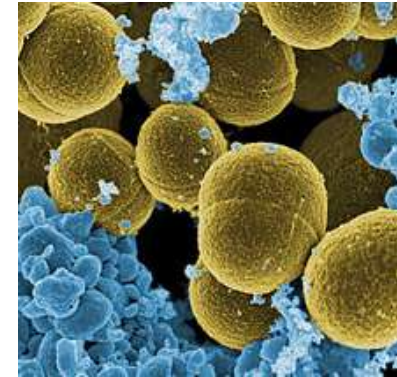




❖ Materials d'ús en Laboratori de Microbiologia

GRAM (-)

- Alcaligenes faecalis* CECT 928** Gram (-) Oportunista
- Aeromonas hydrophila* CECT 5173** Gram (-) Enterotòxica
- Enterobacter cloacae* CECT 194** – Patogen nosocomial poc freqüent
- Escherichia coli* CECT 101** – Gram (-) Grup de risc I
- Proteus hauseri* CECT 484** – Gram (-) Propi del tracte gastrointestinal (GIT)
- Pseudomonas fluorescens* CECT 378** – Gram (-) estimulació creixement vegetal
- Salmonella sp.* CECT 443** - Gram (-) Patogen humà
- Serratia marcescens* CECT 159** – Gram (-) Patogen nosocomial/urinari



LLEVATS

Saccharomyces cerevisiae

FONGS

Penicillium chrysogenum

Alternaria alternata

Mucor mucedo

Aspergillus niger

Pestalotia sp.

Setosphaeria monoceras

GRAM (+)

- Bacillus sp.* CECT 495** Gram (+) Importància tecnològica i clínica
- Enterococcus faecalis* CECT 481** Gram (+) tracte GIT
- Micrococcus luteus* CECT 245** Gram (+) Normal microflora dèrmica
- Staphylococcus aureus* CECT 4013** Gram (+) Patogen humà

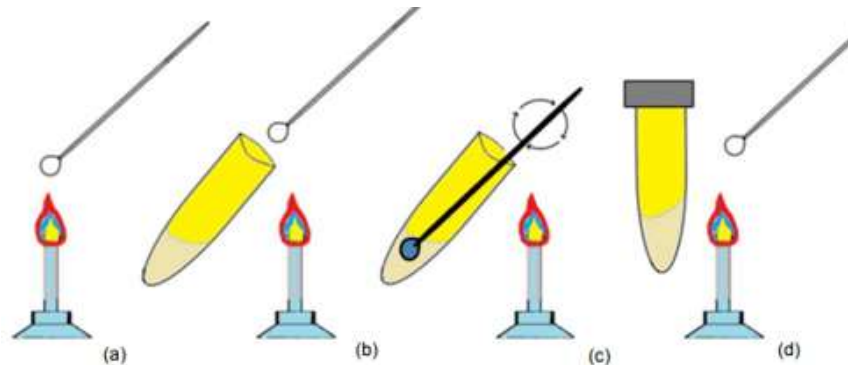


PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

Tècniques per a realitzar transferències (inoculacions i sèmres)

Líquid a líquid

- Ansa redona (quantitats mínimes)



- A) L'ansa de sembra s'esterilitza a la flama.
B) L'ansa s'introdueix al tub que conté la suspensió de microorganismes.
C) Els microorganismes que ara es troben a l'ansa, es dipositen a l'altre tub amb brou estèril.
D) L'ansa es torna a esterilitzar a la flama.





PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

Tècniques per a realitzar transferències (inoculacions i sèbres)

Líquid a líquid

- ❑ Pipetes (volums coneguts)



- Introdueix la pipeta i aspira 1 mL.
- Trau la pipeta i tanca el tub com has fet en el procediment anterior.
- Canvia de tub i descarrega al segon tub el 0,5 mL de la pipeta.



PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

Tècniques per a realitzar transferències (inoculacions i sembres)

Líquid a Sòlid

❑ Inoculació placa en superfície



0.1 mL suspensió



Ansa de Digrafsky



- Introdueix la pipeta i aspira 1 mL.
- Trau la pipeta i tanca el tub.
- Descarrega 0.1 mL en la superfície de la placa.
- Amb l'ansa de Digrafsky distribueix el líquid per tota la placa.

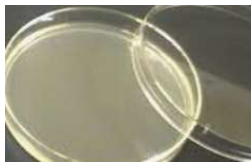


PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

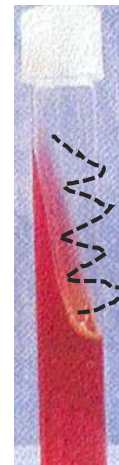
Tècniques per a realitzar transferències (inoculacions i sèmres)

Sòlid a sòlid

❑ Inoculació en TUB D'AGAR INCLINAT



0.1 mL suspensió



Inoculació en zig-zag
DE BAIX A DALT

- Esterilitza l'ansa redona (a la flama).
- Recull l'inòcul del medi líquid o de la placa d'agar.
- Introdueix l'ansa al tub d'agar inclinat.
- Dibuixa un moviment en ziga-zaga per estendre l'inòcul a dintre del medi.
- Trau l'ansa i esterilitza-la.



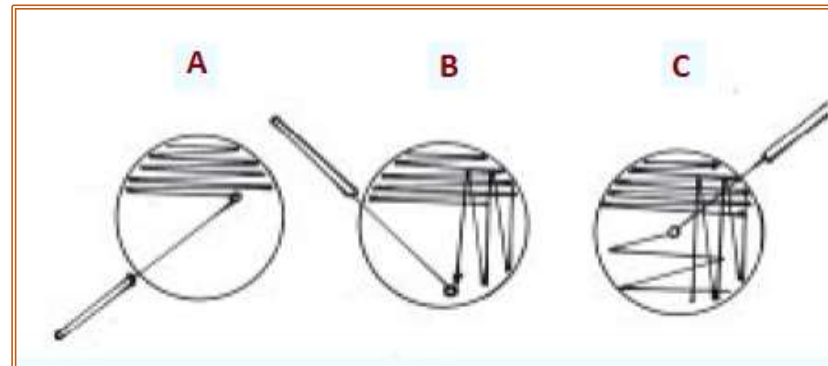


PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

Tècniques per a realizar transferències (inoculacions i sèmbres)

Sòlid a sòlid

TÈCNICA DE SEMBRA EN TRIPLE ESTRÍA



- ❖ Pren amb l'ansa redona estèril una petita quantitat d'inòcul d'un tub o placa
- ❖ Pren una placa de medi de cultiu i mantenint la placa oberta de cara a la flama de l'encenedor.
- ❖ Amb l'ansa carregada amb l'inòcul, llisca aquesta sobre un sector de la superfície de l'agar, dibuixant estries rectes i estenses com s'indica a la figura següent, a la zona A.
- ❖ Tanca la placa i esterilitza l'ansa totalment. Deixa-la refredar.



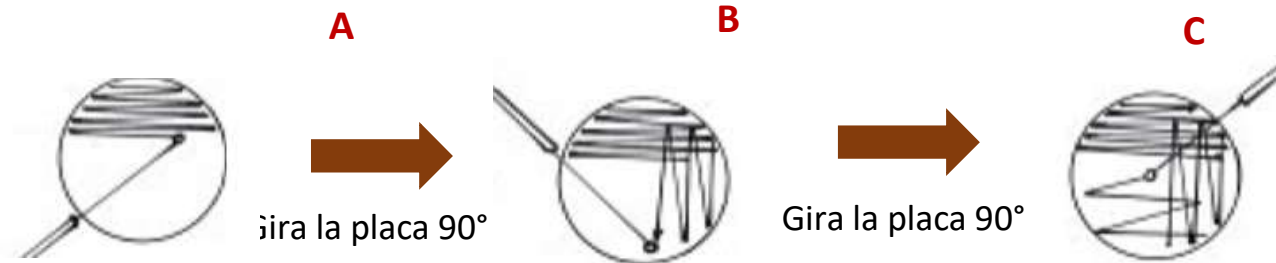


PRACTICA 1. MANIPULACIÓ DE MOSTRES I CULTIUS EN CONDICIONS ASÈPTIQUES

Tècniques per a realitzar transferències (inoculacions i sembres)

Sòlid a sòlid

TÈCNICA DE SEMBRA EN TRIPLE ESTRÍA



- ❖ Gira la placa 90° i, amb l'ANSA ESTÈRIL dibuixa un nou grup d'estries que es creuen amb les primeres
- ❖ Tanca la placa, esterilitza de nou l'ansa i deixa-la refredar.
- ❖ Gira de nou la placa 90°, realitza un tercer grup d'estries amb l'ansa estèril
- ❖ Tanca la placa, esterilitza l'ansa abans de deixar-la i porta la placa a incubació





❖ OBTENCIÓ CULTIUS PURS

MOSTRA AMBIENTAL

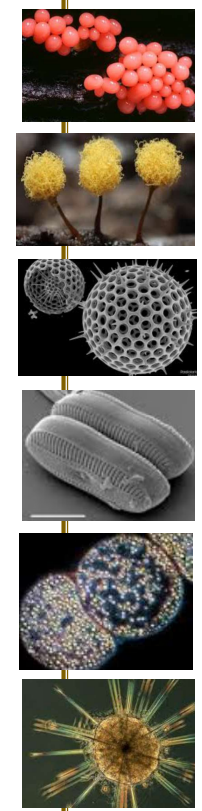
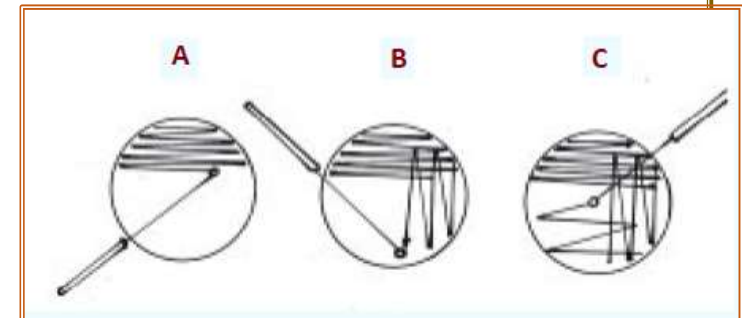
Una colònia,
procedeix d'un
individu microbià

Unitats
formadores
de colònies
(UFC)



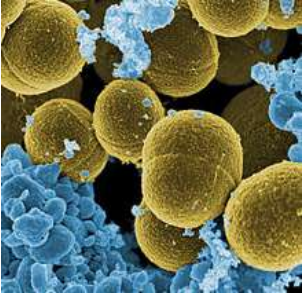
Aïllar Colònies

Triple ESTRÍA





■ SESSIÓ III. Avaluació de la contaminació ambiental

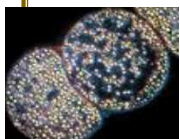
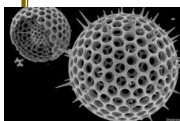




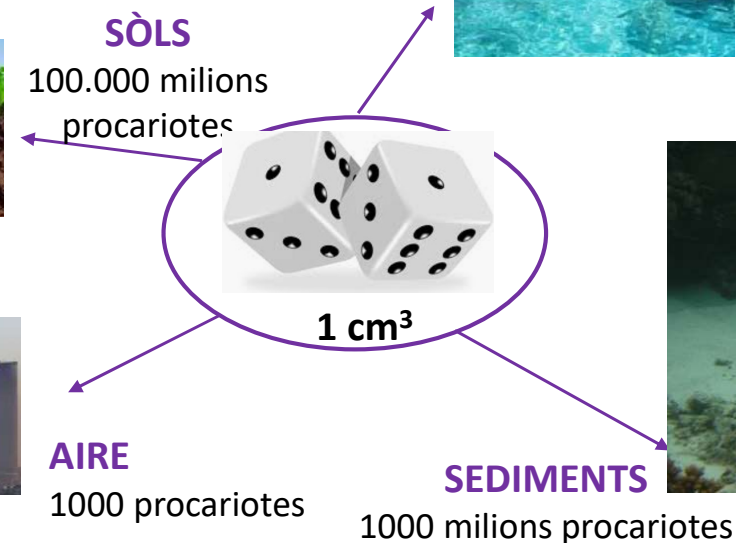
❖ VALORACIÓ DE LA CÀRREGA MICROBIANA DE L'AMBIENT

La versatilitat metabòlica i adaptativa dels microorganismes ha permès que estiguen presents des del principi del temps, de manera ubiqua en qualsevol medi, terra, aigua, aire.

- Característiques microbianes
- Temperatura
- Disponibilitat nutrients
- Presència d'oxigen



AIGÜES
1 milió procariotes





Plaques RODAC
Torunda



AMBIENTS

Protegir
persones,
treballadors,
evitar
transmissions
infecció

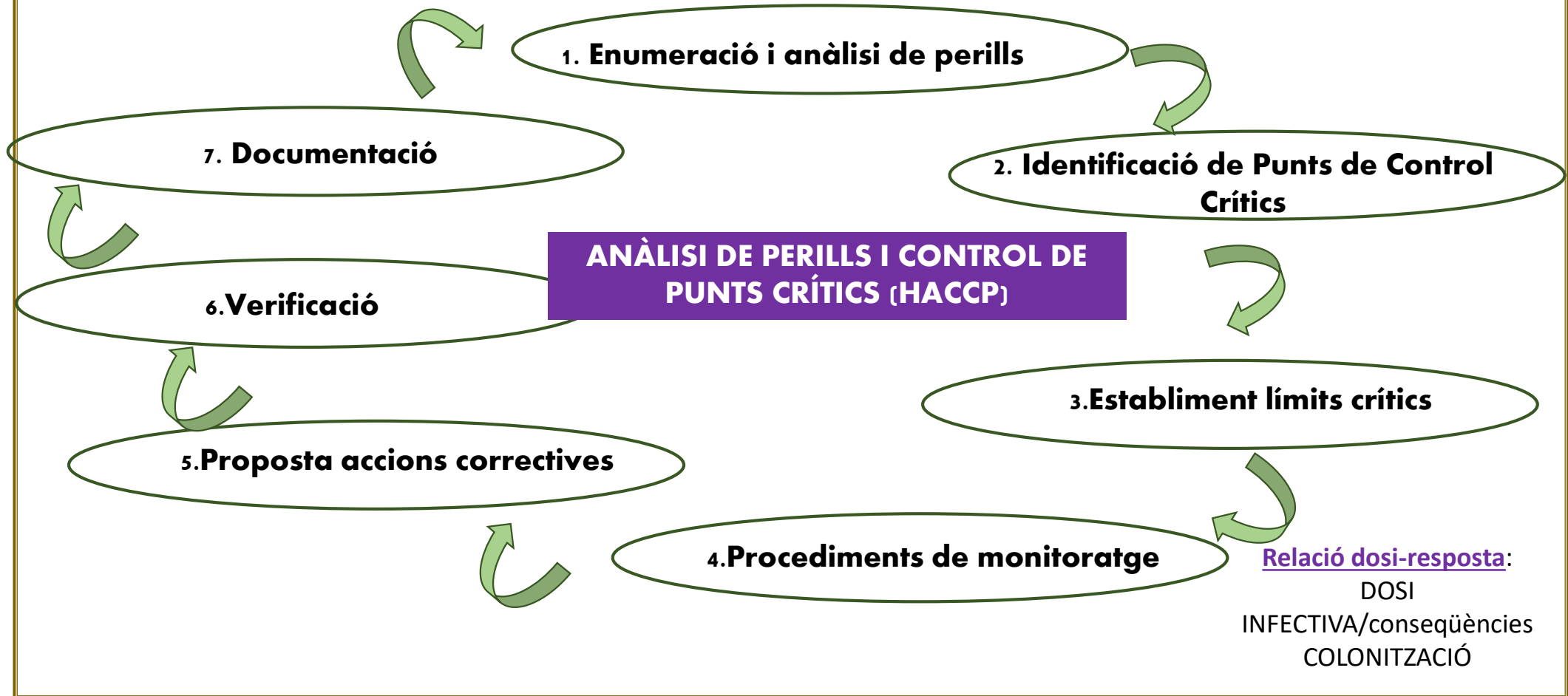
AVALUACIÓ CÀRREGA
MICROBIANA
AMBIENTAL

Legislació
productes
ALIMENTARIS
COSMÈTICS
FARMACÈUTICS

PRODUCTE FINAL

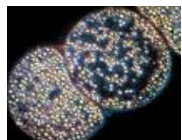
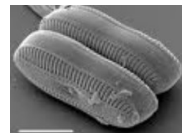
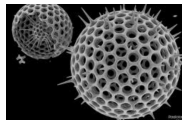


ATP-bioluminiscència





MICROORGANISMES A LES SUPERFÍCIES



≡ EL PAÍS

SOCIEDAD

BROTE DE LISTERIOSIS ›

Los análisis hallan en la empresa Magrudis un foco de la listeria

El laboratorio confirma la presencia de la bacteria en dos mechadoras, los instrumentos que se usan para rellenar la carne

Los análisis realizados en dos mechadoras (instrumentos empleados para rellenar la carne cruda) de la empresa sevillana Magrudis han dado positivo a la presencia de **la bacteria *Listeria monocytogenes***, según documentos a los que ha tenido acceso EL PAÍS. Ello confirma que uno de los focos del brote de listeriosis que **ha afectado ya a 175 personas en toda España**, de las que 82 permanecen hospitalizadas, se encuentra en la planta de producción de la compañía en la capital andaluza, que comercializaba sus productos bajo la marca La Mechá. Entre ellos, el más popular y considerado responsable del brote es la carne mechada, aunque en las instalaciones también se elaboraban otros, como lomo y chicharrón al horno.



- ❖ Importància de la formació de biofilms en l'àmbit industrial

→ **CONTAMINACIÓ DE SUPERFÍCIES**

- ❖ Films caracteritzat per:

-Elevada densitat cel·lular, una o diverses espècies microbianes

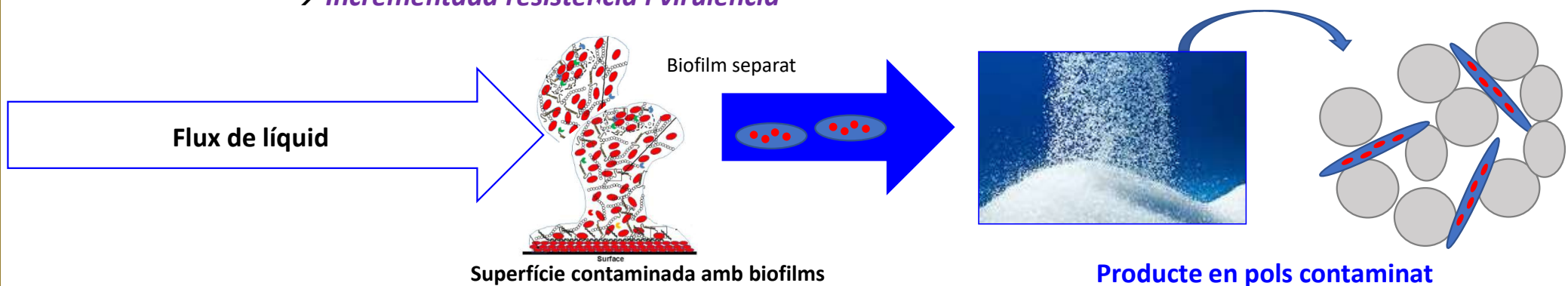
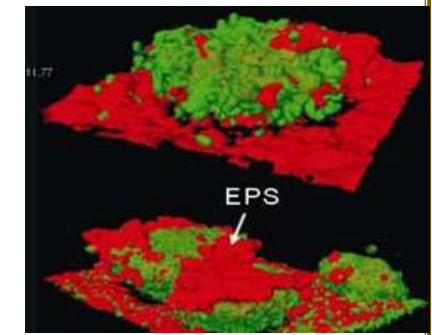
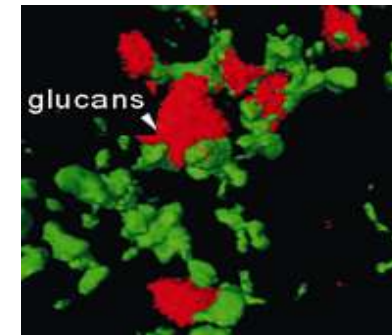
-*Quorum sensing* -> Interacció i comunicació entre els microorganismes

- ❖ Exopolisacàrids (EPS) – Matriu polimèrica que protegeix les cèl·lules individuals enfront dels tractaments antimicrobians i prevé la difusió i la penetració de les molècules amb capacitat bactericida

- ❖ Diferències amb els organismes lliures, no-formants de BIOFILMS

→ **Incrementada resistència i virulència**

Salmonella spp. *Bacillus* spp. *Listeria monocytogenes*





[J Hosp Infect.](#) 2012 Jan;80(1):52-5. doi: 10.1016/j.jhin.2011.07.007. Epub 2011 Sep 6.

Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit.

[Vickery K¹](#), [Deva A](#), [Jacombs A](#), [Allan J](#), [Valente P](#), [Gosbell IB](#).

[Sci Rep.](#) 2017; 7: 15948.

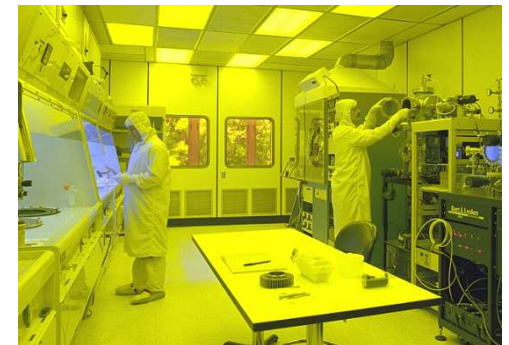
Published online 2017 Nov 21. doi: [10.1038/s41598-017-15769-9](#)

Rapid *in situ* imaging and whole genome sequencing of biofilm in neonatal feeding tubes: A clinical proof of concept

[Pauline Ogrodzki](#), [Chi Shing Cheung](#), [Mohamed Saad](#), [Khaled Dahmani](#), [Rebecca Coxill](#), [Haida Liang](#),
and [Stephen j. Forsythe](#)

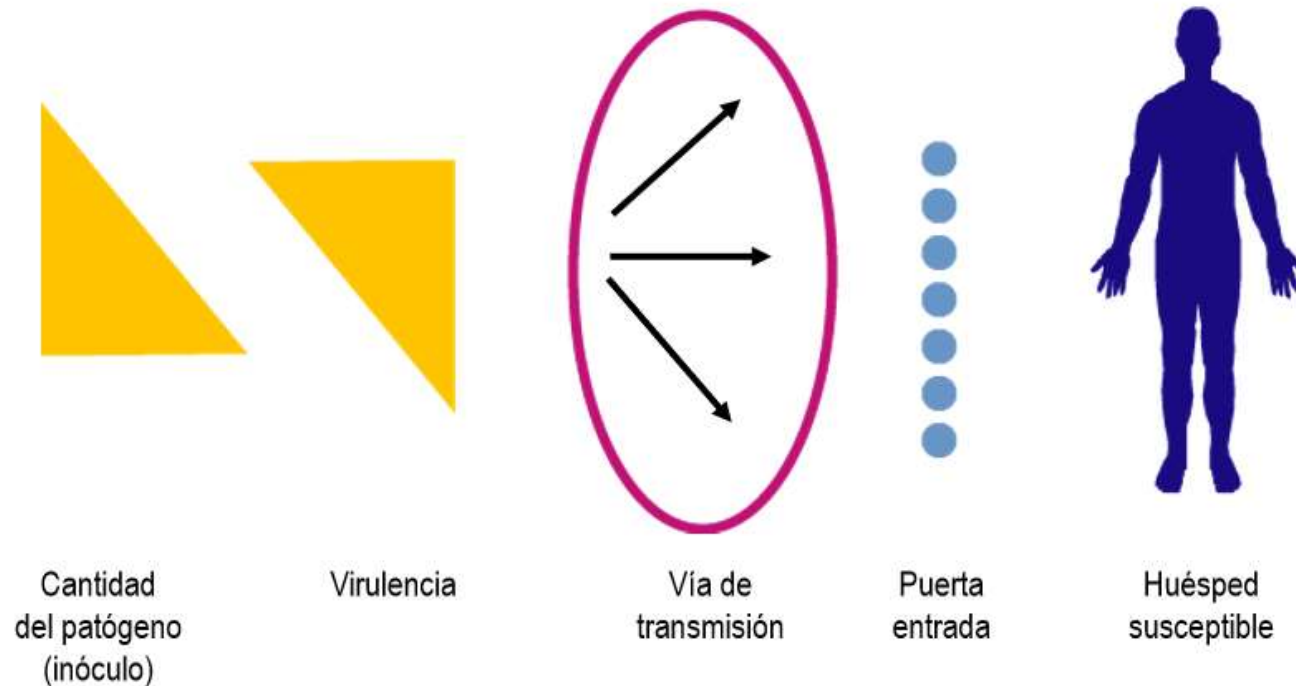
Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms

Hoy día sabemos que los biofilms no son una rareza, si no que más bien representan una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza y su presencia ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de la vida humana con múltiples implicaciones tanto sanitarias como tecnológicas.





CADENA EPIDEMIOLÒGICA DE TRANSMISSIÓ



CONTACTE INDIRECTE:

Utensilis, equipament,
superfícies contaminades
(*fomes*)

Patògens
mutiresistents,
Clostridium difficile,
Rotavirus, Norovirus,
Pseudomonas spp.,
Virus Herspes simplex,
Sarna

Laboratori de Microbiologia



Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica

Traducido de: World Health Organization. Annex 2: WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. En: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: forty-fifth report. Geneva: World Health Organization; 2011. (WHO technical report series; 961).



Els **laboratoris han d'estar dissenyats adequadament**, tenint en compte les característiques dels materials de construcció per a permetre una adequada neteja i desinfecció, i minimitzar el risc de contaminació.

Les activitats de laboratori (com la preparació de mostres, preparació de medis de cultiu, i d'equipament, el recompte de microorganismes) han d'estar segregades en espais diferents, o almenys ser realitzades en temps diferents, amb la finalitat de minimitzar el risc de contaminació encreuada, i els resultats falsos positius o falsos negatius.



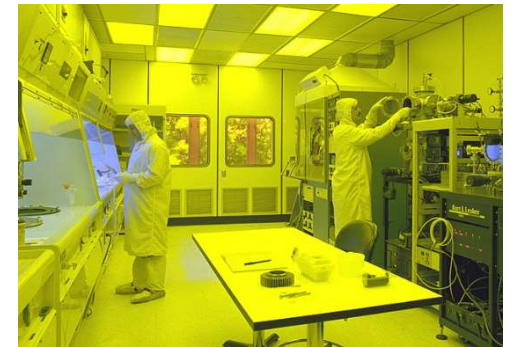


SALA BLANCA (UNE EN ISO 14644)

EL PERQUÈ D'UNA "SALA BLANCA"

Per a protegir

- ✓ **El producte** (Indústria microelectrònica)
- ✓ **El producte i l'usuari/ consumidor** (indústria farmacèutica i alimentària)
- ✓ **El pacient i els professionals sanitaris** (ambient hospitalari/investigació)

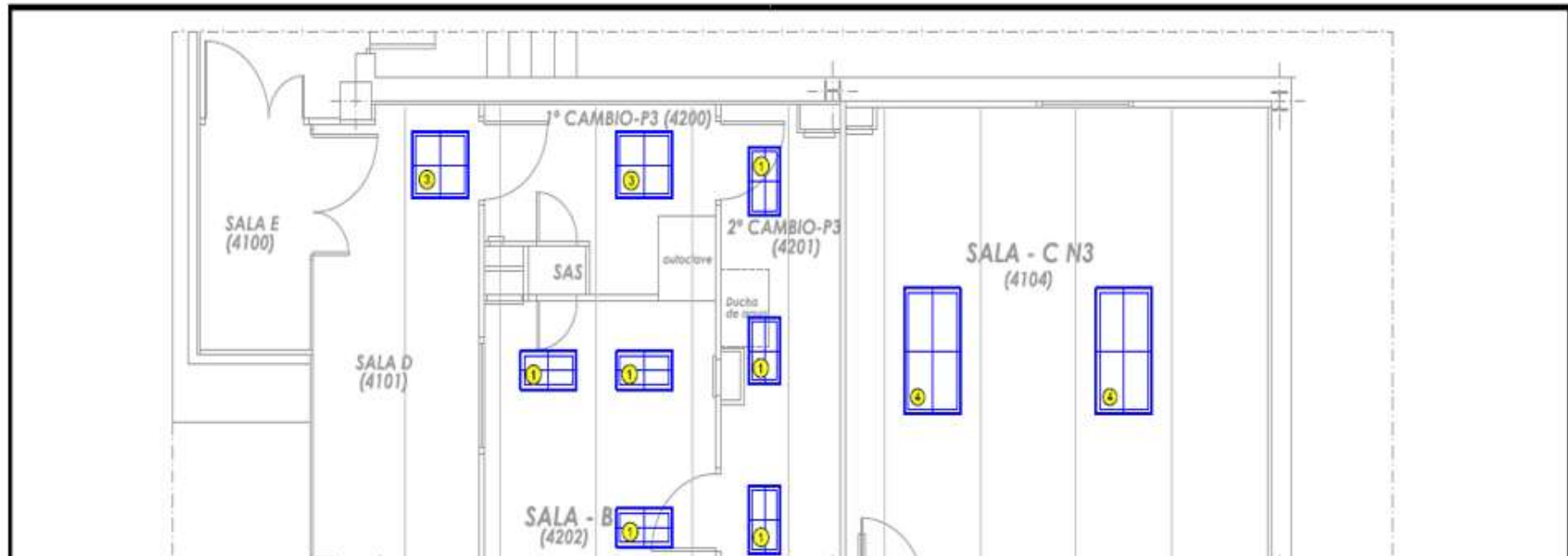


| OTRAS SALAS BLANCAS | |
|---|-------------------------------------|
| Procesos diagnósticos/terapéuticos con pacientes | endoscopia |
| | pentamidina |
| | esputo inducido |
| Procesos terapéuticos para pacientes | radiología vascular |
| | preparación de estériles |
| | preparación de nutrición parenteral |
| | esterilización de instrumental |
| Procesos diagnósticos para pacientes | Laboratorio microbiología |

Laboratori de Microbiologia



La Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia dispone de cuatro salas de trabajo y una sala de alta seguridad. La clasificación de la Sala se monitoriza de forma dinámica mediante un contador de partículas con calibración ENAC. La esterilidad de la sala con clasificación B y el interior de la campana con clasificación A se monitoriza con placa Petri para los patógenos más habituales.



<https://www.youtube.com/watch?v=qL29aoSkOAM>

Laboratori de Microbiologia



Control de qualitat microbiològica

✓ en superfícies i ambients sanitaris i alimentaris (ISO, AFNOR, FDA, European

Pharmacopoeia)

- *el mètode de mostreig que es va a utilitzar*
- *els microorganismes que es volen aïllar i quantificar*
- *els llocs de mostreig*
- *la posició del mostrejador*
- *nombre de mostres en cada punt*
- *freqüència dels mostrejos*



MICROORGANISMES A LES SUPERFÍCIES



Ambient

RODAC: Triptona-Soia-Agar

RODAC: Agar Sabouraud amb cloramfenicol





MÈTODE DE CONTACTE AMB PLACA RODAC

El mètode de contacte directe de l'agar amb els microorganismes

RODAC = Replicate Organisms Direct Agar Contact

Petri especials – EXCÉS DE MEDI DE CULTIU (superfície convexa)
S'usa medi de cultiu TSA o diferents medis selectius a conveniència



| Código | Placa | Para determinación | Cantidad |
|-------------|--|--|----------|
| 433744.0922 | Baird-Parker, Agar | Estafilococos | 30 |
| 433745.0922 | Bilis-Rojo Neutro-Violeta Cristal con Glucosa (VRBG), Agar | Enterobacterias | 30 |
| 433746.0922 | Bilis-Rojo Neutro-Violeta Cristal con Lactosa (VRBL), Agar | Coliformes | 30 |
| 436256.0922 | Cetrimida, Agar | Pseudomonas aeruginosa | 30 |
| 433802.0922 | Glucosa Sabouraud, Agar | Hongos y levaduras | 30 |
| 433842.0922 | Glucosa Sabouraud+Cloranfenicol, Agar | Hongos y levaduras | 30 |
| 433799.0922 | PCA, Agar | Recuento microbiano | 30 |
| 434855.0922 | Rosa de Bengala y Cloranfenicol, Agar | Hongos y levaduras | 30 |
| 433783.0922 | Sal y Manitol, Agar | Estafilococos | 30 |
| 433819.0922 | Soja Tryptona (TSA), Agar | Microorganismos | 30 |
| 435095.0922 | TSA-Tween-Lecitina-Agar | Microorganismos y neutralizar bactericidas | 30 |

PROCEDIMENT:

1. La placa es col·loca directament sobre la superfície a mostrejar.
2. Es manté immòbil i pressionant.
3. Es faran servir plaques Rodac d'Agar TSA (per a bacteris).
4. Es faran servir Agar Sabouraud amb cloramfenicol (fongs).
5. Tancar i invertir la placa per a la incubació d'aquests.



MÈTODE DE LA TORUNDA D'ESCOVILLÓ O FROTIS

Superfícies flexibles, irregulars o molt contaminades

PROCEDIMENT:

1. Es refrega la superfície a examinar amb una torunda humitejada amb aigua de peptona tamponada.
2. A continuació s'introdueix la torunda en un tub amb 4.5 mL de solució salina i s'agita.
3. S'obté un dilució 1/10.
4. S'inoculen alíquotes de 0,1 mL en plaques de TSA i Agar Malta i amb l'ansa de Drigalsky, prèviament esterilitzada a la flama amb alcohol, es reparteix l'inòcul.
5. Les plaques sembrades s'incuben en posició invertida. Cal invertir la placa per a la incubació, a temperatura i temps adequats segons el medi i la determinació realitzada.

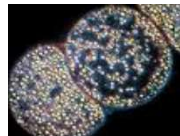
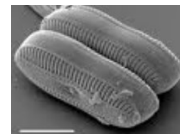
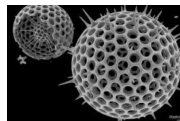


Inocular en tub amb brou

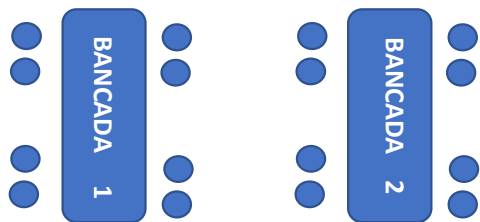


❖ VALORACIÓ DE LA CÀRREGA MICROBIANA DE L'AMBIENT

MICROOGANISMES A L'AIRE



4 TSA placa + 4 AM placa



2 TSA "finestra" + 2 AM "finestra"

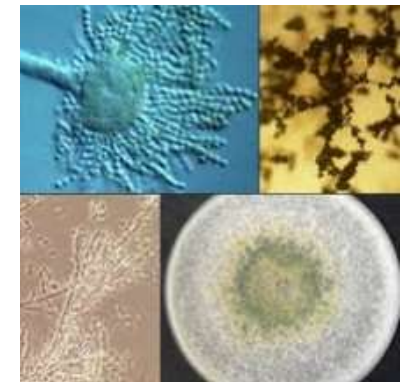
2 TSA "banc" + 2 AM "banc"

Diferents tipus de colònies, *diferents "individus microbians"*

1. Creixen colònies semblants als dos medis o hi ha diferències??
2. I si comparem les plaques de dos ambients diferents – finestra i banc?
3. Tenen alguna característica en comú? Hi ha algun tipus dominant?



■ SESSIÓ IV. Inoculació medis sòlids amb fongs filamentosos





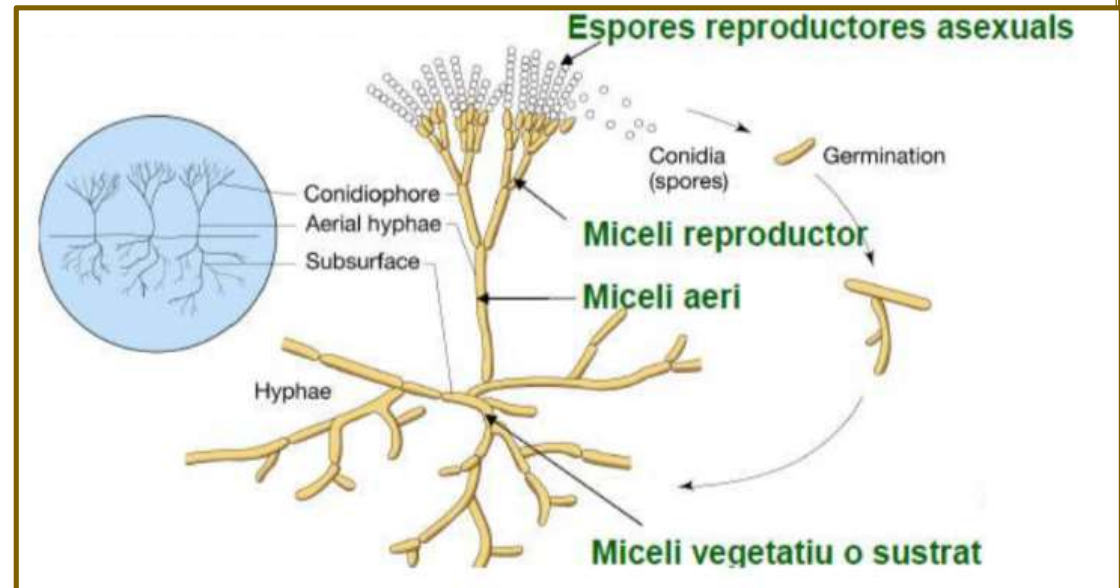
FONGS FILAMENTOSOS

Són fongs **pluricel·lulars** amb estructura multinucleada o hifa que normalment apareix septada (2-3 μm diàmetre).

Hifa cenocítica: hi ha una continuïtat entre citoplasmes degut a un forat al septe.

Miceli: conjunt d'hifes. Els micelis poden ser:

- **Vegetatiu** – penetren en el substrat del qual s'alimenten
- **Aeris** – projecció perpendicular al vegetatiu
- **Reproductors** – produeixen les espores reproductores asexuals/sexuals (cossos fructífers especialitzats)





FONGS FILAMENTOSOS d'INTERÉS INDUSTRIAL

- ❖ Capaç de produir substàncies d'interès biotecnològic, farmacèutic, alimentari
- ❖ Disponible en **cultiu pur**
- ❖ Genèticament estable
- ❖ Creixement ràpid
- ❖ Cultiu a gran escala
- ❖ Productor de **substàncies d'interès** en poc temps (concentració adequada)
- ❖ **No patogen** per a l'home





Inoculació medis sòlids: FONGS FILAMENTOSOS

Interès industrial – biotecnològic
(Metabòlits secundaris)

AGAR MALTA

Agar Malta

| | |
|--|--------|
| Glucosa | 20 g/L |
| Extret de malta | 20 |
| Peptona | 1 |
| Agar | 15 |
| pH= 5,4 . Esterilització: 112°C, 30 min. | |

Penicillium crysogenum
Aspergillus niger
Pestalotia,
Helminthosporium monoceras
Fusarium
Alternaria alternata

Espècies patògenes

Micosis superficials,
subcutànies o
sistèmiques



FONGS FILAMENTOSOS: productors d'enzims, nous fàrmacs, substàncies bactericides, biofertilitzants, aliments, bioremediadors, vitamines.

Penicilium notatum = 2mg penicil·lina/L cultiu

Penicillium crysogenum = 60g penicil·lina/ L cultiu

Penicillium crysogenum



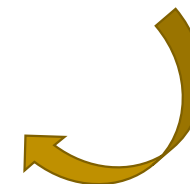
*Utilització massiva de la penicil·lina
Segona Guerra Mundial (1939-
1945)*



*Descobert per Alexander Fleming
1928 (efecte antibiòtic)*



Chain and Florey – penicil·lina 1942

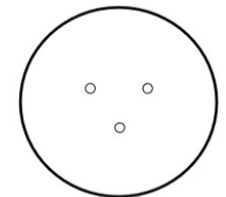




FONGS FILAMENTOSOS

PROCEDIMENT SEMBRA FONGS FILAMENTOSOS

- ❖ Has de disposar **d'una placa Agar Malt** i d'un tub amb una **suspensió aquosa d'espores** d'un dels fongs.
- ❖ Retola la placa amb el nom del fong, les teues inicials i el grup. Esterilitza a la flama l'ansa redona i deixa-la refredar.
- ❖ Destapa asèpticament el tub de suspensió i agafa l'inòcul amb l'ansa estèril.
- ❖ Obri la placa d'agar malt i diposita la gota de suspensió d'espores fúngiques en un punt fix, descarregant-la per complet.
- ❖ Repeteix tot el procés i diposita-hi una segona gota.
- ❖ Porta la placa a incubar boca per amunt a l'estufa de 28 °C fins a la següent sessió.
- ❖ Una vegada desenvolupat el miceli fúngic, anota les característiques del creixement i compara amb els fongs cultivats pels altres estudiants





OBSERVACIÓ FONGS FILAMENTOSOS

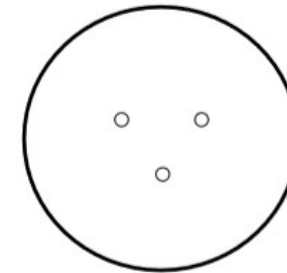
EXAMEN visual del miceli

- **Textura:** llisa, rugosa, amb anells, estriada, verrucosa.
- **Vora:** sencera, ondulada, lobulada, erosionada, arrissada.
- **Consistència:** cotonosa, pulverulenta, viscosa, mantegosa.
- **Colors i pigmentació del medi:** pels dos costats i per zones
- **Producció d'exsudats** (gotetes superficials).

Observació microscòpica

- Agafa un portaobjectes net i desgreixat i col·loca en el centre una gota de **lactofenol-blau de cotó** (agent dispersant i de contrast per a l'observació de les preparacions de fongs).
- Amb l'ansa redona estèril, arreplega una petita quantitat de les hifes del fong i diposita-les en la gota de lactofenol procurant no agitar-les.
- Col·loca un cobreobjectes sobre la preparació i enfoca al microscopi amb **l'objectiu de 40x**.
- Compara les observacions amb els dibuixos dels cossos fructífers i espores.

FONGS FILAMENTOSOS



Sembra central amb 3 gotes de suspensió aquosa



OBSERVACIÓ FONGS FILAMENTOSOS

EXAMEN visual del miceli

- **Textura:** llisa, rugosa, amb anells, estriada, verrucosa.
- **Vora:** sencera, ondulada, lobulada, erosionada, arrissada.
- **Consistència:** cotonosa, pulverulenta, viscosa, mantegosa.
- **Colors i pigmentació del medi:** pels dues costats i per zones
- **Producció d'exsudats** (gotetes superficials).



Pestalotia



Mucor



Aspergillus



Penicillium



Alternaria



Setosphaeria

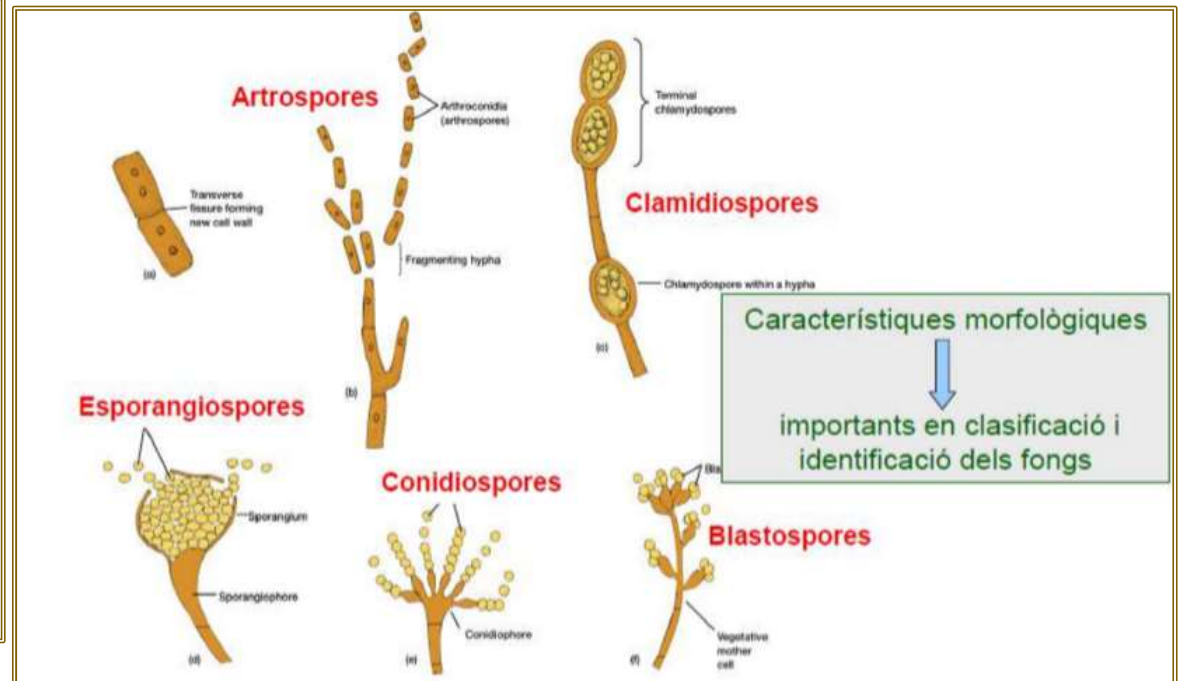
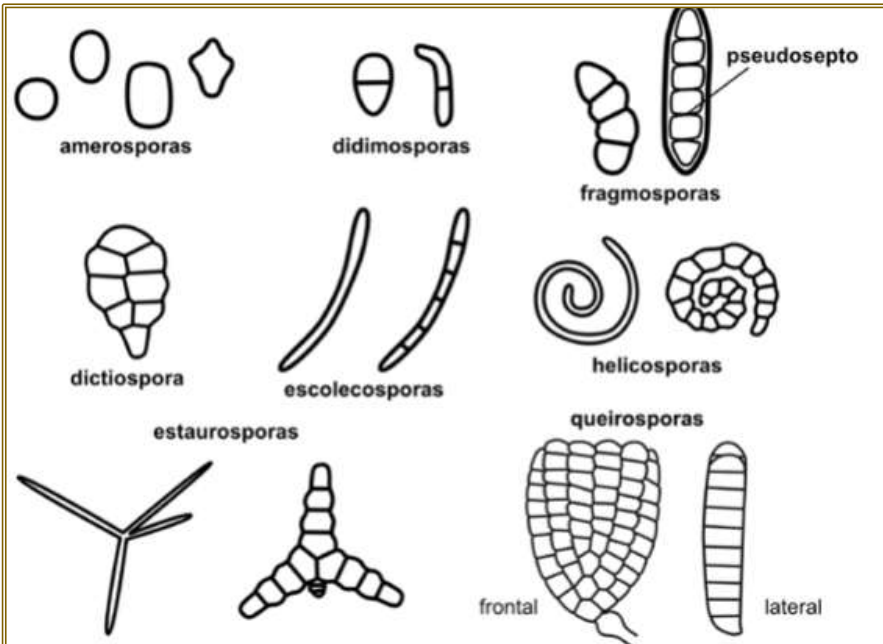


OBSERVACIÓ FONGS FILAMENTOSOS

Observació microscòpica

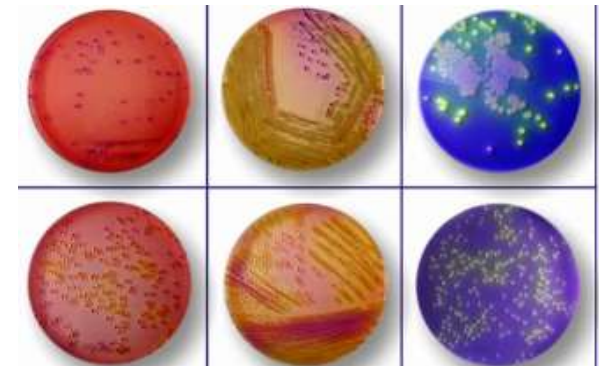
FONGS FILAMENTOSOS

- ☐ Compara les observacions amb els dibuixos dels cossos fructífers i espores.





■ SESSIÓ V. Requeriments nutricionals dels bacteris





REQUERIMENT NUTRICIONAL DELS MICROORGANISMES

Necessitats nutricionals dels
microorganismes

**MEDIS DE
CULTIU**

Condicions ambientals
específiques

- Temperatura
- pH
- Oxigen

PROCEDIMENT

Microorganismes

- *Escherichia coli*
- *Alcaligenes faecalis*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Enterococcus faecalis*

Medis de cultiu

- Brou inorgànic sintètic (**CIS**)
- Brou glucosa-sals (**CGS**)
- Brou extracte de llevat (**CEL**)

pH= 7,0. Esterilització: 121°C, 20 min.

Caldo inorgànic sintètic (**CIS**)

| | |
|--|-------|
| NaCl | 5 g/L |
| MgSO ₄ | 0,2 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 1 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 |

Caldo glucosa sals (**CGS**)

| | |
|---------|-------|
| Glucosa | 5 g/L |
| CIS | 1 L |

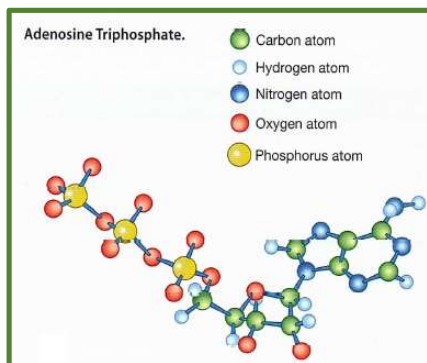
Caldo extracte de llevat (**CEL**)

| | |
|--------------------|-------|
| Peptona | 5 g/L |
| Extracte de carn | 3 |
| Extracte de llevat | 5 |



REQUERIMENT NUTRICIONAL DELS MICROORGANISMES

Necessitats nutricionals dels microorganismes



| Tipus de metabolisme | Font de C | Font d'energia | Font e- | Microorganismes representatius |
|---------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|---|
| FOTO-LITO-AUTÒTROF | CO ₂ | Llum | Inorgànic e- donant | Bacteris del sulfur, cianobacteris diatomees |
| FOTO-ORGANO-HETERÒTROF | Carboni orgànic | Llum | Orgànic e- donant | Bacteris no-sulfur, bacteris verds non-sulfur |
| QUIMIO-LITO-AUTÒTROF | CO ₂ | Químics inorgànics | Inorgànic e- donant | Bacteri sulfur-oxidant, bacteri hidrogen-oxidant, metanògens, bacteri nitrificant, bacteri no oxidant de Fe |
| QUIMIO-LITO-HETERÒTROF | Carboni orgànic | Químics inorgànics | Inorgànic e- donant | Alguns bacteris sulfur-oxidants |
| QUIMIO-ORGANO-HETERÒTROF | Carboni Orgànic | Químics orgànics | Orgànic e- donant | Majoria de microorganismes no-fotosintètics, patògens, fongs, protists i arquea. |



REQUERIMENT NUTRICIONAL DELS MICROORGANISMES

Necessitats nutricionals dels
microorganismes



**MEDIS DE
CULTIU**



Condicions ambientals
específiques

- Temperatura
- pH
- Oxigen

PROCEDIMENT

1. Retola els 3 tubs amb el nom del bacteri que inocularàs, el grup i les teues inicials.
2. Amb l'ansa redona estèril i freda, agafa una petita quantitat d'inòcul del cultiu en tub (o placa) que t'hagen subministrat.
PROCURA QUE LA QUANTITAT D'INÒCUL SIGA MÍNIMA.
3. Inocula amb l'ansa els tres tubs de medi líquid, sense oblidar el flameig després d'obrir i abans de tancar.
4. Una vegada inoculats els tres tubs, agita'ls i porta'ls a incubar a 28 °C fins a la sessió següent de pràctiques.
5. Finalitzada la incubació, trau els tubs de l'estufa i agita'ls: anota el grau de terbolesa i compara'l amb el que presente un tub del mateix medi sense inocular CONTROL.
6. Si la terbolesa és feble o moderada, anota un "+"; si és gran anota, "++", i si el medi està transparent, anota "--".



REQUERIMENT NUTRICIONAL DELS MICROORGANISMES

Necessitats nutricionals dels
microorganismes



**MEDIS DE
CULTIU**



Condicions ambientals
específiques

- Temperatura
- pH
- Oxigen
- Atmosfera concreta

Factors de creixement que no poden ser sintetitzats per alguns bacteris:

- Aminoàcids
- Purines i pirimidines
- Vitamines

Un medi definit per a un bacteri amb gran **CAPACITAT BIOSINTÈTICA**, serà més senzill que un medi definit per a un bacteri amb inferiors capacitats biosintètiques.

- ✓ Les cèl·lules que requereixen factors de creixement són **AUXÒTROFES**.
- ✓ Les cèl·lules que **NO** requereixen factors de creixement són **PROTÒTROFES**.



REQUERIMENT NUTRICIONAL DELS MICROORGANISMES

Un **medi definit** per a un bacteri amb gran **CAPACITAT BIOSINTÈTICA** serà més senzill que un medi definit per a un bacteri amb inferiors capacitats biosintètiques.

Escherichia coli

- Gramnegatiu
- Tracte gastrointestinal
- Grans capacitats biosintètiques,
- Pot créixer a un medi exclusivament amb GLUCOSA I SALS MINERALS

Alcaligenes faecalis

- Gramnegatiu
- Aerobi estricte
- Tracte gastrointestinal
- Patogen i paràsit oportunista
- DEGRADA LA UREA I genera ió amoni

Pseudomonas fluorescens

- Gramnegatiu
- Arrels de les plantes
- Medi mineral** (NO_3^- , NH_4) i un sòl compost orgànic que funciona com a font C i energia.
- Producció d'àcids orgànics; estimuladors d'hormones de creixement

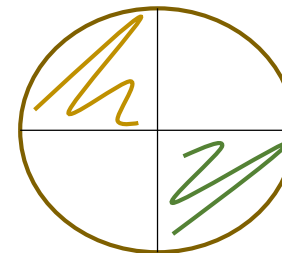
Enterococcus faecium

- Grampositiu
- Comensal tracte gastrointestinal (probiòtic)
- Patogen: meningitis neonatal
- Riboflavina, biotina, àcid fòlic.

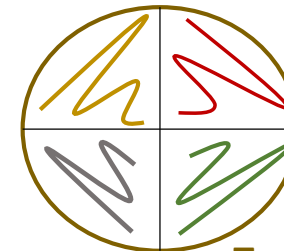
Aplicació en enginyeria genètica

Metabolisme:
994 enzims
Sintetitza 4400 proteïnes diferents
794 metabòlits

Glucose Salt Agar

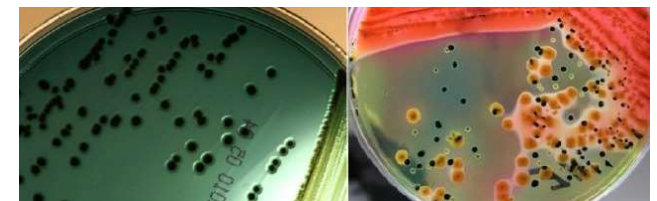


Tryptona Soia Agar





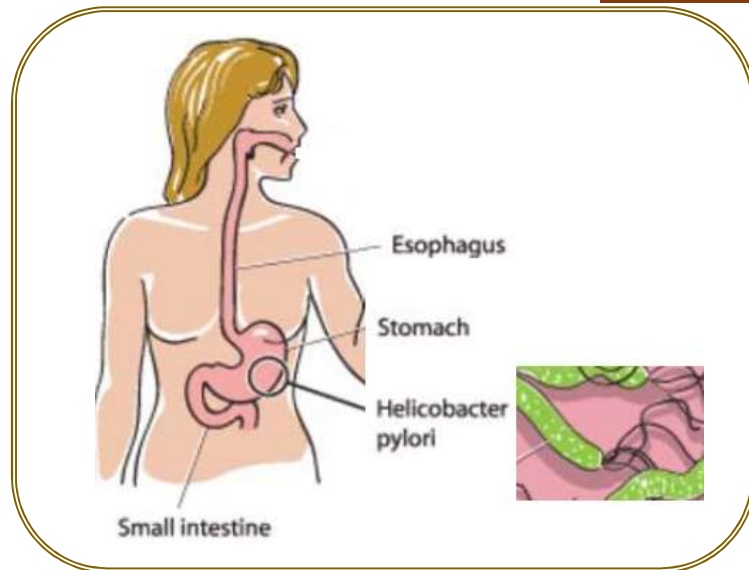
■ SESSIÓ VI. Cultiu en medis selectius i diferencials





MEDIS SELECTIUS I DIFERENCIALS

Barreja complexa de microorganismes



Individu malalt



Productes o matrius altament contaminats

Aïllar / afavorir el creixement de microorganismes específics, d'interès per a l'estudi



MEDIS SELECTIUS I DIFERENCIALS

MEDIS SELECTIUS

- Afavoreixen en creixement de bacteris específics mitjançant l'addició de factors de creixement rellevants.
- Inclouen factors d'inhibició per evitar el creixement de competidors.

MEDIS DIFERENCIALS



- Ingredient específic / Indicador d'utilització

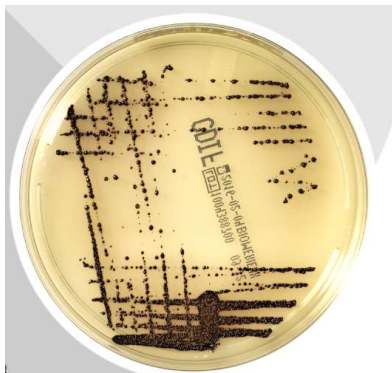
MEDIS CROMÒGENS

ONPG, X-Gal, o X-Glu

- Permeten la identificació de microorganismes per la presència d'enzims amb activitat.
- Amb l'utilització del substrat, el cromòfor es alliberat i detectem un color específic.



MEDIS SELECTIUS/DIFERENCIALS/CROMÒGENS



ChromID® C. difficile

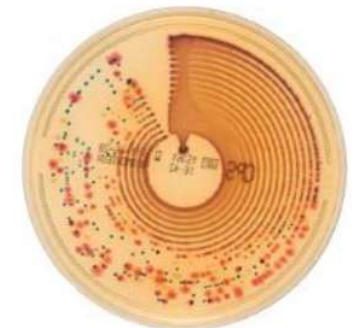
Diseñado para la identificación y el aislamiento de *Clostridium difficile*, este medio es una respuesta directa al programa completo de prevención de la infección.



CHROMID® VRE

Medio cromogénico específico y selectivo para la detección y diferenciación de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* con resistencia adquirida a Vancomicina (VRE).

- Coloración específica para una fácil lectura y diferenciación de *E. faecium* y *E. faecalis*
- Aislamiento y detección de los genotipos VanA y VanB
- Tiempo de incubación: 24h



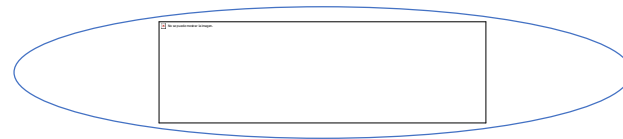
ChromID® CPS

Diseñado para el aislamiento, el recuento y la identificación directa de *E. coli*, *Proteus* y *Enterococos* y de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC) en un solo paso a partir de muestras de orina.



Antecedents de l'estudi

27 DE FEBRER DE 2017 | GINEBRA - L'Organització Mundial de la Salut (OMS) publicà la seua primera llista de «patògens prioritaris» resistents als antibiòtics, en què s'inclouen les 12 famílies de bacteris més perillosos per a la salut humana.



Patògens prioritaris per la R&D de nous antibiòtics

Prioritat 1: CRÍTICA

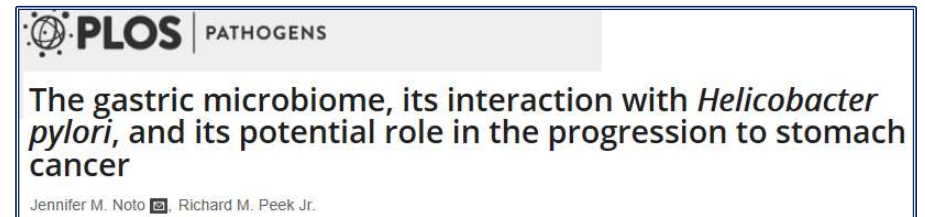
Acinetobacter baumannii
Pseudomonas aeruginosa
Enterobacteriaceae

Prioritat 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium*
- *Staphylococcus aureus*
- ***Helicobacter pylori***
- *Campylobacter spp.*
- *Salmonellae*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Prioritat 3: MITJANA

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Shigella spp.*



[World J Methodol.](#) 2015 Dec 26; 5(4): 203–211.

Published online 2015 Dec 26. doi: [10.5662/wjm.v5.i4.203](https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i4.203)

***Helicobacter pylori* and allergy: Update of research**

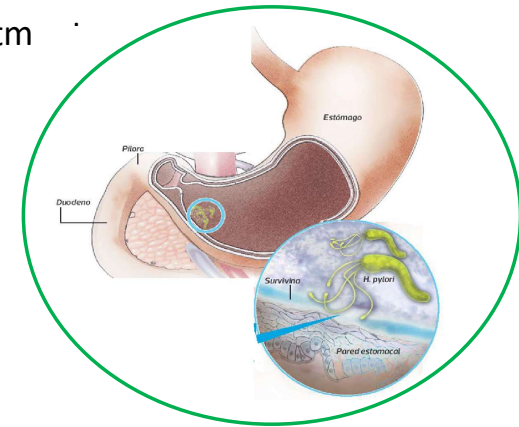
[Ilva Daugule](#), [Jelizaveta Zavoronkova](#), and [Daiga Santare](#)



HELICOBACTER PYLORI

Helicobacter pylori és un dels patògens humans més ubics.

- ❖ Bacteri gramnegatiu, bacils helicoidals, espirals o rectes, de 0.3-10 µm d'ample i 1.5-5 µm de llarg.
- ❖ Entre el 50-75 % de la població mundial es troba afectada per aquest microorganisme recentment classificat com a agent carcinogènic de nivell I (IARC – 2014).
- ❖ Agent causal d'inflamació crònica estomacal, úlcera pèptica, i en els casos més greus **càncer gàstric** als quals s'atribueixen 1 milió de morts per any.
- ❖ En Europa, la prevalença d'aquest patògen arriba a valors pròxims al 84 %.



Femta d'humà infectada

Aïllar en medi selectiu

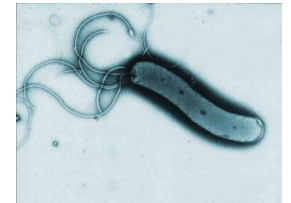
vancomicina
amfotericina B
trimetoprim
cefsulodina



MEDIS SELECTIUS I DIFERENCIALS

Avantatges

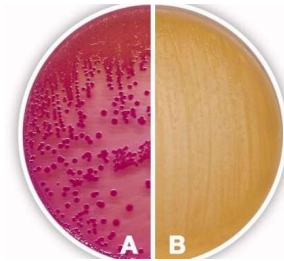
- ❖ Menys temps a donar resultat comparat amb els mètodes tradicionals tant negatiu com presumpte positiu. Alguns medis confirmen resultat en 24 hores.
- ❖ Un sol medi ens permet identificar més d'un microorganisme.
- ❖ La interpretació del resultat és visual sense la necessitat d'habilitats especials o d'instruments.
- ❖ Els medis cromògens eliminen la necessitat d'anàlisi bioquímics addicionals per a la identificació de l'agent patogen.
- ❖ La virulència d'un determinat microorganisme es pot detectar simultàniament amb la seua diferenciació i selecció – Activitat hemolítica de *Listeria monocytogenes*.
- ❖ Els medis cromògens es componen de nutrients i fan possible la supervivència dels microorganismes danyats que estan a punt de desaparèixer.





❖ Materials d'ús en Laboratori de Microbiologia

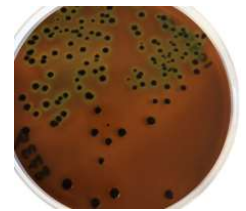
Agar de McConkey. Conté **sals biliars** que inhibeixen el creixement de molts bacteris, especialment grampositius. Conté **lactosa i un indicador de pH** (roig neutre) que vira a color roig quan el pH és àcid, és a dir, quan la lactosa és fermentada. Selectiu i diferencial



Agar verd brillant (AVB). Conté **lactosa, sacarosa**, una elevada concentració d'aminoàcids, **verd brillant** com a inhibidor de creixement de molts fermentadors Gram + , i roig de fenol com a indicador de pH. Els oxidatius produeixen amoni a partir d'aminoàcids, i generen color rosa. Els fermentatius, o no creixen, o donen color groc. Selectiu aïllament de *Salmonella spp.* (*no fermenta lactosa/sacarosa*) Selectiu i diferencial



Agar Eosina-blau de metilè (EMB). És un medi ric lactosat amb dos colorants, **eosina i blau de metilè**, que funcionen com a inhibidors del creixement de bacteris Gram + . En aquest medi *E. coli* creix com a colònies negres amb una brillantor metàl·lica. Selectiu i Diferencial



Agar MRS (Man, Rogosa i Sharpe). Es tracta d'un medi natural molt ric que conté polisorbato, acetat, magnesi i manganès, que actuen com a factors de creixement per als lactobacils. El creixement s'efectuarà en condicions de microaerofília, en flascons per al cultiu de microorganismes anaerobis.





MEDIS SELECTIUS I DIFERENCIALS



AGAR MANNITOL SAL

Agent selectiu

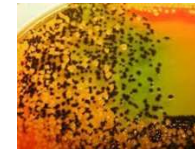
NaCl (75g/L)

Mannitol (sucre-alcohol)

Roig fenol – vira a groc medi àcid

Aïllament selectiu/diferencial de
Staphylococcus aureus

- Coc, grampositiu i anaerobi facultatiu
- Respiració aeròbia
- Fermentació làctica de carbohidrats
- Patogen oportunista
- Toxines termoestables



AGAR ENTÈRIC HEKTOEN

Fucsina àcida

Sals biliars

Agent selectiu

Carbohidrats fermentables

Blau de bromotimol

Tiosulfat sòdic (S₂O₃Na) i

Citrat fèrric

Aïllament selectiu/diferencial de
Salmonella

- *Salmonella* és un bacteri gramnegatiu anaerobi facultatiu.
- Pot fermentar alguns sucres, com la glucosa (però no altres, com sacarosa o lactosa).
- El seu hàbitat natural és l'intestí d'animals homeoterms.

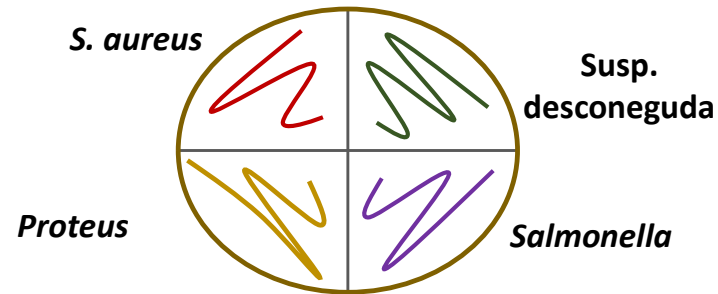


MEDIS SELECTIUS I DIFERENCIALS

PROCEDIMENT:

1. Cada parella d'estudiants disposarà d'una placa de

- ✓ **Tryptona Soia Agar**
- ✓ **Agar Mannitol Sal**
- ✓ **Agar Hektoen**



- Cada parella: **TSA, Mannitol Sal** o **Hektoen**
- Retola les tres plaques amb el noms dels bacteris o l'identificatiu de la suspensió. Inocula mitjançant la tècnica de la triple estria la placa de TSA, que servirà com un control positiu de viabilitat.
- Inocula, la placa d'Agar Mannitol Sal, Hektoen i la de TSA.
- Porta les plaques a incubar fins a la propera sessió.
- Observa el creixement de les tres plaques i anota els resultats



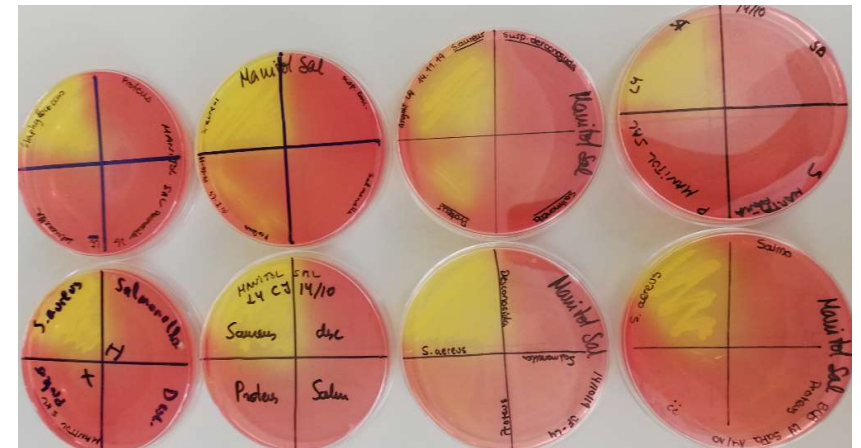


ANÀLISI DE RESULTATS: *Salmonella*, *Proteus*, *S. aureus*, *Susp. Descon*

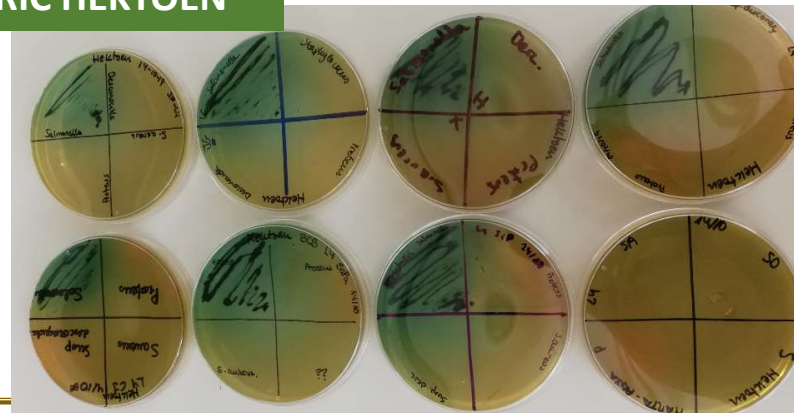
TRIPTONA SOIA AGAR



AGAR MANNITOL SAL



AGAR ENTÈRIC HEKTOEN

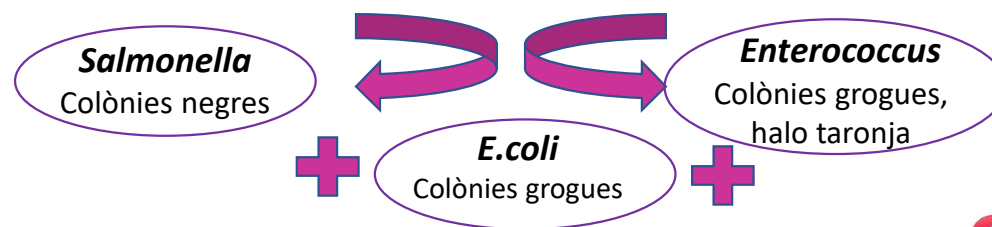
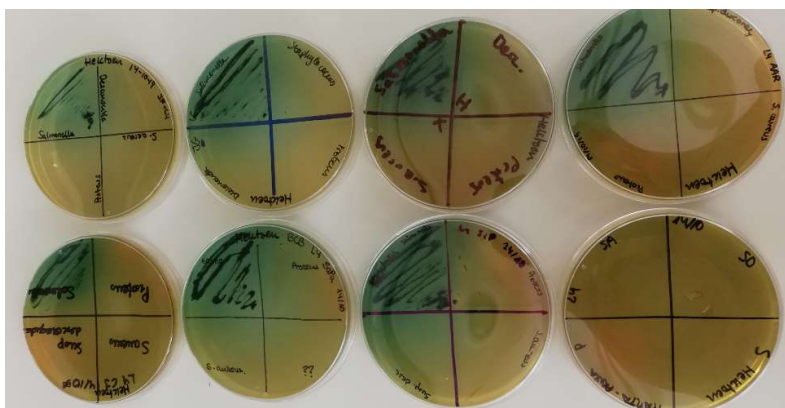




ANÀLISI DE RESULTATS: *Salmonella*, *Proteus*, *S. aureus*, *Susp. Desconeguda*

Suspensió de **COMPOSICIÓ DESCONEGUDA**

Medi selectiu SALMONELLA



| Soques bacterianes | Resultats de Creixement |
|--|---|
| <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028 | Creixement bo o excel.lent. Colònies de color verd a blau verdós, amb centre negre |
| <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 | Creixement bo o excel.lent. Colònies color verd clar |
| <i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931 | Creixement bo o excel.lent. Colònies color verd clar |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Inhibició parcial o completa Colònies de color groc-taronja |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | Inhibició parcial o completa Colònies xicotetes de color groc, halo color taronja. |
| Sense inocular | Plaques de color verd, transparent. |



■ SESSIÓ VII. Observacions microscòpiques de microorganismes





MÈTODES D'IDENTIFICACIÓ MICROBIANA

Mètodes fenotípics

Antibiogrames

Característiques microscòpiques

Proves bioquímiques

Cultiu Medis selectius/diferencials

Característiques macroscòpiques

- Morfologia
- Pigmentació

- Ureasa
- Citrat
- Reducció nitrats
- Coagulasa
- Catalasa
- ONGP

Mètodes moleculars

PCR, ARNr 5S, 16S, 23S
Seqüenciació massiva
immunològics (ELISA)



GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

- ✓ Dificultats en aïllament
- ✓ Creixement lent o dificultós en medis de cultiu *in vitro*
- ✓ Baixa activitat en proves bioquímiques
- ✓ Baixa efectivitat en tècniques serològiques

Mètodes proteòmics

Caracterització del conjunt de proteïnes expressades per un genoma "PROTEOMA"
 MALDI-TOFF

Taxonòmicament, l'estudi dels caràcters estructurals, bioquímics, fisiològics, metabòlics i funcionals dels bacteris ens revela molta informació.



Observació dels bacteris mitjançant MICROSCÒPIA ÒPTICA

Màxim poder de resolució: 0.2 μm
Màxim poder resolució (ull humà): 250 μm

MICROSCÒPIA ÒPTICA: MICROBIOLOGIA

Observació **directa** dels **microorganismes "in vivo"**

- ✓ Morfologia
- ✓ Grandària
- ✓ Color
- ✓ Mobilitat dels bacteris

Tractament **mitjançant TINCIÓ**
(**objectiu**: incrementar el contrast, optimitzar l'observació)

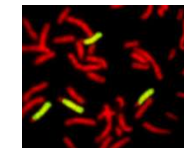
Tincions simples



Tincions diferencials

TINCIÓ mitjançant fluorocrom

Microscopi
d'epifluorescència

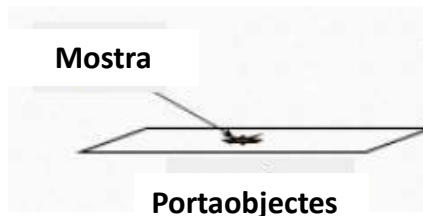


- ✓ Diferenciar cèl·lules viables/no viables
- ✓ Recompte LIVE/DEAD

*Tincions: A partir de suspensions microbianes, esteses a un portabjectes (frotis), seques, i fixades



Observació dels bacteris mitjançant MICROSCÒPIA ÒPTICA



CALOR: preserva morfologia externa però NO estructures internes

QUÍMICA: preserva estructures cel·lulars internes; etanol, formaldehid, àcid acètic, metanol, etc.

COLORANTS:

- ✓ Grups cromòfors
- ✓ Dobles enllaços conjugats
- ✓ Unió a estructures cel·lulars per enllaços iònics, covalents o hidròfobs





Estructura de la superfície dels bacteris

Estudi microscòpic bacterià (0.5-10 µm): Ens revela la forma, manera d'agrupar-se, grandària i estructures cel·lulars

| ESTRUCTURA | Localització | Dimensions | Composició Química |
|------------------------------|--|--|---|
| MEMBRANA | Capa que envolta el protoplast | Membrana unitària, 7.5-8 nm | 20-30 % fosfolípids, la resta proteïnes principalment |
| PARET | Capa externa a la membrana | Gramnegatius: Capa interna de 2-3 nm de gruix Capa externa similar a la membrana unitària, 7-8 nm | Peptidoglican (90 %) Fosfolípids, proteïnes i lipopolisacàrids |
| | | Grampositius: Capa homogènia 10-50 nm de gruix | Peptidoglican (10-20%): àcids teïcoics; polisacàrids |
| CÀPSULA O CAPA MUCOSA | Capa difusa externa a la paret | Estructura homogènia de baixa densitat, gruix variable | Generalment polisacàrid i polipèptids |
| FLAGELS | Fixats al protoplast, travessen la membrana i la paret | Filaments helicoidals, 12-18 nm de gruix | Proteïna |

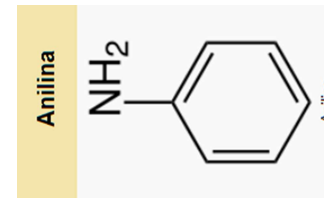


Tinció dels microorganismes

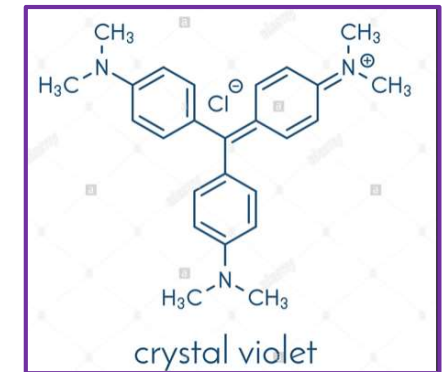
Colorants derivats de les anilines

- ❖ **Colorants bàsics:** cromòfor de la molècula es troba carregat positivament: violeta cristall, safranina, blau de metilè, fucsina bàsica, verd malaquita.
 - Afinitat per estructures àcides (àcids nucleics, polisacàrids àcids)
 - Els més emprats en citologia bacteriana
- ❖ **Colorants àcids:** cromòfor de la molècula es troba carregat negativament – útils per a tenyir estructures carregades positivament (proteïnes) (rosa de bengala, eosina, fucsina àcida).

**Procariotes: pH intern pròxim a la neutralitat / superfície carregada negativament*



Simple POSITIVA





Tinció dels microorganismes

S'utilitza un sol colorant, que actua uniformement sobre totes les cèl·lules

Posen de manifest característiques morfològiques senzilles

- ❖ morfologia
- ❖ la mida cel·lular
- ❖ les agrupacions característiques de les cèl·lules

- ❖ NO s'utilitzen colorants amb cromòfors.
- ❖ NO es dona cap reacció entre el colorant i les estructures cel·lulars.
- ❖ Una solució particulada, forma una pel·lícula opaca a la llum.
- ❖ Microorganismes destaquen sobre fons obscur.

Simples

NEGATIVA

colorant s'aplica al camp d'observació i no penetra en les cèl·lules; deixa les cèl·lules ressaltades i delimitades en color blanc

POSITIVA

colorant es fixa en les mateixes cèl·lules i els atorga color i contrast amb el medi circumdant, que es veurà en blanc.



Tinció dels microorganismes

Simple **NEGATIVA**

- ❖ Col·loca dues **gotes de nigrosina** en l'extrem d'un portaobjectes net.
- ❖ Emulsiona una petita quantitat de cèl·lules d'un cultiu en les dues gotes de nigrosina.
- ❖ Amb un portaobjectes net situat en angle amb l'anterior, **fes un frotis de la suspensió** amb nigrosina de manera que quede al més estesa possible.
- ❖ Deixa assecar el frotis a l'aire evitant qualsevol tipus d'escalfament.
- ❖ **NO FIXEU**
- ❖ Quan el frotis estiga sec, observa'l al microscopi amb **l'objectiu 100x** i oli d'immersió.
- ❖ Anota les morfologies cel·lulars i agrupacions i qualsevol altre detall (mode de divisió cel·lular, presència de càpsula) que pugues apreciar en la preparació.



Tinció dels microorganismes

Simple POSITIVA

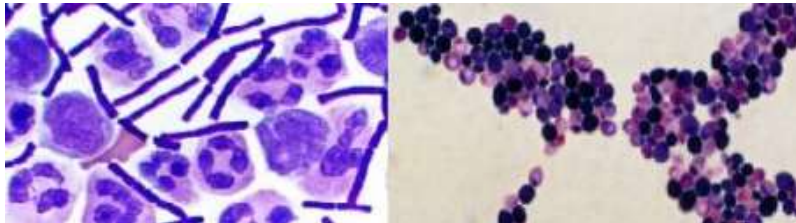
S'utilitza un sol colorant, que actua d'igual manera sobre totes les cèl·lules.

- ❑ Col·loca una **gota menuda d'aigua** i ressuspèn una petita quantitat de cèl·lules bacterianes usant procediments asèptics, amb l'ansa redona.
- ❑ **Estén la suspensió** de manera que forme una capa de líquid al més fina possible.
- ❑ Deixa que l'extensió s'**asseque** a l'aire.
- ❑ Fixa la preparació a la flama, **tallant-la dues o tres vegades**.
- ❑ Cobreix tota la preparació amb **fucsina bàsica diluïda**.
- ❑ Deixa el colorant en contacte amb la preparació durant **1 minut**.
- ❑ Llava la **preparació amb aigua**.
- ❑ Col·loca una **gota d'oli d'immersió** sobre la preparació i enfoca amb l'objectiu 100x.
- ❑ Anota la morfologia de les cèl·lules i les agrupacions en què apareixen, si n'hi ha.



Tinció dels microorganismes

S'utilitza més d'un colorant així com substàncies decolorants específiques



- ❖ Tinció **PRIMÀRIA**
- ❖ Tinció de contrast o **SECUNDÀRIA**

Diferencials

De cèl·lules

Permeten distingir entre cèl·lules
Gram + i Gram -, o
alcoholacidoresistents (AAR)
(*Mycobacterium leprae*,
Mycobacterium tuberculosis)

D'estructures

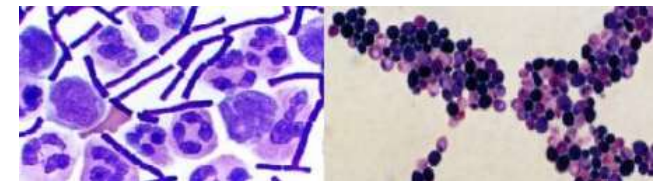
Posen de manifest estructures
de nivell subcel·lular,
endòspores, grànuls, càpsules,
etc.



Observació amb microscòpia de contrast de fases

La microscòpia de contrast de fases permet augmentar el contrast entre la cèl·lula que volem observar al microscopi i el seu entorn, sense la necessitat de tenyir-la.

1. Agafa una petita quantitat d'inòcul del cultiu bacterià jove (24-48 hores) amb l'ansa redona estèril, seguint tots els procediments asèptics necessaris.
2. Posa en contacte l'inòcul amb la gota d'aigua del porta de manera que aquesta s'enterbolisca lleugerament.
3. Situa un cobreobjectes sobre la suspensió bacteriana i porta-ho immediatament al microscopi de contrast de fases.
4. Enfoca la preparació amb l'objectiu de 40x i observa el moviment de les cèl·lules en el si del líquid.
5. Procura que la preparació no s'asseque i que no estiga massa temps enfocada en el mateix camp, perquè l'escalfament produït pot reduir la mobilitat i viabilitat del bacteri.
6. Quan hages acabat l'observació, diposita el porta en un recipient amb solució desinfectant.

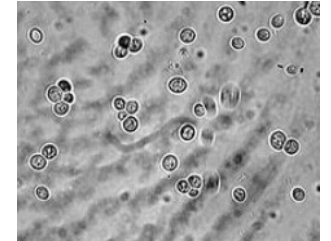




Observació amb microscòpia de contrast de fases

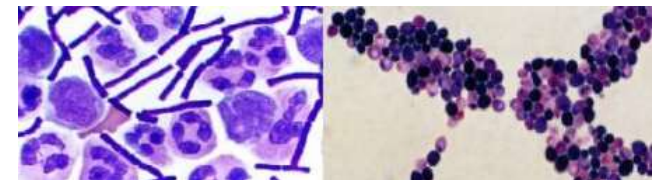
La microscòpia de contrast de fases permet augmentar el contrast entre la cèl·lula que volem observar al microscopi i el seu entorn, sense la necessitat de tenyir-la.

- ❑ **Moviment brownià:** és una agitació lleu que no desplaça les cèl·lules i no representa mobilitat activa; és tan sols una conseqüència de l'agitació tèrmica de les partícules en el si d'un líquid. No ha d'interpretar-se com a mobilitat.
- ❑ **Desplaçaments actius dels bacteris** en trajectòries rectes: responen a la mobilitat activa flagel·lar.
- ❑ **Girs ràpids d'una cèl·lula sobre si mateixa:** les cèl·lules queden fixades al porta pel flagel o flagels, i això fa que el moviment de rotació d'aquest es tradueixca en un gir més o menys continuat de la cèl·lula. És indicatiu del fet que les cèl·lules posseeixen flagels.
- ❑ **La mobilitat per lliscament** és difícil d'observar, molt més lenta que la mobilitat per flagels.
- ❑ **Mobilitat anomenada twitching:** la cèl·lula pateix petites sacades en contacte amb un substrat sòlid.





■ SESSIÓ VIII. Tincions diferencials

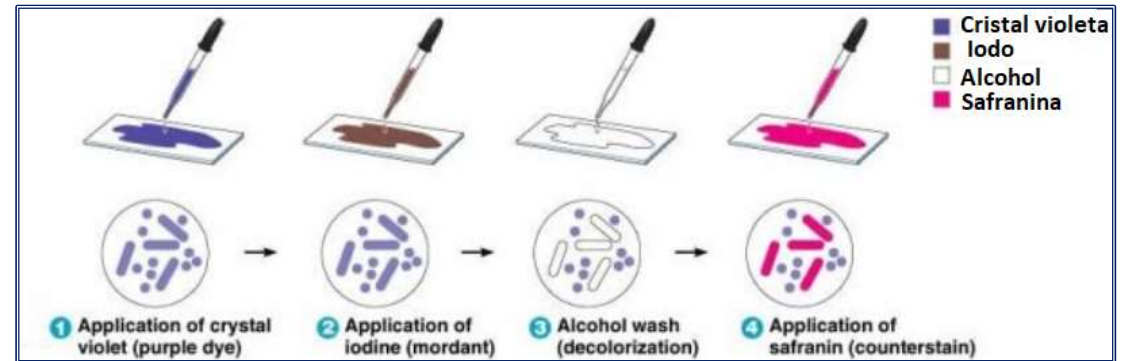




■ TINCIÓ DIFERENCIAL

OBJECTIU:

- ✓ Distingir entre tipus cel·lulars diferents o entre diferents estructures cel·lulars (externes o internes)



Tincions diferencials de
cèl·lules

Tincions diferencials
d'estructures cel·lulars

1. Colorant primari, que és incorporat per totes les cèl·lules o tots els orgànuls

Retenen colorant

Etapa crítica/diferencial

2. Decoloració diferencial

3. Colorant de contrast

Coloració secundària

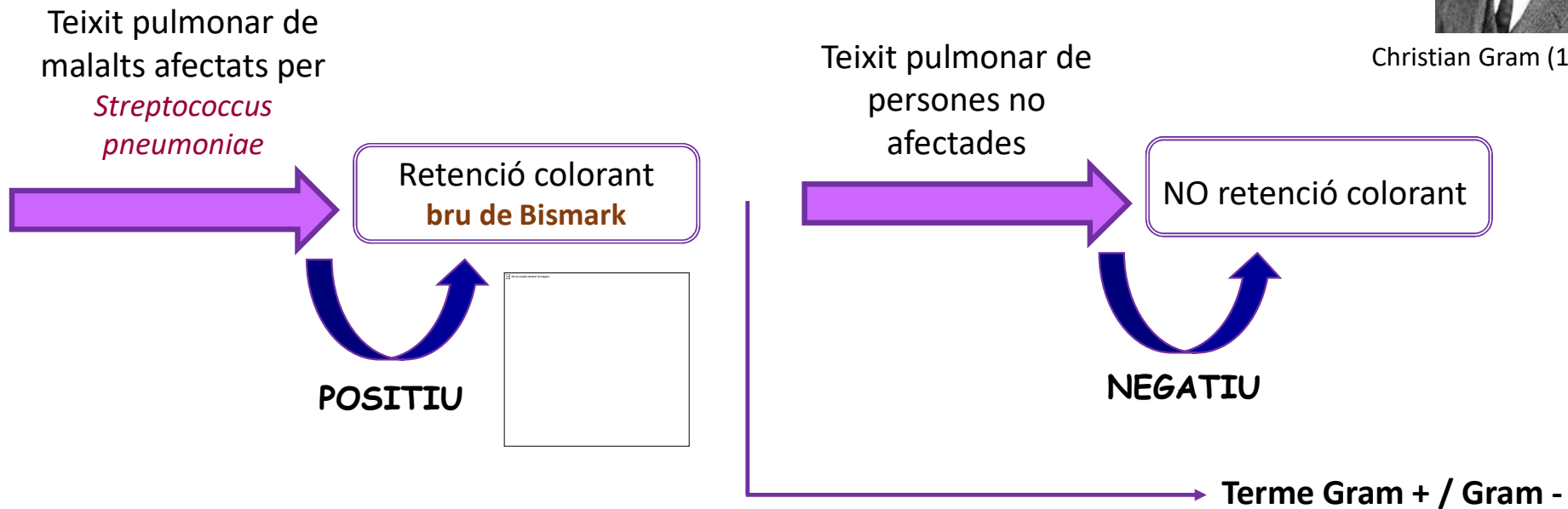


TINCIÓ diferencial de GRAM

- ✓ Una de les tècniques d'identificació més valuoses en bacteriologia i diagnòstic clínic



Christian Gram (1853-1938)



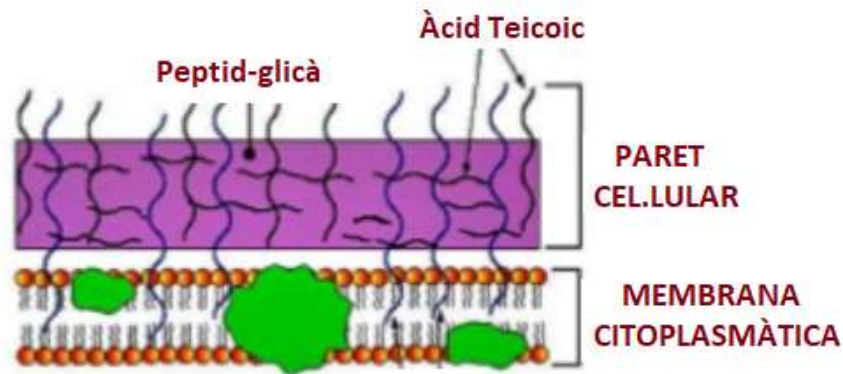
Gram de teixit: *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *H. pylori*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre altres.



TINCIÓ diferencial de GRAM

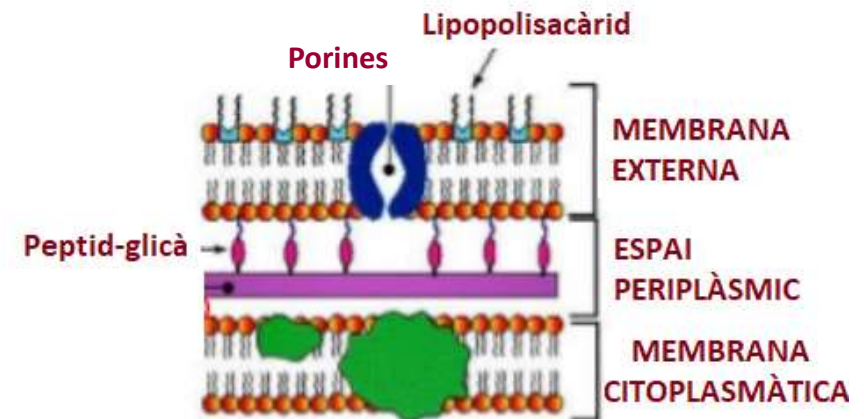
✓ Diferència sobre la base de les característiques de la paret cel·lular: **ESTRUCTURA FÍSICA** i **COMPOSICIÓ**

GRAM (+)



Es visualitzen de color morat
(paret cel·lular 90% peptidoglican)

GRAM (-)



Es visualitzen de color rosa o grosella
(paret cel·lular 10% peptidoglican + membrana
cel·lular+periplasma)



TINCIÓ diferencial de GRAM

✓ Diferència sobre la base de les característiques de la paret cel·lular: **ESTRUCTURA FÍSICA** i **COMPOSICIÓ**









| | GRAM + | GRAM - |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Color | Violeta | Rosa/Grosella |
| Paret cel·lular | Grossa (≈ 50 nm) | Prima ($\approx 15-20$ nm) |
| Capa externa LPS | Absència | Presència |
| Àcids lipoteïcoics i teïcoics | Presència | Absència |

Estabilització de la paret de peptidoglican



TINCIÓ diferencial de GRAM

✓ Diferència sobre la base de les característiques de la paret cel·lular: **ESTRUCTURA FÍSICA** i **COMPOSICIÓ**

| | Gram + | Gram - | Grampositives | Gramnegatives |
|-----------------------------------|---|--|---|--|
| 1. Addició del colorant primari |  |  | Gram (+) i Gram (-) es tinen amb VIOLETA CRISTALL | |
| 2. Addició del compost de iode |  |  | El VIOLETA CRISTALL forma un complex amb el iodo (lugol) (CV-I) | |
| 3. Addició del decolorant |  |  | El CV-I queda retingut per la capa de peptidoglican Gram (+) | L' alcohol altera la capa LPS, i el CV-I s'elimina Gram (-) |
| 4. Addició del colorant secundari |  |  | Color violeta retingut CV-I Gram (+) | Adquireix el color del colorant en segona etapa - contrast Gram (-) |



TINCIÓ DE GRAM

PROCEDIMENT

- Cobreix tota la preparació amb **VIOLETA CRISTALL** durant 1 minut.
- LUGOL** fins a eliminar el colorant (1 minut).
- Renta el lugol amb **AIGUA I ESCORRE**.
- Decolora la preparació amb **ETANOL 96°**.
- Fem **3 passades d'ETANOL 96°** de 10 s cada passada.
- Renta immediatament amb aigua.
- Aplica **fucsina bàsica** diluïda a la preparació durant 1 minut.
- Renta amb aigua i seca.
- Observa amb l'objectiu d'immersió (**100x**).

IMPORTANT

Col·locar sobre un portaobjectes, una suspensió aquosa del microorganisme.
Assecar la preparació per calor.
Fixar la preparació "tres talls a la flama"

Gram (-)

- Escherichia coli*
- Enterobacter cloacae*
- Pseudomonas fluorescens*
- Proteus hauseri*
- Salmonella sp.*
- Serratia marcescens*
- Aeromonas hydrophila*

Gram (+)

- Staphylococcus aureus*
- Bacillus sp.*
- Micrococcus luteus*
- Enterococcus faecalis*



Tinció de CÀPSULES

Estructura superficial que presenten molts bacteris en els seus ambients naturals, consistent en una acumulació de material mucós o viscós (polisacàrids, glicoproteïnes), situat externament respecte de la paret cel·lular: funció adhesió a l'hostatger, protecció contra fagocitosi, supervivència en ambients de deshidratació, protecció contra virus.

• Càpsula rígida

amb prou consistència estructural per a evitar l'entrada de partícules com les de tinta xinesa o nigrosina. Tenen un límit exterior definit.

• Càpsula flexible

poca consistència, de manera que no exclou partícules. A més, és deformable i manca de límits precisos.

• Càpsula integral

associada amb la superfície cel·lular, amb la paret cel·lular

• Càpsula perifèrica

associada a la superfície cel·lular només en determinades condicions, però finalment es dispersa al medi exterior

CÀPSULAS

Propietats

- Adhesió a altres cèl·lules: microcolònies i consorcis
- Adhesió a substrats inerts o vius: colonització dels seus nínxols ecològics (p. ex. teixits d'organismes superiors)
- Protecció contra agents antibacterians (metalls pesants, detergents, anticòssos)

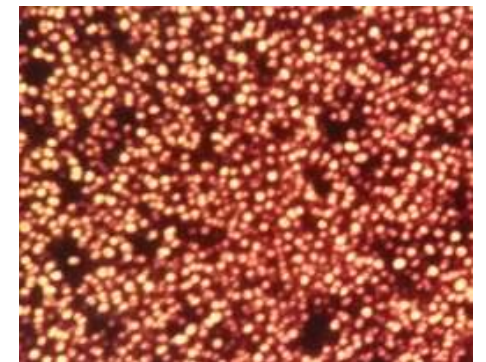
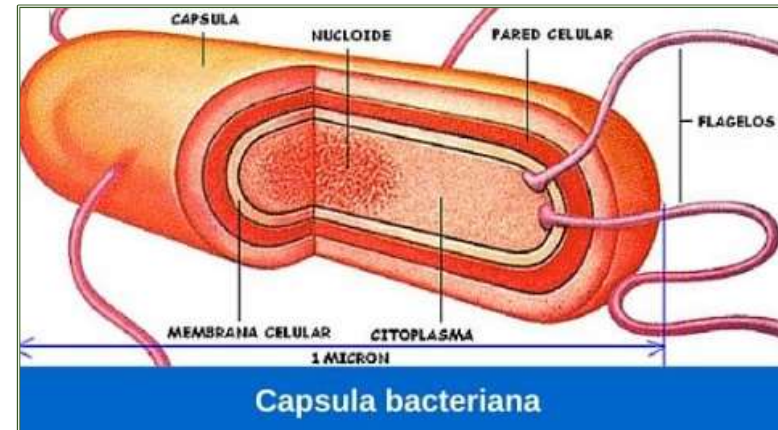
Cryptococcus neoformans
Streptococcus pneumoniae



Tinció de CÀPSULES

PROCEDIMENT TINCIÓ DE CÀPSULES

- Fer una suspensió densa de *Cryptococcus*.
- Assecar a l'aire fins que s'evapore tota l'aigua.
- Afegir **fuscina bàsica** i deixar actuar **5 minuts**.
- Eliminar l'excés de colorant amb aigua.
- Col·locar una gota de **nigrosina** en un extrem i estendre-la amb un altre portaobjectes.
- Deixar assecar i **observar a 40x**.



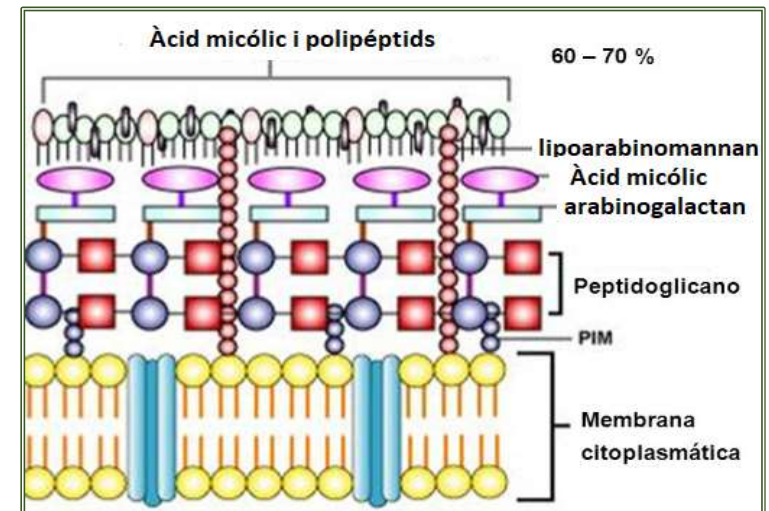


TINCIÓ diferencial de Ziehl Neelsen – ALCOHOLACIDORESISTÈNCIA

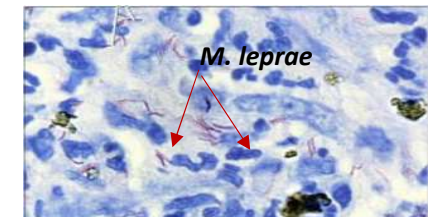
OBJECTIU: Diferenciar microorganismes en procés de TINCIÓ per la resistència a l'acció d'alcohols i àcids suaus (ÀCID-ALCOHOL RESISTENTS/ ÀCID-ALCOHOL NO RESISTENTS)

COMPONENTS DE PARET CEL·LULAR:

Elevat contingut lipídic → CERES amb gran diversitat d'ÀCIDS MICÒLICS (lípid hidroxilat i ramificats, complexos, units covalentment al peptidoglican)



- ++ (AAR) • ***Mycobacterium***: agent causant de tuberculosi i lepra
- (AAR) • ***Nocardia***: *Nocardia asteroides* encefalitis / abscess cerebral
- ***Cryptosporidium***: Infeccions pulmonars, diarrea, pancreatitis.
- ***Rhodococcus***: zoonosis – pneumònia, febre, abscess cerebral





TINCIÓ diferencial de Ziehl Neelsen – ALCOHOLACIDORESISTÈNCIA



Paul Ehrlich

El 24 de març de 1882

La tècnica força la penetració de la **fucsina fenicada (fenol + fucsina bàsica)** en la paret cel·lular mitjançant l'acció combinada del fenol i la calor.

↑ fluïdesa de la capa d'àcids micòlics

molècules de fucsina queden atrapades

↓ Calor

↑ Consistència cerosa

1. Addició colorant primari
(FUCSINA FENICADA)

2. CALOR per a fixar

3. Decolorar
(ALCOHOL -CLORHÍDRIC)

4. Cobrir amb BLAU-
METILÈ



TINCIÓ diferencial de Ziehl Neelsen

PROCEDIMENT

- Cobreix totalment la superfície de la preparació amb **fucsina bàsica** fenicada.
 - Amb la flama escalfa suaument durant **5 minuts**.
 - Moviments de vaivé, fins que s'observe que es desprenen els **primers vapors blancs**
-
- No deixes assecar el preparat.
 - Amb una pinça, aixeca acuradament la làmina portaobjectes.
 - Renta molt suau, i amb cura, la superfície eliminant totalment la solució de fucsina
-
- Inclina el portaobjectes per **eliminar l'excés d'aigua** i així evitar diluir els reactius que s'utilitzaran a continuació.
-
- Cobreix la totalitat de la preparació amb **solució decolorant (alcohol clorhídric)** aproximadament 3 minuts.
 - Renta amb abundant aigua** i elimina l'excés d'aigua inclinant el portaobjectes.
 - Cobreix la preparació amb **blau de metilè** i deixa actuar durant **1 minut**.
 - Renta amb abundant aigua a baixa pressió i observa al microscopi.



TINCIÓ diferencial de Ziehl Neelsen – Àcid alcohol RESISTÈNCIA

1. Addició colorant
primari (FUCSINA
FENICADA)

2. CALOR per a fixar

3. Decolorar
(ALCOHOL -CLORHÍDRIC)







4. Cobrir amb BLAU DE
METILÈ

ALCOHOLOACIDORESISTENTS

Retindran la coloració
proporcionada pel colorant

PRIMARI

Interacció àcids micòlics-
polipèptids amb fucsina fenicada
(**complex MICOLAT-FUCSINA**)

| AAR | no AAR |
|---|---|
|  |  |
|  |  |
|  |  |

NO ALCOHOLOACIDORESISTENTS

Es decoloren.

Acció d'alcohol-àcids
Manca d'interacció amb àcids
micòlics.






TINCIÓ diferencial d'endòspores BACTERIANES

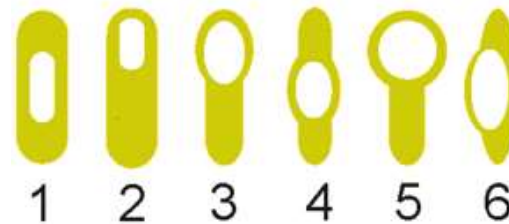
Una endòspora és una estructura bacteriana latent i no-reproductiva

ESPORES BACTERIANES – FORMES DE RESISTÈNCIA
Bacillus spp & Clostridium spp.

- T^{res} elevades
- Dessecació
- Agents químics
- Radiacions UV

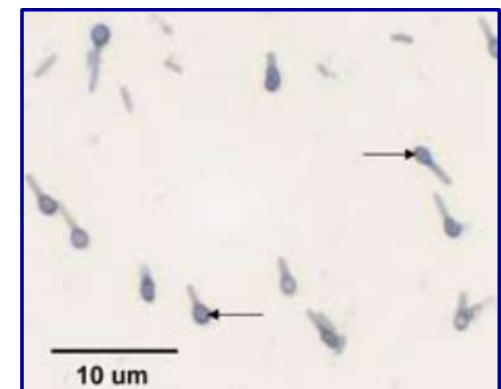
Posició, forma i deformació d'espores → Important en identificació

| Disposició de la endospora | |
|----------------------------|---|
| Central |  |
| Subterminal |  |
| Deformante |  |



(1, 4) Endòspora central
(2, 3, 5) Endòspora terminal
(6) Lateral

Clostridium tetani “baqueta de tambor”





TINCIÓ diferencial d'endòspores BACTERIANES

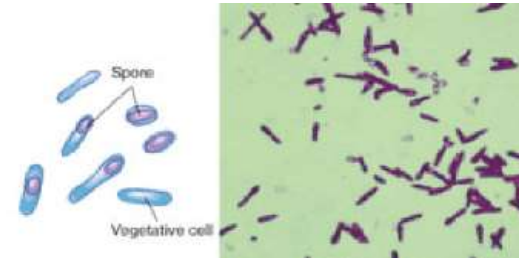
ESPORES BACTERIANES – FORMES DE RESISTÈNCIA

Bacillus spp & *Clostridium spp*.



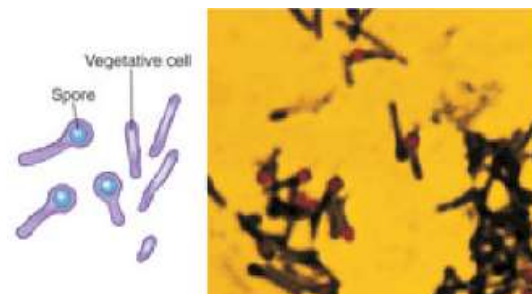
Bacillus anthracis

With central endospores



Clostridium perfringens

With subterminal endospores



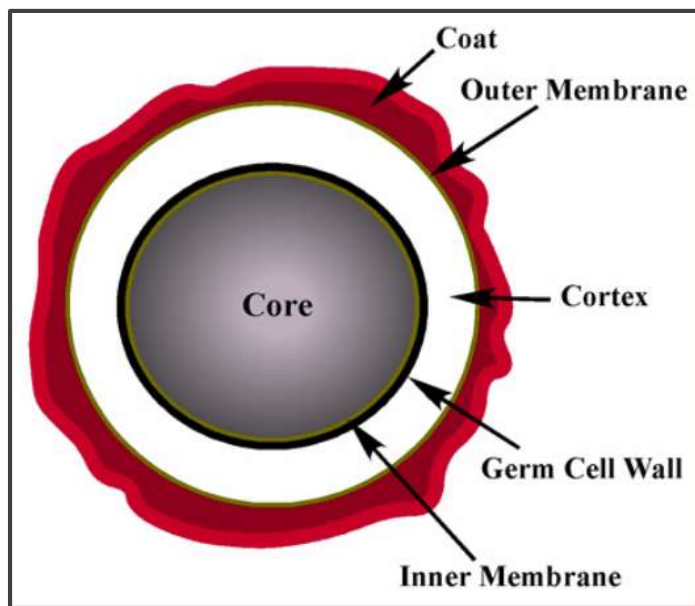
Clostridium tetani

With terminal endospores

B. marismortui – 250 milions anys



TINCIÓ diferencial d'endòspores BACTERIANES

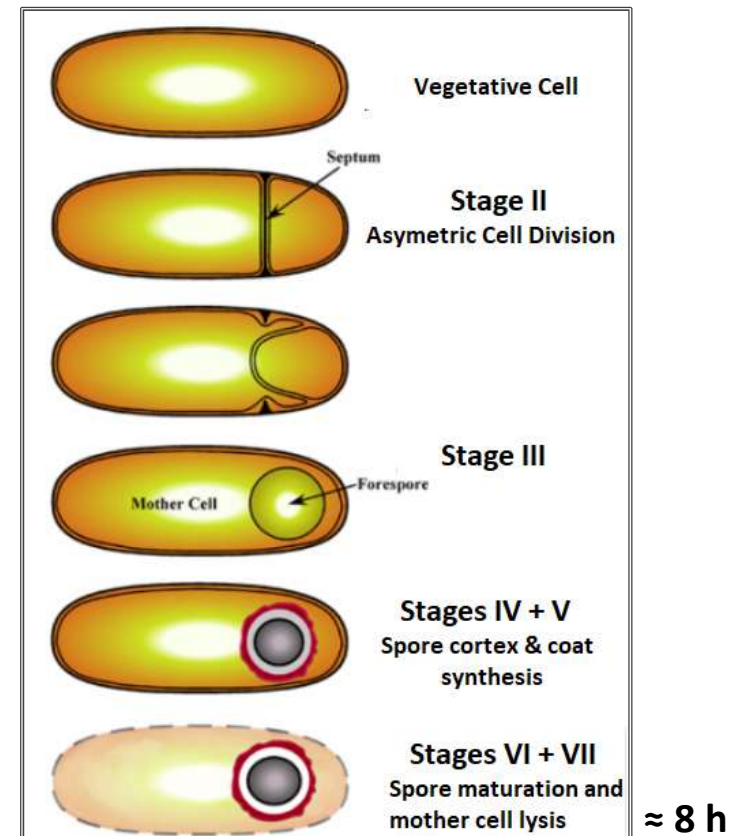


- ✓ **Membrana interna:** resistència química i enzimàtica
- ✓ **Cortex:** Capa de peptidoglican.
- ✓ **Cor:** ADN, ribosomes, àcid dipicolínic (DPA), SASPs (*small-soluble acid proteins*) protecció contra elevades temperatures i oxidants.

References

<https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/espanol/endospora-de-bacterias/>
<https://www.wikiwand.com/en/Endospore>

Formació de l'endòspora





TINCIÓ diferencial d'endòspores BACTERIANES



Journal of
Clinical Microbiology®

J Clin Microbiol. 2011 Dec; 49(12): 4379–4381.

doi: [10.1128/JCM.05129-11](https://doi.org/10.1128/JCM.05129-11)

Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning



Infection and
Immunity®

Pathogenesis of *Clostridium botulinum* Type A: Study of In Vivo Toxin Release by Implantation of Diffusion Chambers Containing Spores, Vegetative Cells, and Free Toxin

J. B. Suzuki, R. Booth, A. Benedik, and N. Grecz

germination and release of spore-bound toxin in this type of *C. botulinum* pathogenesis is essential.

Medical Daily

CONDITIONS

Dangers Of Eating 5-Day-Old Pasta, Rice: Liver Failure And Death

Es considera que no tota enterotoxina produïda per *B. cereus* és capaç de travessar intacta la barrera de l'estómac. Açò significa que les enterotoxines preformades o extracel·lulars presents en els aliments no tindrien cap paper en la patogènesi de *B. cereus*. Inclús es considera generalment que les **cèl·lules vegetatives no sobreviuen al baix pH** de l'estómac, però sí que ho **fan les espores**. Conseqüentment, la ruta del síndrome diarreic és:

PRESÈNCIA D'ESPORES → GERMINACIÓ de l'espóra → CREIXEMENT →
PRODUCCIÓ simultània de l'**enterotoxina**

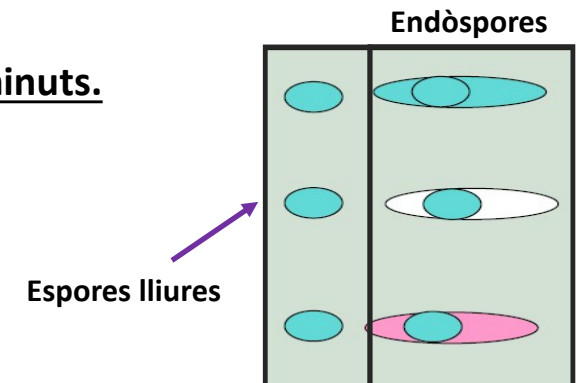


TINCIÓ diferencial d'endòspores BACTERIANES (Schaeffer Fulton)

ESPORES BACTERIANES – FORMES DE RESISTÈNCIA
Bacillus spp & Clostridium spp.

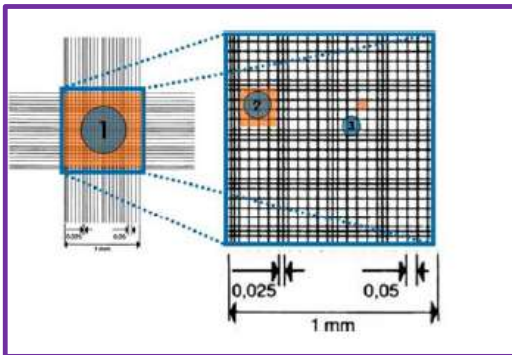
PROCEDIMENT

- ❖ Extensió d'un cultiu de *Bacillus sp.*
- ❖ Deixa que la preparació es refrede a les paral·leles i després cobreix-la totalment amb **VERD MALAQUITA**.
- ❖ Utilitzant l'encenedor de gas amb la flama al mínim, escalfa la part inferior del porta fins que observes que el verd malaquita fumeja lleugerament.
- ❖ El colorant ha d'estar en contacte amb la preparació i emetent vapors durant 10 minuts.
- ❖ Renta **amb aigua abundant** la preparació.
- ❖ Tenyeix la preparació durant **1 minut** amb **fucsina bàsica diluïda**.
- ❖ Renta, asseca i observa amb l'objectiu d'immersió (**100 x**)





■ SESSIÓ IX. Recompte microbià



Recompte microbià

□ Recompte de viables en placa



Laboratori de Microbiologia



Processos industrials



Seguretat alimentària

Quantificació microorganismes
en una mostra

Processos ambientals



Diagnosi clínica



Nombre de cèl·lules microbianes que tenim a la
mostra (per ml o per gram)

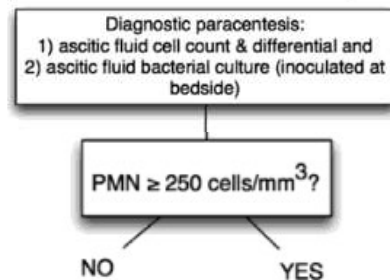




Distinguishing from secondary bacterial peritonitis

The fluid PMN count in secondary bacterial peritonitis is characteristically at least 250 cells/mm³ (usually thousands) and multiple organisms, including fungi, are identified on Gram stain and culture. Laboratory diagnostic criteria for secondary bacterial peritonitis includes 2 of the following: ascitic fluid protein greater than 1 g/dL, lactate

Spontaneous Bacterial Peritonitis Algorithm



Interès recompte microbià en clínica:

- Infectivitat
- Relacions dosis-resposta
- Pauta antimicrobiana

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario

El diagnóstico definitivo de la infección del tracto urinario (ITU) se realiza por cultivo cuantitativo de orina. Tradicionalmente se ha considerado que la presencia en orina de 100.000 o más bacterias/ml representa una bacteriuria significativa, indicativa de ITU.



Journal of
Clinical Microbiology®

Specific and Rapid Detection by Fluorescent In Situ Hybridization of Bacteria in Clinical Samples Obtained from Cystic Fibrosis Patients

Specimen Selection, Collection and Processing

Specimens selected for microbiologic examination should reflect the disease process and be collected in sufficient quantity to allow complete microbiologic examination. The number of microorganisms per milliliter of a body fluid or per gram of tissue is highly variable, ranging from less than 1 to 10⁸ or 10¹⁰ colony-forming units (CFU).



RECOMPTES MICROBIANS

RECOMPTES INDIRECTES

Són aquells en què és avaluada la quantitat de microorganismes fent ús de la concentració o abundància d'un component cel·lular determinat.

ATP

ARN

PROTEÏNES

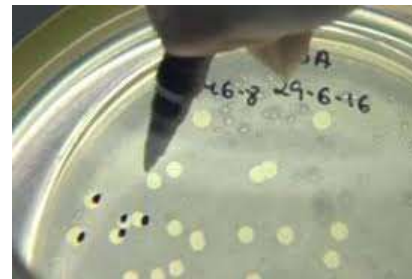
LPS

factor de conversió adequat

Limitacions importants

- ✓ Barreja complexa de microorganismes → diferent composició
- ✓ Influència de l'estat fisiològic del bacteri (p. ex.: ATP, ARN)

RECOMPTES MICROBIANS



RECOMPTES DIRECTES

Són aquells que es realitzen tenint en compte la presència de cèl·lules microbianes en la mostra i no en un dels seus components.

TOTALS

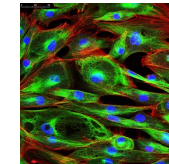
VIABLES



RECOMPTES MICROBIANS- Recomptes directes

Recomptes de totals

- Cambres de recompte:
 - Neubauer
 - Thoma
 - Bürker
- Tècniques microscòpiques: Microscòpia òptica o electrònica
- Citometria de flux



Recomptes de viables

- Nombre més probable (NMP)
- Espectrofotometria (terbolesa associada al creixement microbià medi líquid)
- Medi sòlid → recompte en placa selectius/diferencials/cromògens





RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes directes-totals

Citometria de flux

Mètode analític que permet la mesura d'emissió de fluorescència i dispersió de llum, per part de cèl·lules induïdes adequadament, a mesura que desfilen o passen d'una en una, arrossegades per un flux portador, enfront d'un sistema detector.

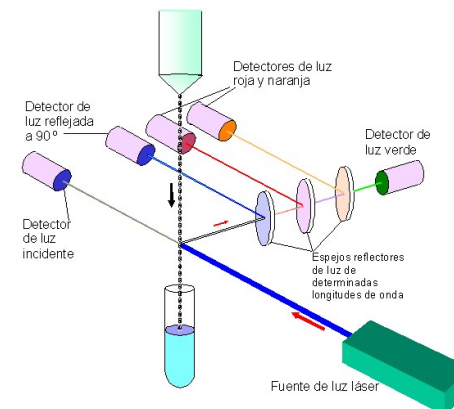
Aquest corrent de cèl·lules es fa passar al través d'un orifici amb detector, projectant un eix de llum làser. La dispersió i la reflexió de la llum són analitzades en duració, intensitat i espectre.



INFORMACIÓ:

- Fisiologia cel·lular;
- Nombre de cèl·lules;
- Viabilitat;
- Identitat genètica;

FLUOROCROMS: Fluoresceïna (verd), ficoeritrina (roig), rodamina,...



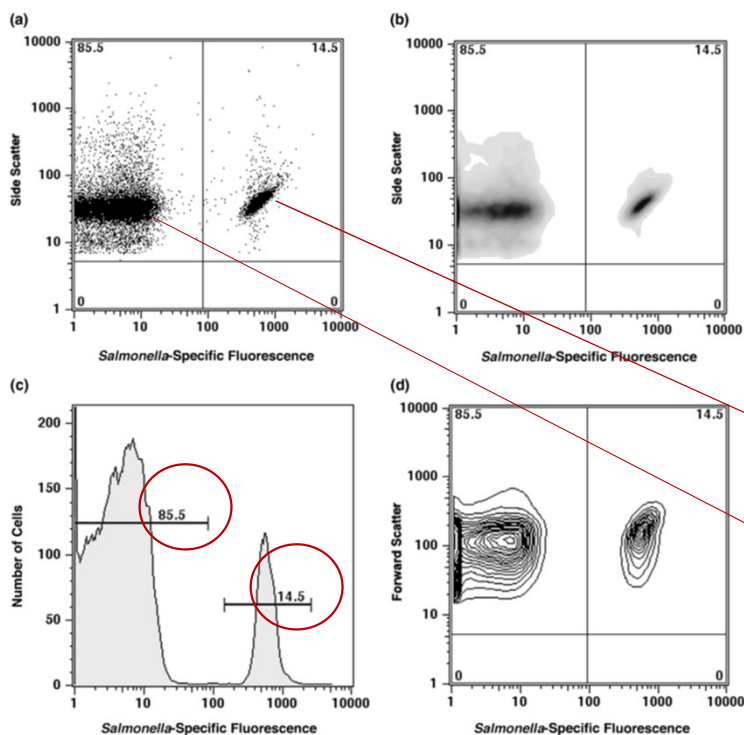


RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes directes-totals

Citometria de Fluxe

Diferents opcions de visualització de dades:

- a) Diagrama de punts
- b) Diagrama de densitat
- c) Histograma
- d) Diagrama de contorn



▶ Població de salmonella (14,5%)

▶ Població d'altres espècies (85,5%)





RECOMPTE MICROBIANS – Recomptes directes-totals versus viables

Microscòpia d'epifluorescència

VIABILITAT D'UN BACTERI



- Membrana intacta i funcional
- Activitat metabòlica
- Habilitat per a reproduir-se en cultiu



La falta de reproducció no necessàriament indica **NO-VIABILITAT**

- Subletalment danyades
- Propietat inherent de certes soques (*Campylobacter*)

DAMAGE

CÈL·LULES VIABLES NO CULTIVABLES



No creixement en medi cultiu





RECOMPTE MICROBIANS – Recomptes *directes-totals versus viables*

Microscòpia - Mètodes

EXCLUSIÓ DE COLORANTS



Es fonamenta en la impossibilitat de penetració de certs colorants quan la membrana plasmàtica està intacta.

El blau tripan, l'eosina, l'eritrosina, la primulina, i el propidi no traspassen membranes intactes.

ATENCIÓ: aquells bacteris que admeten el blau tripan o el propidi són morts, però aquells que no els accepten no són necessàriament viables.



RECOMPTE DIRECTE VIABLES



La capacitat de multiplicació és un bon indicador de viabilitat d'una cèl·lula.

En presència d'àcid nalidíxic (inhibidor de la DNA-girasa) i nutrients, les cèl·lules que poden dividir-se incrementaran la longitud (elongació), però no completaran la formació de membrana i no es produirà la septació de la cèl·lula.

El mètode consisteix a incubar les cèl·lules a temperatura òptima en presència àc. nalidíxic i extracte de llevat. Es filtra i es colora amb colorants fluorescents. Observació amb microscopi d'epifluorescència

CÈL·LULES VIABLES = CÈL·LULES ELONGADES



RECOMPTE MICROBIANS – Recomples directes-totals versus viables

Microscòpia - mètodes

2 COLORANTS

Aquest mètode emprà un procediment de tinció DUAL per a diferenciar entre cèl·lules viables i no viables.

SYTO@9

Tenyeix tant bacteris intactes com danyats.

Iodur de propidi

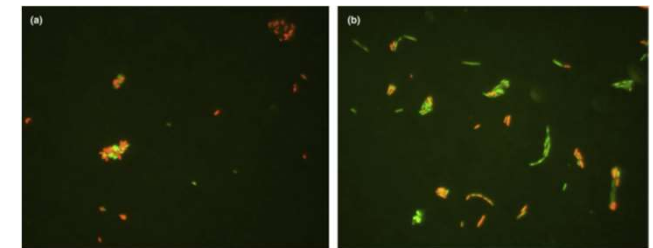
Entra en les cèl·lules danyades.

SYTO@9

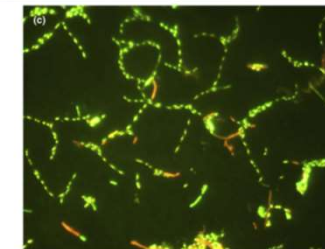
+

Iodur de propidi

El propidi interactua amb el SYTO 9 i canvia la fluorescència del SYTO.



- Classifica totes les cèl·lules com a mortes. **Recuperació?**
- Classifica totes les cèl·lules intactes com a viables. **I si no es reproduïxen?**



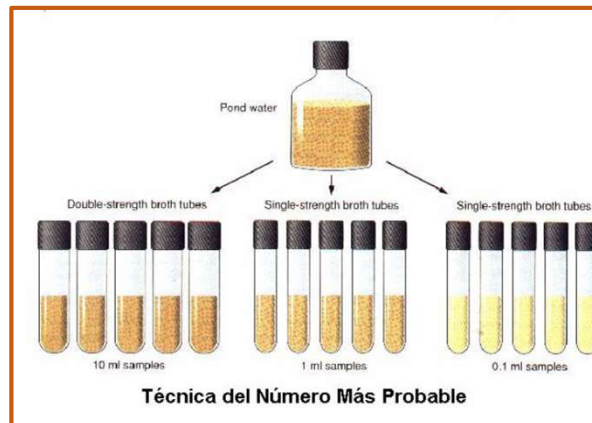


RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes directes-Viables

Nombre més probable (NMP)

Es fonamenta en el fet que com més gran siga el nombre de bacteris en una mostra, major serà la dilució necessària per a reduir la densitat fins al punt de trobar la dilució en què no es desenvolupe cap bacteri seguint tubs de dilució.

Consisteix en el recompte del **nombre de tubs que presenten creixement** (o la característica típica del microorganisme que volem quantificar) en diverses sèries de tubs replicats, quan en cada sèrie s'han inoculat dilucions decimals seriadades de la mostra original (p. ex. 3 series amb 5 rèpliques).





RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes directes-Viables

Nombre més probable (NMP)

- La distribució de tubs positius i negatius en cada sèrie està tabulada probabilísticament (**taules de McCrady**).
- En aquestes taules s'ofereix el **nombre més probable (NMP)** de viables en la mostra original que correspondria a aquesta distribució, així com de l'interval de valors al 95% de probabilitat.

Només s'empra en aquells casos en què els microorganismes que es volen quantificar:

- a) **No creixen en medis sòlids** (o ho fan de forma lenta i ineficient).
- b) Es vol enumerar una part dels viables presents que posseeix una característica que es manifesta millor o únicament en medis líquids.

| TABLA DEL NMP | | | | (Número más probable /100 ml)) | | | |
|---|------|--------|-----|--------------------------------|------|--------|-------|
| Número de tubos que dan reacción positiva en las series de tres tubos inoculados con: | | | | | | | |
| 10 ml | 1 ml | 0,1 ml | NMP | 10 ml | 1 ml | 0,1 ml | NMP |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 | 23 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 1 | 39 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 2 | 64 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 3 | 1 | 0 | 43 |
| 1 | 1 | 0 | 7 | 3 | 1 | 1 | 75 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3 | 1 | 2 | 120 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3 | 2 | 0 | 93 |
| 2 | 0 | 0 | 9 | 3 | 2 | 1 | 150 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3 | 2 | 2 | 210 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 3 | 0 | 240 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 3 | 3 | 1 | 460 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 3 | 3 | 2 | 1.100 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | | | | |

Recomptes de coliformes

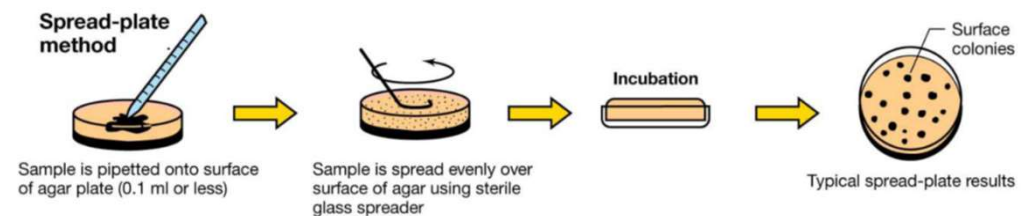


RECOMPTE MICROBIANS – Recomptes directes-Viables

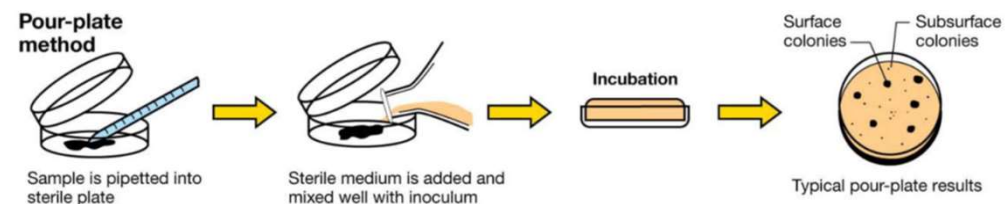
Recomptes en medi sòlid (UFC)

- ❑ Aquest tipus de tècniques es basen en el recompte de colònies en medi sòlid.
- ❑ Assumim que cada colònia es desenvolupa a partir d'**UNA ÚNICA CÈL·LULA VIABLE**.

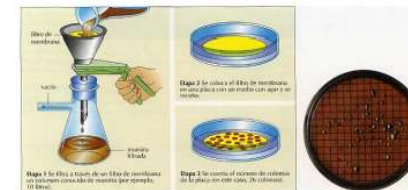
En superfície: mitjançant l'ansa colzada



En profunditat: Es diposita la mostra en una placa buida, s'hi aboca el medi fos, es barreja i es deixa solidificar a la placa.



Per filtració: Quan la càrrega microbiana és baixa, hem de filtrar la mostra, per tal de concentrar les cèl·lules microbianes retingudes a la membrana. Posteriorment, incubarem la membrana en un medi de cultiu adequat.





RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes directes-Viables

Recomptes en medi sòlid (UFC)

Inconvenients de la sembra en profunditat enfront de la sembra en superfície:

- Pèrdua de viabilitat de microorganismes termosensibles.
- Les colònies crescudes dins l'agar són menors que les superficials. Dificultat de recompte.
- Temps de preparació més llarg que en sembra en superfície.
- Taxa de creixement més llarga en bacteris aerobis.





RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes directes-Viables

Recomptes en medi sòlid (UFC) - ANAEROBIS



Els bacteris anaerobis són bacteris que no necessiten oxigen per a viure.

- **Anaerobis facultatiu:** creixen en presència o manca de O₂
- **Microaeròfils:** requereixen la mínima concentració de O₂ (p. ex., 5%) i en molts casos, una concentració elevada de CO₂ (p. ex., 10%); creixen molt poc en condicions anaeròbies
- **Anaerobis obligats:** no poden desenvolupar el metabolisme aerobi, però tenen tolerància variable al O₂
 - **Estricta:** tolera sols ≤ O₂ al 0,5%
 - **Moderat:** Tolera O₂ al 2-8%
 - **Anaerobis aerotolerant:** toleren el O₂ atmosfèric per temps limitat

GRAM -

- *Bacteroides*
- *Fusobacterium*
- *Porphyromonas*
- *Prevotella*

GRAM -

- *Actinomyces*
- Clostridios: *C. perfringens*; *C. botulinum*; *C. tetani*; i *C. difficile*
- *Peptostreptococcus*
- *Propionibacterium*



RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes directes-Viables

Recomptes en medi sòlid (UFC) – Sistemes incubació anaerobis

L'elecció vindrà determinada pels costos, nombre de cultius, i limitacions d'espai.



Cambres d'anaerobiosis:
barreja de gasos que conté
5% de H_2 , 5-10% de CO_2 i
85-90% de N_2 .



Flascons d'anaerobiosi:
l'atmosfera s'obté entre 1 i 2 h
després d'introduir uns sobres
en els quals, en afegir-hi H_2O ,
s'allibera H_2 i CO_2



Bosses d'anaerobiosi:
transport o incubació. Ús
de generadors de gasos
com flascons.

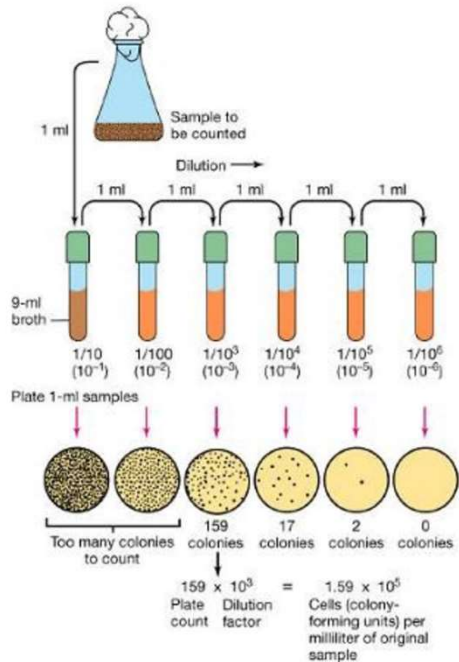
És important **monitorar** l'ambient anaerobi amb una tira indicadora de blau de metilè o de resazurina.





RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes viables en placa

El recompte en **placa en superfície** es fonamenta en el recompte de les **unitats formadores de colònies** que apareixen després de dispersar una alíquota de la mostra problema (o d'una dilució d'aquesta) en la superfície d'una placa de medi sòlid.



Hi ha un límit de fiabilitat establert per als recomptes en placa, de manera que, perquè el recompte siga vàlid, les plaques han de contenir entre 20 i 200 colònies (30 a 300 en el cas de *pour plates*).

El resultat d'un recompte de colònies s'expressa sempre en nombre **d'unitats formadores de colònia (ufc) per mil·lilitre o gram de mostra**, especificant el valor com una sola xifra amb un o dos decimals, **multiplicat per l'ordre de magnitud del recompte**.

INCORRECTE

245.000 cèl·lules/ml

84,9 x 10³ ufc/g

CORRECTE

2,5 x 10⁵ ufc/ml

8,5 x 10⁴ ufc/g

A més, cal especificar el tipus de recompte de viables en cada cas: **medi de cultiu i condicions emprades**.



RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes viables en placa

Procediment

Mostra: aigua/terra

Microorganismes: heteròtrofs aerobis i mesòfils

Medi: Agar TSA

Condicions incubació: 28 °C, 24 hores, en aerobiosi



Els recomptes es realitzaran en grups de 8 **estudiants** per mostra i recompte.

1. Assegura't que disposes de les **pipetes**, una **placa** de medi de cultiu, **tubs** amb 4,5 ml de sèrum salí estèril i una **ansa colzada** submergida en alcohol. Tots els tubs de diluent estèril han d'estar retolats amb la dilució de la mostra que han de contenir (10^{-1} a 10^{-8}) i les plaques, amb la identificació de la mostra i dilució que s'ha de sembrar.

2. Agafa el matràs o botella amb la mostra i, seguint el protocol d'inoculació asèptica, **transfereix 0,5 ml** de l'aigua al tub de diluent estèril (serà la dilució 10^{-1} o 1/10).

3. Porta el tub a l'**agitador** de tubs i homogeneïtza la dilució durant 20 segons, subjectant bé el tub.





RECOMPTES MICROBIANS – Recomptes viables en placa

Procediment

4. Agafa una **nova PUNTA** i transfereix, en condicions asèptiques, 0,5 ml del seu contingut al **següent tub de dilució** (10^{-2}). Repeteix l'operació fins a realitzar la dilució 10^{-8} .

5. A partir de les dilucions realitzades, **inocula 0,1 ml en les plaques** de medi de cultiu.

6. Agafa l'**ansa colzada** del recipient amb alcohol, flameja-la breument i usa-la per repartir els 0,1 ml que has posat en la superfície de la placa de manera que tota la humitat superficial desaparega. Gira la placa i porta-la a incubació.



7. **Calcula** el nombre d'unitats formadores de colònia per ml o per gram de la mostra original i expressa el resultat en format correcte.

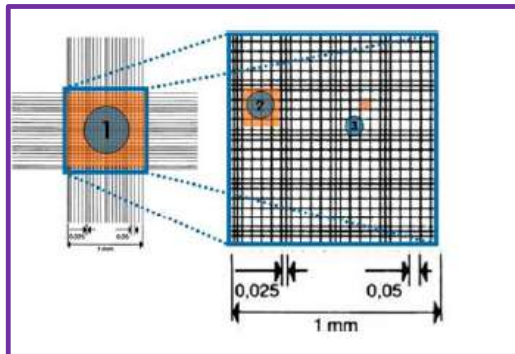
$$R \text{ (UFC/g)} = \frac{1}{D_M} \times \frac{1}{V_p} \times \frac{1}{D_{\text{tub}}} \times R_m$$

D_M : dilució de mostra original

V_p : volum per placa

D_{tub} : dilució seriada

R_m : recompte mitjà (UFC)



□ Recompte de totals en cambra de Thoma



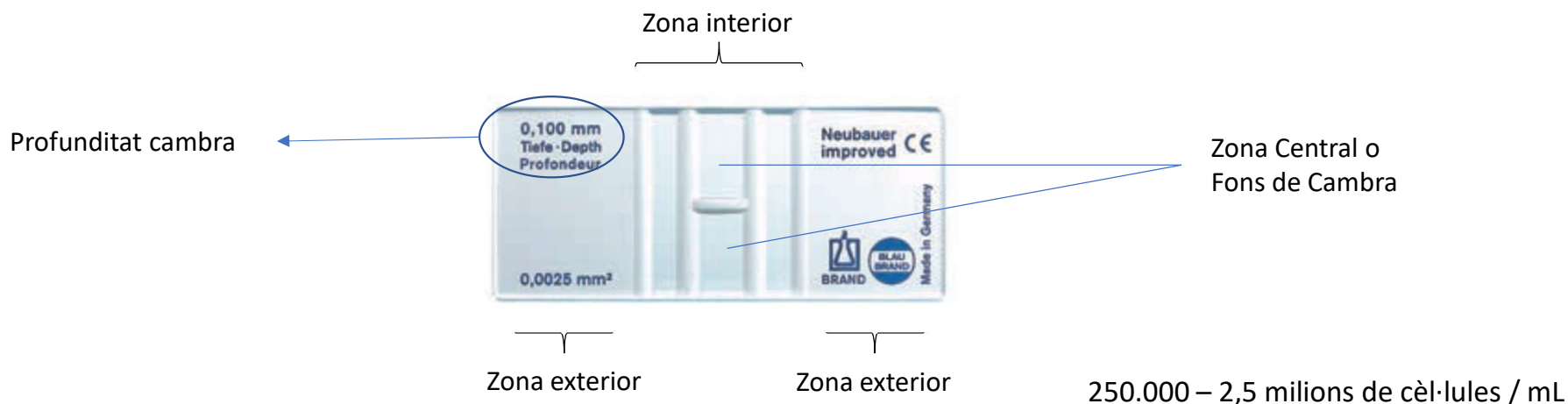


RECOMPTE MICROBIANS- Recomptes directes - totals

Cambres de recompte

Les cambres de recompte s'utilitzen per a determinar el nombre de partícules/cèl·lules per unitat de volum d'un líquid: leucòcits, eritròcits, trombòcits, bacteris, espores, pol·len etc. Es recompten visualment al microscopi.

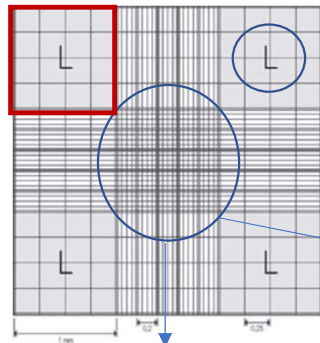
Una cambra de recompte és una quadrícula de superfície coneguda, gravada en un portaobjectes especial i proveïda d'un cobreobjectes que permet establir una alçada precisa un cop muntat.





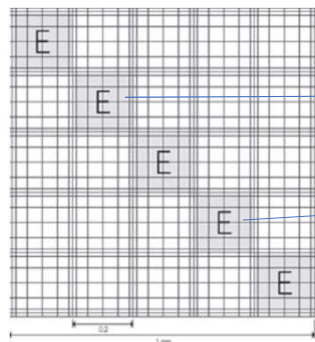
RECOMPTE MICROBIANS- Recompptes directes - Totals

Cambres de recompte - Neubauer Improved



La quadrícula de recompte mostra **9 quadres grans**, cadascun de 1 mm^2 .
Els 4 quadres grans dels cantons assenyalats amb una "L" estan dividits en 16 quadres amb arestes de $0,25 \text{ mm}$.

El **quadre gran** central està dividit en **25 quadres mitjans** amb arestes de $0,2 \text{ mm}$.
Cada quadre mitjà està subdividit en **16 quadres menuts** amb arestes de $0,05 \text{ mm}$ i una superfície de $0,0025 \text{ mm}^2$.



El 5 quadres de la diagonal central assenyalats amb una E s'utilitzen per a fer el recompte (**microbià, eritròcits, trombòcits**).

Tots els quadres mitjans presenten als 4 costats línies triples.



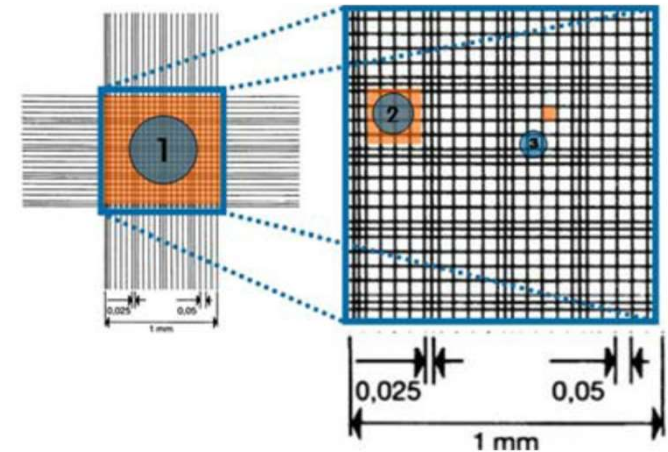
RECOMPTE MICROBIANS- Recompptes directes - Totales

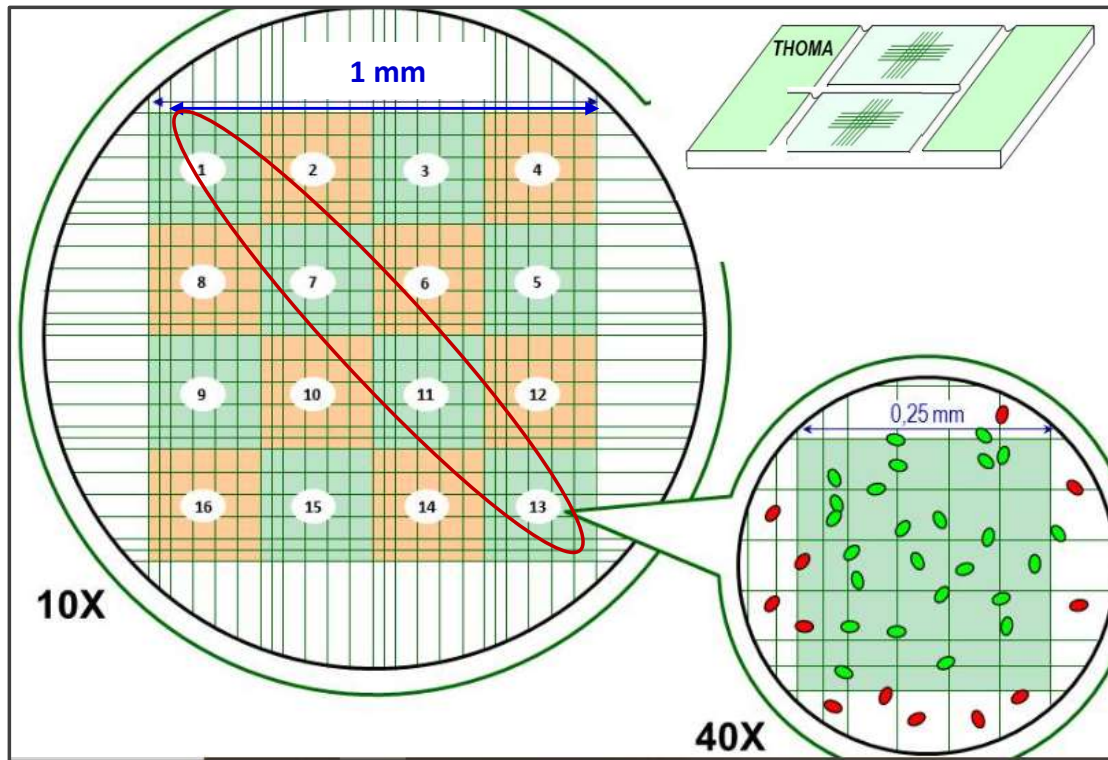
Cambra de recompte - Thoma

La cambra de Thoma és una retícula d'1 mm de costat dividida en 16 quadres principals, cada un dels quals està dividit en 25 quadrets petits (16 quadres grans x 25 quadrets petits = 400 quadrets totals).

Les línies que la formen es perllonguen en les quatre direccions per facilitar-ne la visualització al microscopi. Al costat tens una ampliació d'un dels 16 quadres principals amb els seus 25 quadrets, amb la senyalització emprada per a distingir el primer quadre petit de la cantonada de cada un dels grans.

El cobreobjectes que se situa sobre la cambra deixa una alçada (un cop ple per capil·laritat amb la mostra) de 0,1 mm. Atès que la cambra (els 400 quadrets) té 1 mm² de superfície total, el volum de mostra contingut entre un dels quadrets petits (1/400 mm²) i el cobreobjectes és d'1 / 4.000 mm³.





1. **QUADRE**: Superfície 1mm^2 / objectiu de **10X**
2. Compost per **16 quadres mitjans (40X)**
3. Quadre mitjà: **25 quadre menuts (9 dividits meitat)**

$$V_{\text{mostra}} = \text{Llarg} \times \text{Ample} \times \text{Profund}$$

$$V_{\text{mostra}} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$$

$$V_{\text{mostra}} = 0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml} = 0.1 \mu\text{l}$$

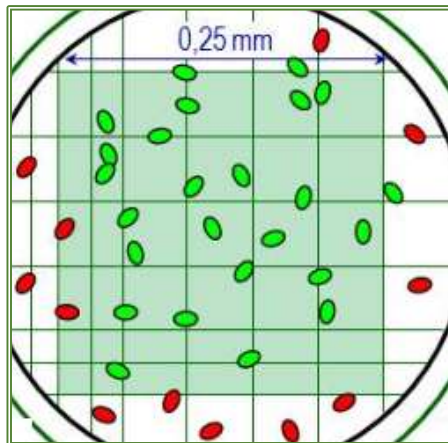
LOCALITZAR CÈL·LULES (10X)

COMPTAR CÈL·LULES (40X)



LOCALITZAR CÈL·LULES (10X)

COMPTAR CÈL·LULES (40X)



$$V_{\text{per quadre}} = [1/4000] \text{ mm}^3$$

$$UFC_{\text{mostra}} = [(\bar{X})_{\text{quadrets}} : V_{\text{per quadre}}] = UFC/\mu\text{l}$$

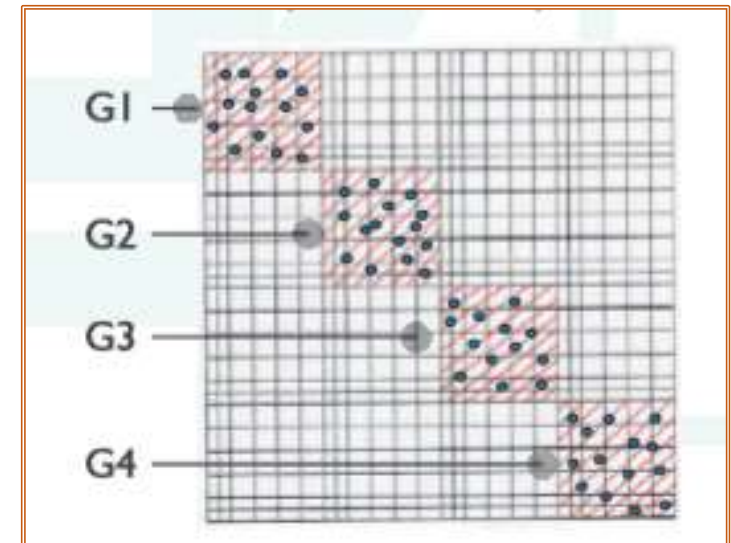
És necessari comptar almenys **20 quadrets en diagonal** (és a dir, tots els quadrats d'una de les diagonals) per a obtenir un recompte fiable. El criteri ha de ser definit (p. ex. Incloent-hi aquelles cèl·lules que toquen el costat superior i dret de cada quadret), encara que es troben parcialment fora. Seguint aquest criteri, recomptem les cèl·lules assenyalades en verd i no recomptem les roges.



RECOMPTES MICROBIANS- Recomptes directes - Totales

Exemple de recompte

Grupo 1 (G1) de 25 cuadros --> 14 levaduras
 Grupo 2 (G2) de 25 cuadros --> 15 levaduras
 Grupo 3 (G3) " --> 13 "
 Grupo 4 (G4) " --> 14 "

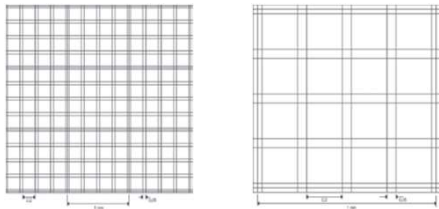


$$\frac{14 \text{ levaduras}}{25 \text{ cuadros}} \times \frac{400 \text{ cuadros}}{0.1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = 2.24 \text{ millones de levaduras / mL}$$



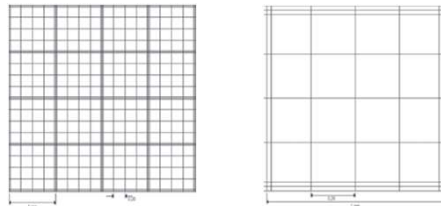
RECOMPTES MICROBIANS- Recomptes directes - Totales

Cambres de recompte – Altres cambres



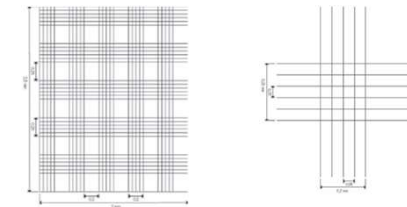
BÜRKER

Eritròcits i
trombòcits



FUCHS-ROSENTHAL

Cèl·lules en líquid lumbar



MALASSEZ

Cèl·lules en líquid lumbar o
recompte de nematodes



RECOMPTES MICROBIANS - Cambra de recompte

Procediment

1. **Situa el cobreobjectes** sobre les dues cambres gravades a la zona central elevada, de manera que les dues quadrícules queden cobertes.
2. Prepara una suspensió de llevat *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Ompli una pipeta Pasteur amb una suspensió de cèl·lules de llevat.
4. Recolza la punta al costat del cobreobjectes de la cambra i deixa que **s'ompliga l'espai entre porta i cambra** per capil·laritat. Repeteix l'operació a l'altra cambra del portaobjectes.
5. Porta la cambra al **microscopi** i enfoca una de les dues quadrícules amb l'**objectiu 10x**.
6. Guia't per les línies paral·leles que s'estenen més enllà de la quadrícula.
7. Centra el camp sobre una de les cantonades de la graella, la que tinga el seu quadret de la cantonada travessat per dues línies fines que es perllonguen per tota la fila/columna de quadrets petits.





RECOMPTES MICROBIANS - Cambra de recompte

Procediment

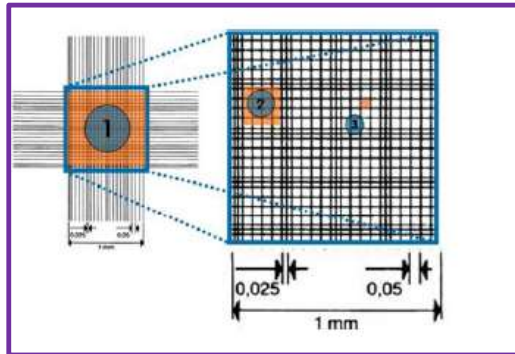
8. Passa a l'**objectiu de 40x** sense moure la platina i ajusta l'enfocament: has de poder veure tot un quadre principal amb els seus 25 quadrets petits.
9. **Comença el recompte** pel quadret encreuat i ves anotant les cèl·lules d'aquest i dels altres quatre quadrets (sense creu) de la diagonal.
10. **Canvia de camp i enfoca el següent quadre principal** de la diagonal que estàs seguint: el seu primer quadret (el 6è del recompte) haurà d'estar encreuat per dues línies fines. Recompta les cèl·lules d'aquest quadre i dels quatre següents (sense creuar) i repeteix l'operació fins que ***hages explicat els 20 quadrets de la diagonal completa.***





Recompte microbià

Resolució problemes de recompte



Laboratori de Microbiologia



Calcula el nombre de microorganismes viables per gram de terra, tenint en compte que has ressuspès 25 g de terra en 75 ml d'aigua de peptona. A partir d'aquesta solució "mare" has fet 4 dilucions decimals (1 ml en 9 ml d'aigua de peptona) seriades i, en sembrar, has portat 100 μ l de cada tub (dilució) a placa, de manera que s'han obtingut 50 colònies en l'última de les dilucions.



Mostra de terra



RECOMPTE DELS MICROORGANISMES
HETERÒTROFS EN PLACA



Nombre de
microorganismes
expressat com a
(UFC/g de mostra)



2×10^7 UFC/g

25 g \approx 25 ml $\rho = 1$ g/ml

[25 ml : 100 ml]

$$R \text{ (UFC/ml)} = \frac{100}{25} \times \frac{1}{0.1} \times \frac{1}{10^{-4}} \times 50$$

D_M : Dilució de mostra original

V_p : Volum per placa

D_{tub} : Dilució seriada

R_m : Recompte mitjà (UFC)

Laboratori de Microbiologia



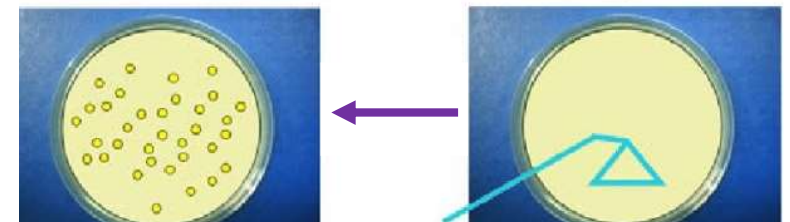
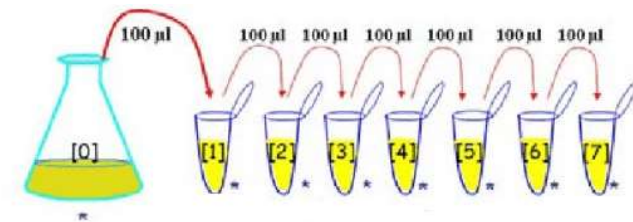
El nombre d'UFC d'un cultiu bacterià es 19×10^8 .

Sabent que el recompte en placa en la qual havia estat sembrat $10 \mu\text{l}$ de mostra és 19, quina és la dilució que s'ha considerat per fer el càlcul?

Dilució = 10^{-6}

$$19 \times 10^8 = \frac{1}{1} \times \frac{1}{0.01} \times \frac{1}{X} \times 19$$

D_M : Dilució de mostra original
 V_p : Volum per placa
 D_{tub} : Dilució seriada
 R_m : Recompte mitjà (UFC)

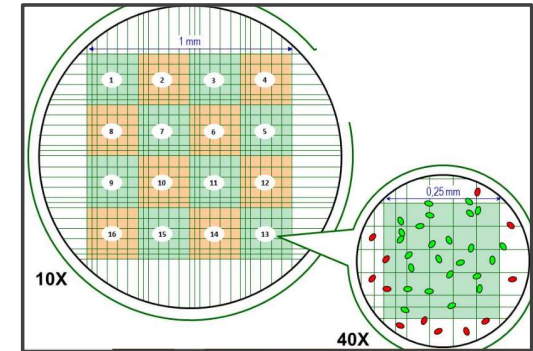


Laboratori de Microbiologia



- ✓ Fem créixer en un medi líquid un fong i, una vegada crescut, passem a fer el recompte d'espores produïdes en cambra de Thoma.
- ✓ El nombre d'espores al microscopi és massa gran, i fem una dilució 1/5.
- ✓ Els resultats que s'obtenen de recomptar 30 QUADRETS de la cambra són

1 quadre: 0.05 mm costat - 0.1 mm alçada



| | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 21 | 21 | 24 | 18 | 22 | 14 | 9 | 20 | 19 | 9 |
| 20 | 21 | 22 | 25 | 20 | 22 | 20 | 14 | 26 | 24 |
| 23 | 18 | 11 | 23 | 24 | 17 | 27 | 26 | 19 | 21 |



← Inocular 50 g farina amb 10^6 espores/g
Quants ml de la dilució [1:5] necessitem?

Laboratori de Microbiologia



Suspensió original → fem una dilució 1/5

| | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 21 | 21 | 24 | 18 | 22 | 14 | 9 | 20 | 19 | 9 |
| 20 | 21 | 22 | 25 | 20 | 22 | 20 | 14 | 26 | 24 |
| 23 | 18 | 11 | 23 | 24 | 17 | 27 | 26 | 19 | 21 |



600 cèl·lules

$$\text{Cèl·lules per } \mu\text{l de volum} = \frac{\text{cèl·lules recomptades}}{\text{superf. compt. (mm}^2\text{) x profunditat de la cambra (mm) x dilució}}$$

$$X \text{ (cél/}\mu\text{l)} = \frac{600}{(0.05 \times 0.05) * 0.1 * 30}$$

$$X \text{ (cèl/ml)} = 8 \times 10^7$$



Inocular 50 g farina amb 10^6 espores/g
Quants ml de la solució diluïda necessitem?

Necessitem $50\text{g} \times 10^6$ espores/g
 $= 5 \times 10^7$ espores



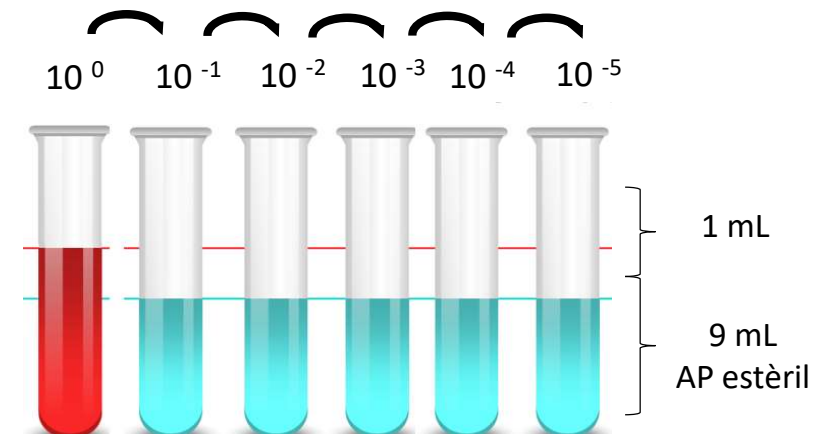
0.625 ml dilució

Laboratori de Microbiologia



- ✓ Hem de fer un recompte de viables en placa mitjançant dilucions seriades.
- ✓ Portem 0.2 ml de cada dilució a placa (per triplicat). Incubem 28 °C, 5 dies.

| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| EXP1 | 4.6x10 ⁵ | 5.1x10 ⁴ | 7.6x10 ³ | 871 | 93 | 18 | 0 |
| EXP2 | 3.8x10 ⁵ | 4.6x10 ⁴ | 6.7x10 ³ | 779 | 84 | 15 | 1 |
| EXP3 | 1.6x10 ⁵ | 5.4x10 ⁴ | 6.2x10 ³ | 860 | 78 | 16 | 1 |



Quin és el nombre de microorganismes viables per 100 ml?

$$R \text{ (UFC/ml)} = \frac{1}{0.2} \times \frac{1}{10^{-5}} \times [(93+84+78)/3]$$

$$R \text{ (UFC/ml)} = 4.2 \times 10^7 \text{ UFC/ml}$$

$$R \text{ (UFC/ml)} = 4.2 \times 10^9 \text{ UFC/100ml}$$

Laboratori de Microbiologia



Tenim una mostra de 15.63 g de carn i hem de determinar la presència d'un **bacteri A**

- Gram (+)
- Catalasa (+)
- Produeix una toxina



15.63 g carn



75 ml solució
salina



$V_{\text{final}} = 90.63 \text{ ml}$



Dilucions i recompte en
placa TSA (37 °C, 2 dies)

| | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| EXP1 | 2.3×10^3 | 442 | 42 | 7 | 0 |
| EXP2 | 2.9×10^3 | 398 | 37 | 10 | 1 |
| EXP3 | 1.9×10^3 | 389 | 52 | 5 | 1 |

Laboratori de Microbiologia



15.63 g carn + 75 ml solució salina = $V_{\text{final}} = 90.63 \text{ ml}$

| | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|-------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| EXP1 | 2.3×10^3 | 442 | 42 | 7 | 0 |
| EXP2 | 2.9×10^3 | 398 | 37 | 10 | 1 |
| EXP3 | 1.9×10^3 | 389 | 52 | 5 | 1 |



UFC/g

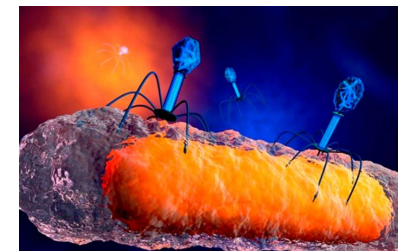
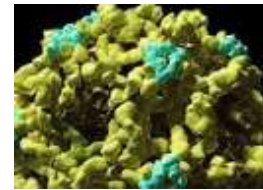
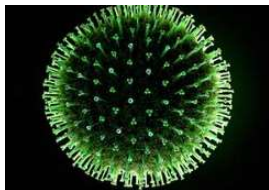
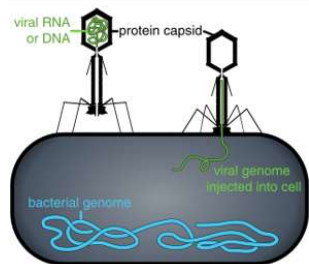


$$R \text{ (UFC/ml)} = \frac{1}{(15.6/90.63)} \times \frac{1}{10^{-5}} \times \frac{1}{0.2} \times [(42+37+52)/3]$$

$$1.27 \times 10^8 \text{ UFC/g}$$



■ SESSIÓ X. Titulació de BACTERIÒFAGS



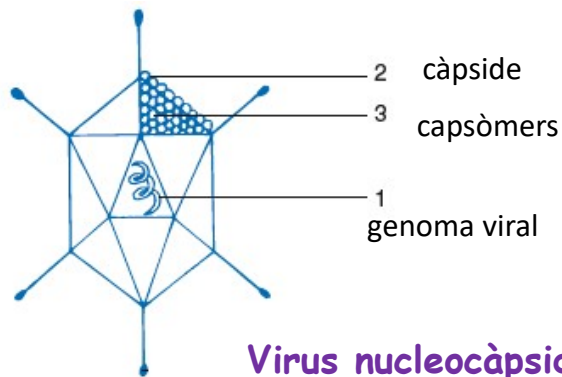


Què són els VIRUS?

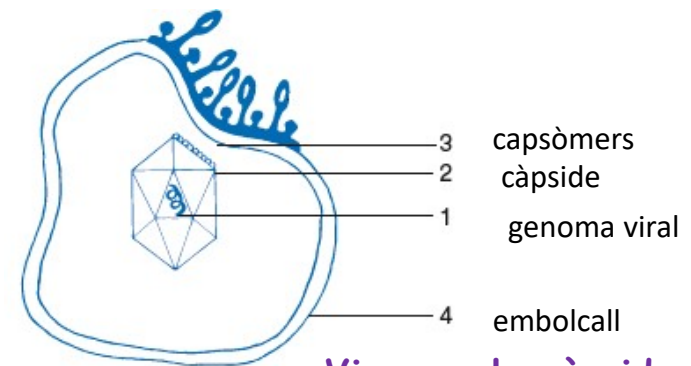
Els virus són partícules infeccioses, d'una mida entre 20 i 300 nm, constituïdes per un àcid nucleic, DNA o RNA, amb una organització estructural simple, que necessiten un hoste per a replicar-se i sobreviure.

VIRUS → 'Verí' en llatí

La part central del virus la constitueix el **genoma o nucleoide**, que es troba envoltat per una coberta proteica anomenada **càpside** (o **càpsida**). En alguns virus trobem una altra estructura més externa, l'**embolcall** → **virus embolcallats**. Quan no existeix embolcall, el virus s'anomena **virus nu**.



Virus nucleocàpside nu



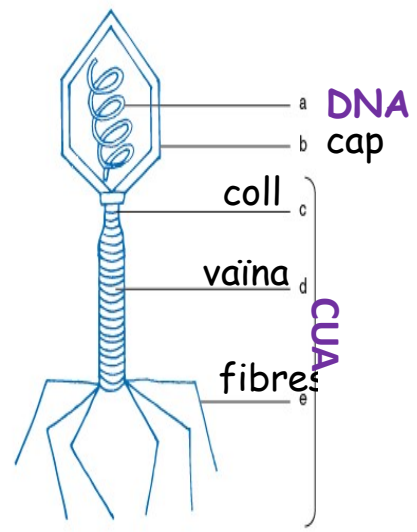
Virus nucleocàpside embolcallat





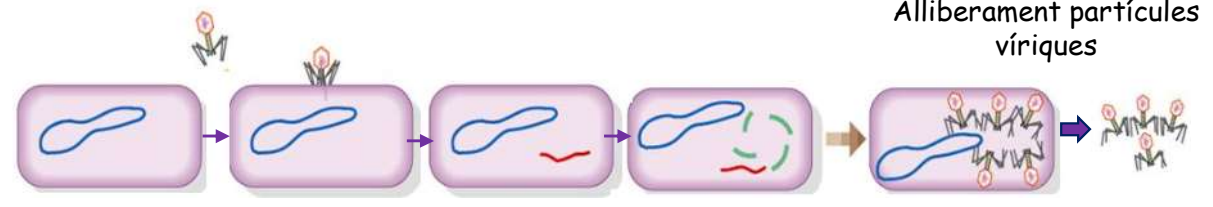
Què són els VIRUS?

Bacteriòfags: són virus que infecten els bacteris



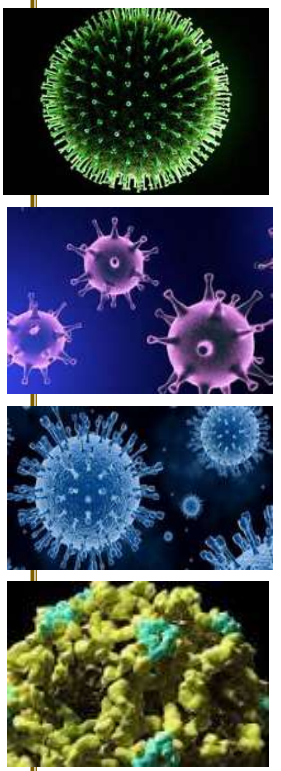
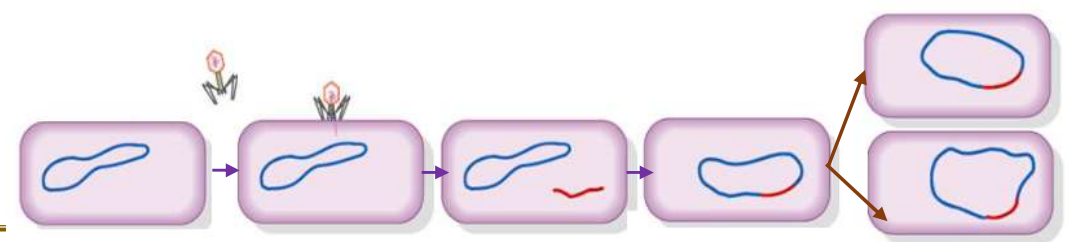
Cicle lític

El virus es multiplica a dintre de la cèl·lula bacteriana i culmina amb la lisi i mort cel·lular.



Cicle lisogènic

El virus es multiplica a dintre de la cèl·lula bacteriana i aquesta es manté viable.





Què són els BACTERIÒFAGS?

Al medi natural, un únic fag produeix 10^{24} infeccions bacterianes per segon.

10^{24}
infecciones efectivas



En 24 h el 40% del bacteris als oceans han sigut destruïts pels fags.

40%
Bacterias del oceano



Elevada **especificitat**

bacteriòfag-bacteri diana

[BACTERIÒFAG - **ESPECIE** BACTERIANA]

[BACTERIÒFAG - **SOCA** BACTERIANA]





Què són els VIRUS?

Current Protein & Peptide Science
Bentham Science Publishers
Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage
Zuzanna Drulis-Kawa, Grażyna Majkowska-Skrobek, [...], and Rob Lavigne

The intensive research on phage biology has led to increasing potential phage application in different aspects of human activity.

- (i) phage therapy proteins;
- (ii) phage typing;
- (iii) bacterial detection;
- (iv) disinfection of medical tools and devices;
- (v) food decontamination;
- (vi) drug delivery (vehicles).

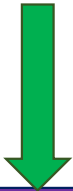


Horizon
2030

Inici s. XX

Investigació fags

Aplicació clínica



**TRACTAMENT ANTIBIÒTIC
INFECCIONS BACTERIANES**

s. XXI

**BATERIÒFAGS
Una alternativa
als antibiòtics?**



**Resultats
prometedors**

Descobriments
antibiòtics



**Resistència dels
bacteris als antibiòtics**

- Afavoreixen l'efecte dels probiòtics.
- Estudi d'aplicació en àmbit clínic, agropecuari, i alimentari



Utilització dels "bacteriòfags en clínica"



In addition, results obtained within Phagoburn allowed significant advancements regarding the regulatory framework of phage therapy.



Phagoburn was a European Research & Development (R&D) project funded by the European Commission under the 7th Framework Programme for Research and Development. The project was launched in June 2013 and ended in February 2017.



Commission Regulation on the use of Listex™ P100 against *Listeria* in ready-to-eat food products

REGULATION

Commission Regulation on the use of Listex™ P100 against *Listeria* in ready-to-eat food products

Clinical Protocol

Phagoburn clinical trial started in July 2015

This randomised and monitored phase I/II single-blind trial is being conducted in 11 major burns units in France, Switzerland and Belgium (sponsor: Pherecydes):

- Percy Military Hospital (France) - project coordinator,
- Reine Astrid Hospital in Brussels (Belgium),
- Vaudois CHU (Switzerland),
- Sainte-Anne Military Hospital in Toulon (France),
- Liège teaching hospital (CHU) (Belgium),
- Grand-Hôpital of Charleroi-Loverval (Belgium),
- St. Joseph/St. Luc Hospital in Lyon (France),
- Nantes CHU (France),
- Bordeaux CHU (France),
- Metz-Thionville regional hospital (France),
- Marseille Conception hospital (France).

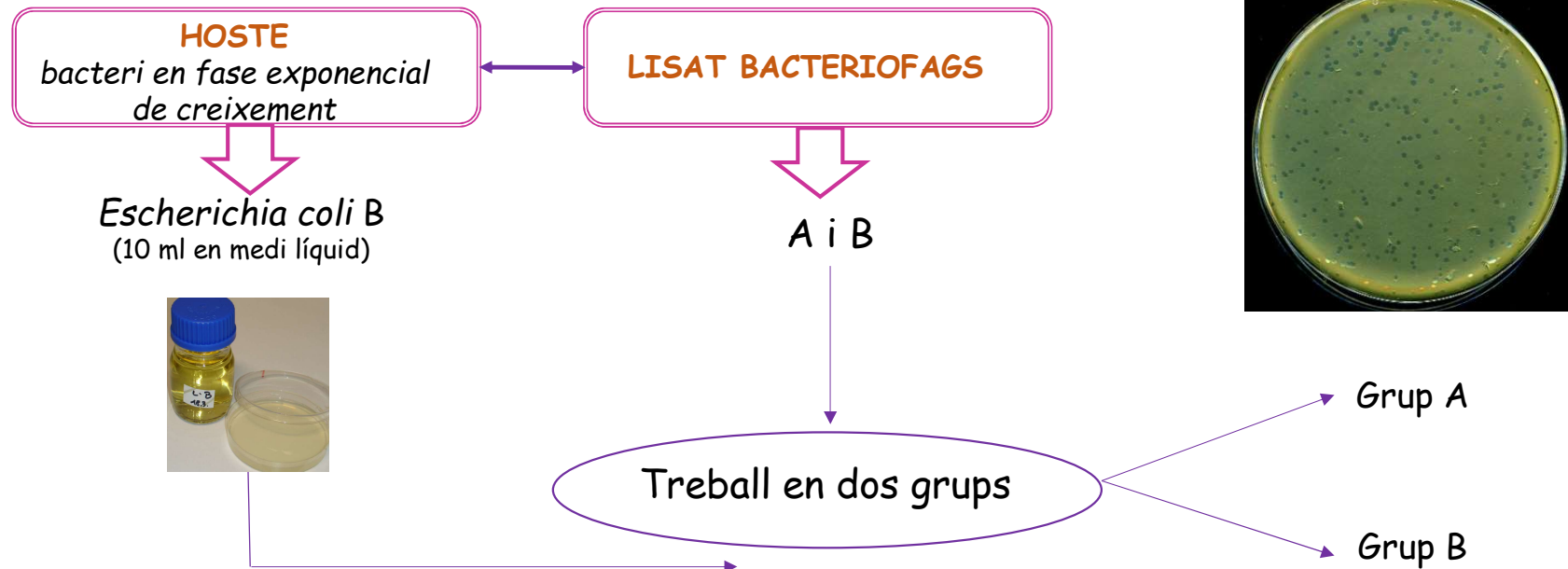
**Bèlgica, França,
Suïssa**

Este producto contiene el fago P100 en una concentración de 2×10^{11} UFP (Unidades Formadoras de Placas) por mililitro. El fago P100 es específico de bacterias del género *Listeria* y se aplica diluido, con una dosis de uso recomendada de 1×10^9 UFP por 100 gramos de alimento.



Recompte de VIRUS: clapes en placa

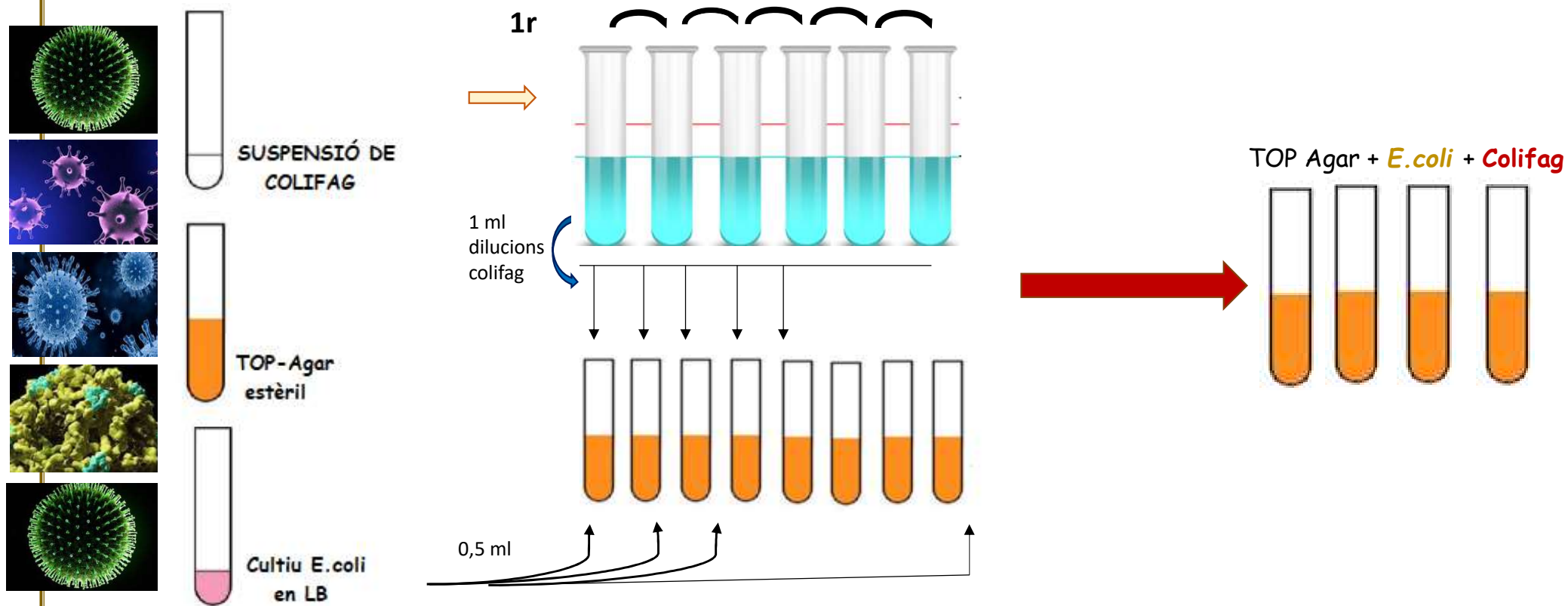
La **quantitat de virions** (*UFP*, *unitats formadores de 'placa' o clapa*) d'una suspensió de bacteriòfags pot determinar-se mitjançant un recompte en placa de les clapes que produeixen sobre un hoste adequat les diverses dilucions decimals del lisat (sobrenadant d'un cultiu de fags).





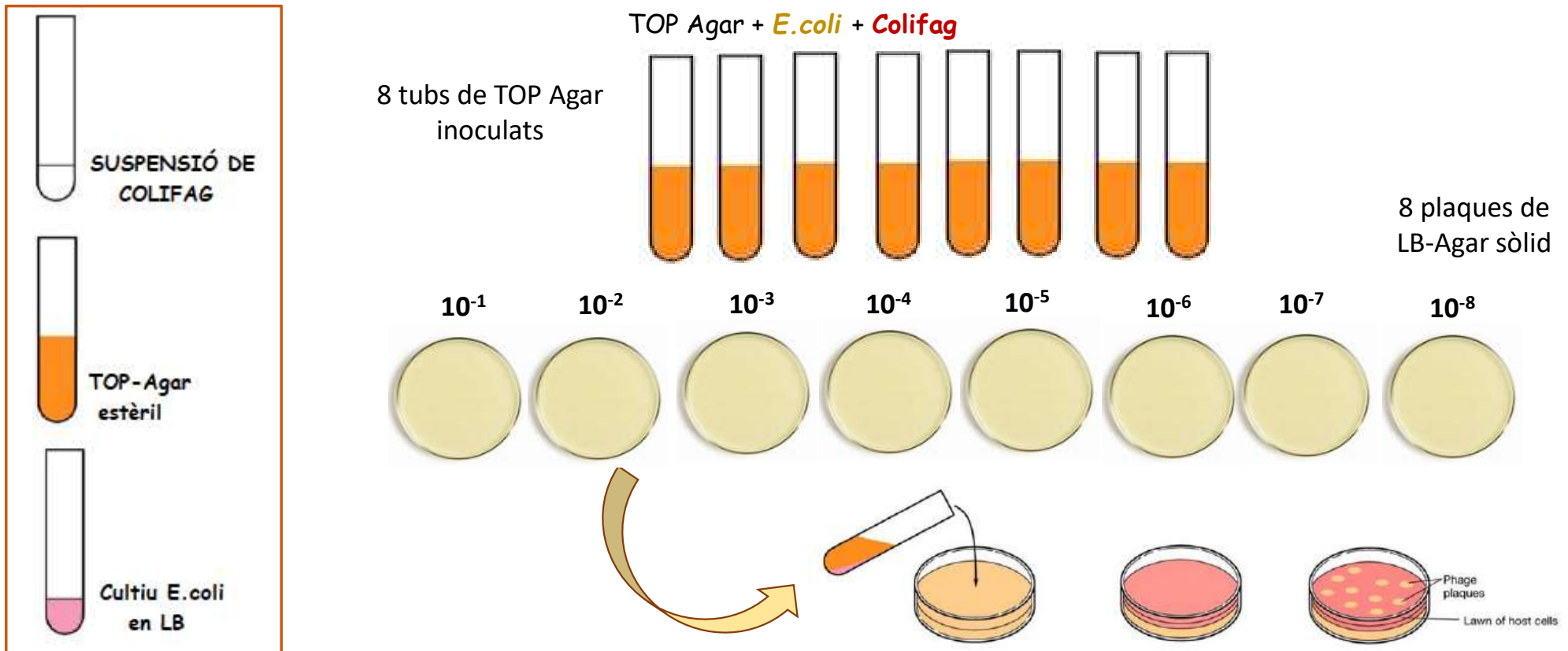
Recompte de VIRUS: clapes en placa

Dilucions decimals seriades 10^{-1} a 10^{-8}





Recompte de VIRUS: clapes en placa





RECOMPTES MICROBIANS – Titulació de bacteriòfags

Procediment

1. El primer estudiant pren **0,5 ml del tub d'Eppendorf que conté el lisat** del fag amb una pipeta automàtica proveïda de punta blau estèril. Obri en condicions asèptiques el primer tub de dilució (10^{-1}) i hi diposita els 0,5 ml.
2. S'**homogeneïtza** el contingut del tub de dilució en l'agitador.
3. A partir d'aquest tub, es transfereix 0,5 ml al següent per obtenir la dilució 10^{-2} , s'homogeneïtza i es repeteix el procés fins que totes les dilucions del lisat estiguen fetes. Cada estudiant del grup fa una dilució amb una nova pipeta.
4. Es pren **un tub de Top-agar fos** del bany i es portar al lloc de la bancada.
5. En condicions asèptiques, es prenen 0,5 ml de cultiu d'***E. coli B*** amb una pipeta estèril d'1 ml i se'ls introdueix al tub de Top-Agar fos.
6. Amb una pipeta estèril d'1 ml, es pren **1 ml de la dilució** que haja realitzat cada estudiant i s'**introdueix al tub de Top-Agar**, al costat de les cèl·lules d'*E coli B*.
7. S'**homogeneïtza el contingut del tub fent-lo rodar** breument entre els palmells de la mà i s'aboca immediatament a la placa que conté l'L-agar solidificat. L'agar fos ha de cobrir tota la superfície de l'L-agar.

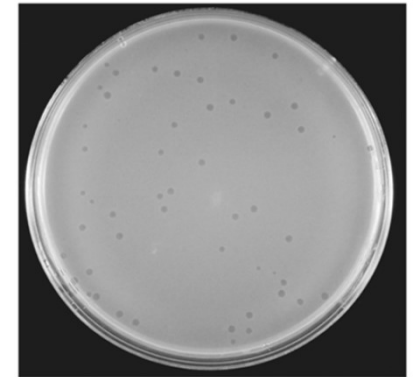




RECOMPTES MICROBIANS – Titulació de bacteriòfags

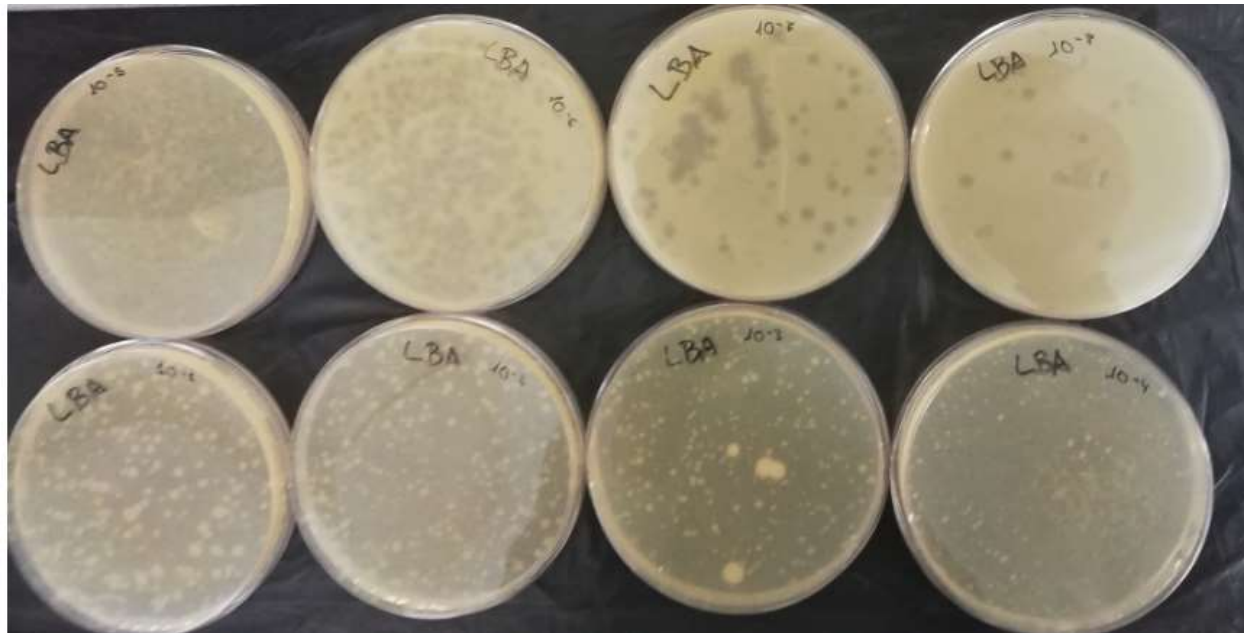
Procediment

8. Es deixa la placa en **repòs** a la bancada fins que se solidifique totalment.
9. S'inverteixen les plaques i es porten a incubació a **37 °C durant 24 hores** (48 h).
10. **Es retiren de l'estufa** i s'observen les plaques a la recerca de clapes a la gespa.
11. **Es compten les clapes** en aquella placa que en tinga un nombre adequat i es calcula el contingut en unitats formadores de clapes del lisat original.

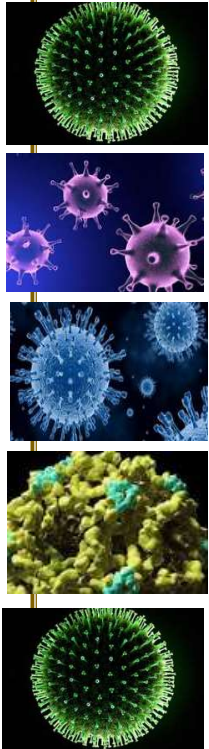




Recompte de VIRUS: clapes en placa

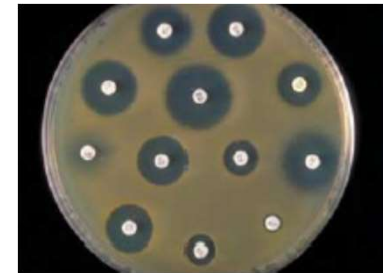
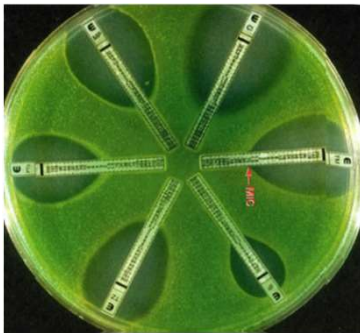


$$\text{Títol viral (UFP/ml)} = \frac{\text{Nre. plaques de lisi} \times \text{factor de dilució}}{\text{Volum inoculat}}$$





■ SESSIÓ XI. Antibiograma



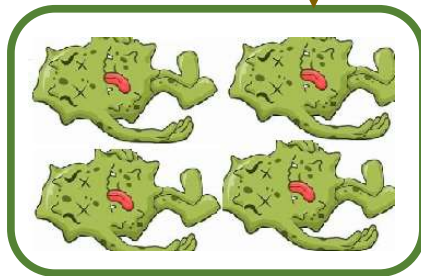


ANTIBIOGRAMA

L'ANTIBIOGRAMA o ESTUDI DE SENSIBILITAT defineix l'activitat *in vitro* d'un antibiòtic (o antimicrobià d'origen natural o sintètic) enfront d'un microorganisme determinat i reflecteix la seua capacitat per a inhibir el creixement d'un bacteri o població bacteriana.

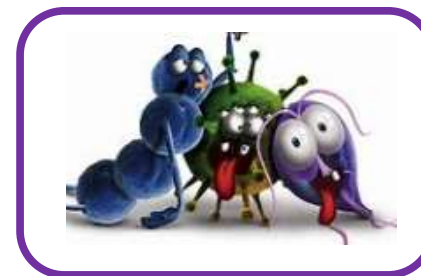
- L'antibiograma té com a objectiu avaluar en el laboratori la resposta d'un microorganisme a un o a diversos antimicrobians, i traduir, en una primera aproximació, el seu resultat com a factor predictiu de l'eficàcia clínica.

ANTIMICROBIÀ



Bactericida

Substàncies capaces
d'**INACTIVAR**
microorganismes



Bacteriostàtic

Substàncies que
inhibeixen el creixement
dels microorganismes
pel fet de detenir-ne o
alentir-ne el
metabolisme.

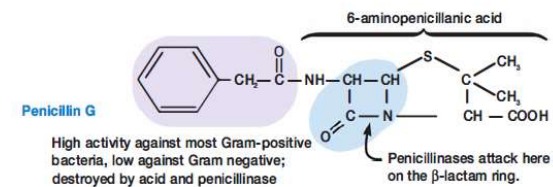


Mecanismes d'acció dels antibiòtics. Funció i estructura

Greater selective toxicity - higher therapeutic ratio

- ❑ **Inhibidors de la síntesi de paret cel·lular:** Els antibiòtics més efectius són els que interfereixen amb la síntesi de paret cel·lular

- ❖ penicil·lina
- ❖ cefalosporines
- ❖ vancomicina
- ❖ bacitracina



- ❑ **Inhibidors de síntesi proteica:** Amiloglucòsids (estreptomina, kanamicina, neomicina, tobramicina); tetraciclins, macròlids, cloramfenicol.

- ❑ **Antagonistes metabòlics:** sulfonamides, trimetoprim, isoniazida, dapsona

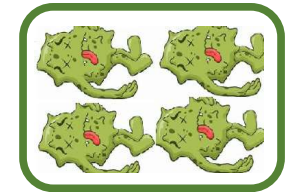
- ❑ **Inhibidors de la síntesi d'àcids nucleics:** Quinolones (àcid nalidíxic, ciprofloxacina, norfloxacina)





Avaluació de l'efectivitat d'un agent antimicrobià

- ❑ **Composició de la població microbiana**: presència de formes esporulades, estat de creixement, etc.
- ❑ **Concentració de l'agent antimicrobià**: efectivitat augmenta de manera exponencial fins a un punt.
- ❑ **Temps d'exposició**: com més llarg és el temps d'exposició, més efectivitat antimicrobiana.
- ❑ **Temperatura**: temperatures més elevades afavoreixen la penetració de la substància antimicrobiana.
- ❑ **Condicions ambientals**: factors que protegeixen o afecten negativament la resistència bacteriana.
- ❑ **Concentració bacteriana**: major concentració de bacteris requereix tractaments més intensos.



Bactericida



Bacteriostàtic





ANTIBIOGRAMA

Mètodes bàsics per a l'estudi de la sensibilitat

- Mètodes de difusió:
 - Mètode de l'antibiograma disc-placa
 - Mètode del test d'Epsilon (E-test)
- Mètodes de dilució

CMI

Mètodes especials per a l'estudi de la sensibilitat

- Concentració mínima bactericida:
 - Macrodilució en tub
 - Microdilució en placa
- Corba de letalitat o mort

CMB

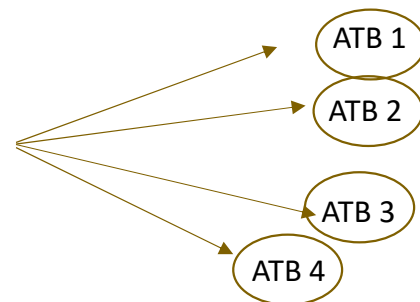




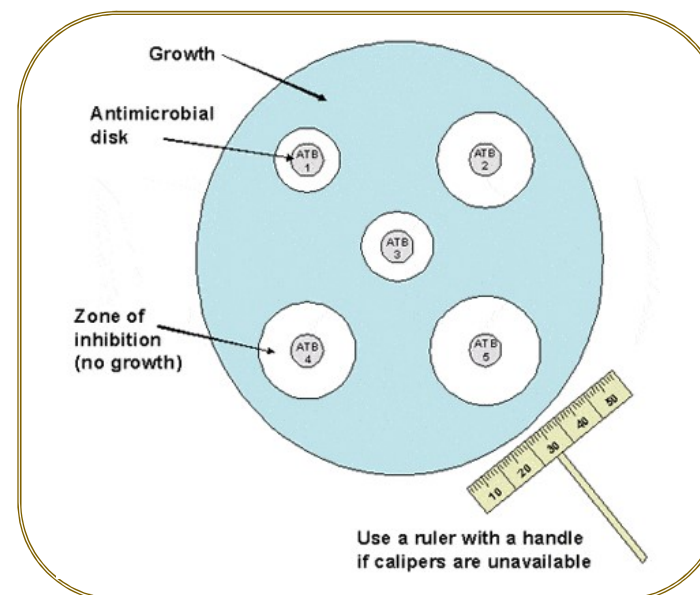
ANTIBIOGRAMA

Mètode de Kirby-Bauer

- Substàncies antimicrobianes



Manualment Automàticament



Muller-Hinton
Agar

Relació **CMI** versus diàmetre de l'halo observat en placa



Concentració **M**ínima **I**nhibidora



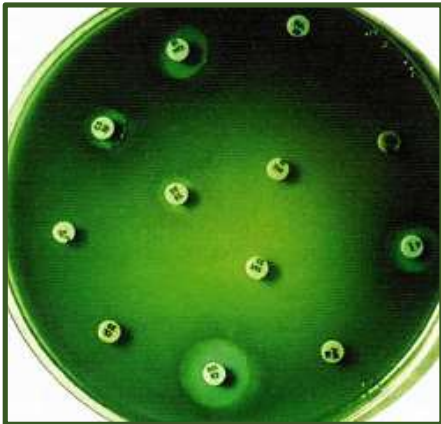
ANTIBIOGRAMA – Mètodes de difusió

Antibiograma – Mètode disc-placa



L'antibiograma disc-placa és un dels mètodes que el CLSI recomana per a la determinació de la sensibilitat bacteriana als antimicrobians.

La metodologia seria:



1. Es dipositar un **disc impregnat amb l'antimicrobià** sobre la superfície d'una placa Petri inoculada amb el microorganisme
2. El disc absorbeix l'aigua superficial i l'antimicrobià difon per l'agar.
3. L'antibiòtic **difon radialment** a través de la grossària de l'agar a partir del disc i es forma un gradient de concentració.
4. Transcorregudes 18-24 hores d'incubació, els **discos apareixen envoltats per una zona d'inhibició**.



ANTIBIOGRAMA – Mètodes de difusió

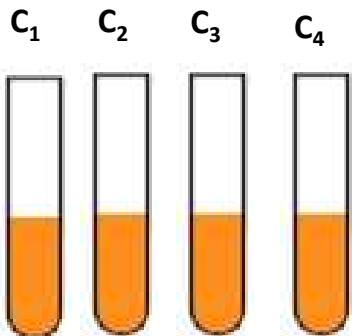
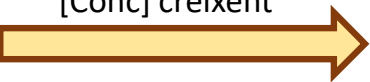
Antibiograma – Mètode disc-placa

Els mètodes disc-placa NO PERMETEN una lectura directa del valor de la CMI.



Com quantificar?

[Conc] creixent



Haver contrastat prèviament el sistema disc-placa amb un gran nombre de soques de CMI conegudes

Mètode de dilució

Recta de concordança
(recta de regressió
(CMI/diàmetre))

Valor diàmetre de la soca problema

CMI



ANTIBIOGRAMA

Mètode de Kirby-Bauer

[CMI] versus [halos d'inhibició, mm] (CLSI, EUCAST)

- Substàncies antimicrobianes



Microorganism
Resistant

Microorganism
Increased exposure

Microorganism
Susceptible

Exemples d'estàndards de diàmetre d'halo i CMI per enterobacteris (CLSI, 2014)

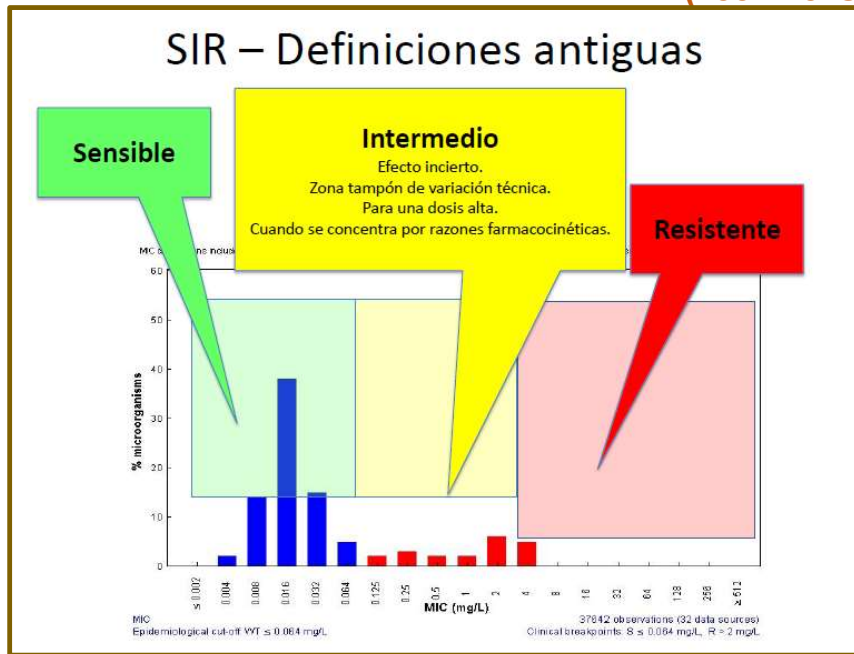
| Grup | Antibiòtic | Contingut del disc | Diàmetre del halo de inhibició (mm) | | | CMI (µg/mL) | | |
|---|----------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------|------|-------------|---------|---------|
| | | | S | I | R | S | I | R |
| Penicil.lines | | | | | | | | |
| | Amoxicil.lina | 10 µg | ≥ 17 | 14-16 | ≤ 13 | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 |
| | Ticarcil.lina | 75 µg | ≥ 20 | 15-19 | ≤ 14 | ≤ 16 | 32-64 | ≥ 128 |
| | Piperacil.lina | 100 µg | ≥ 21 | 18-20 | ≤ 17 | ≤ 16 | 32-64 | ≥ 128 |
| Combinacions de beta-lactames+inhibidors de beta-lactamases | | | | | | | | |
| | Amoxicil.lina-clavulànic | 20/10 µg | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 | ≤ 8/4 | 16/8 | ≥ 32/16 |
| | Piperacil.lina-tazobactama | 100/10 µg | ≥ 21 | 18-20 | ≤ 17 | ≤ 16/4 | 32-64/4 | ≥ 128/4 |



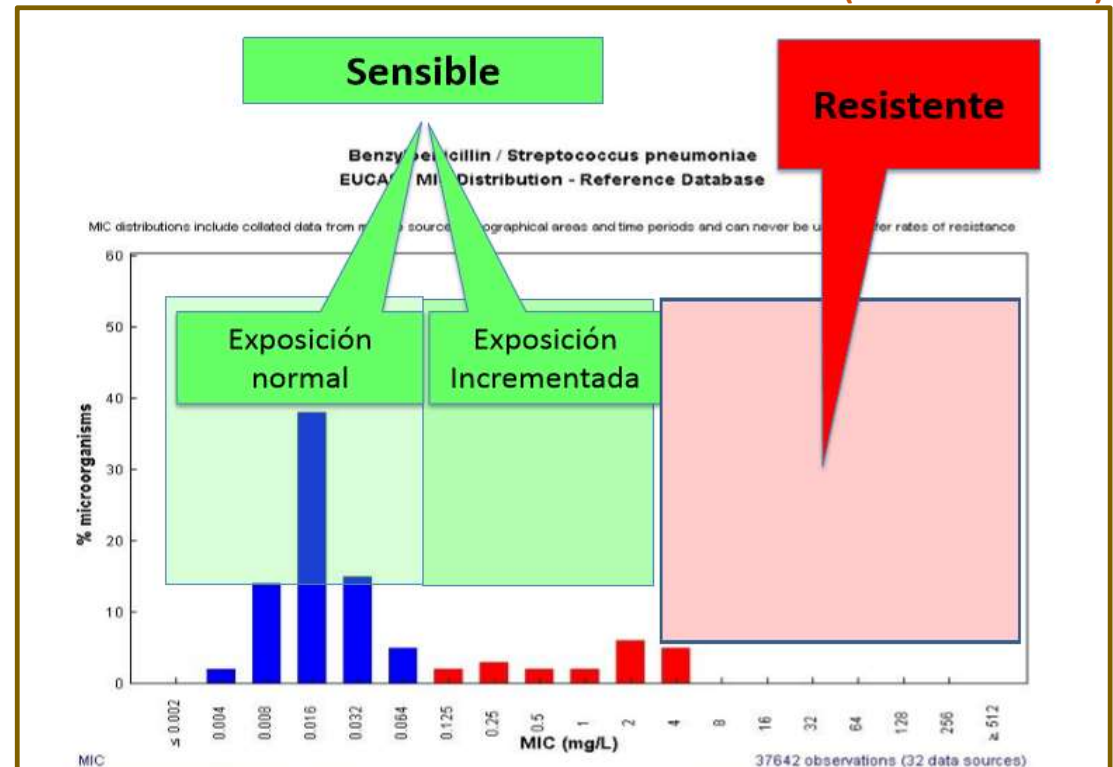
ANTIBIOGRAMA



(2002-2018)

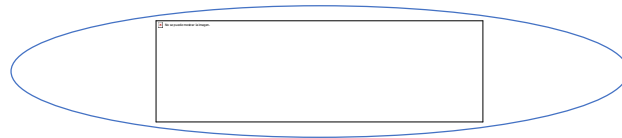


(2018-Actualitat)





27 DE FEBRER DE 2017 | GINEBRA - L'Organització Mundial de la Salut (OMS) publica la seua primera llista de «patògens prioritaris» resistents als antibiòtics, incloent-hi 12 famílies de bacteris estimats més perillosos per a la salut humana els pròxims anys.



Patògens prioritaris per la R&D de nous antibiòtics

Prioritat 1: CRÍTICA

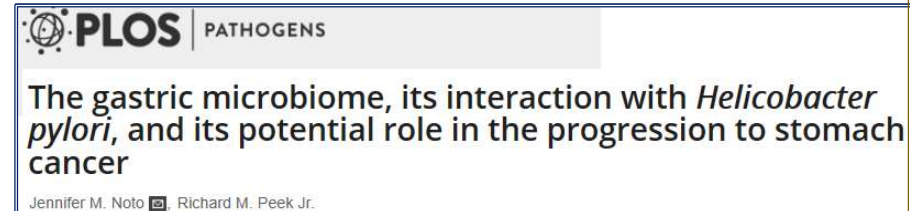
Acinetobacter baumannii
Pseudomonas aeruginosa
Enterobacteriaceae

Prioritat 2: ELEVADA

• *Enterococcus faecium*
• ***Staphylococcus aureus***
• ***Helicobacter pylori***
• *Campylobacter spp.*
• ***Salmonellae***
• *Neisseria gonorrhoeae*

Prioritat 3: MITJANA

• *Streptococcus pneumoniae*
• *Haemophilus influenzae*
• *Shigella spp.*



[World J Methodol.](#) 2015 Dec 26; 5(4): 203–211.

Published online 2015 Dec 26. doi: [10.5662/wjm.v5.i4.203](https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i4.203)

***Helicobacter pylori* and allergy: Update of research**

[Ilva Daugule](#), [Jelizaveta Zavoronkova](#), and [Daiga Santare](#)

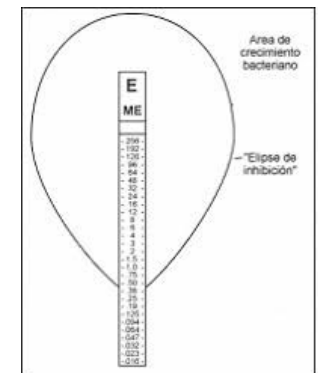


ANTIBIOGRAMA – Mètodes de difusió

Antibiograma – Mètode E-Test

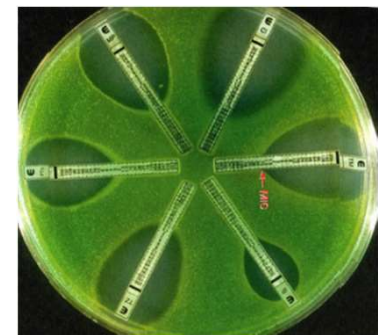
El principi d'aquest mètode és una expansió de la tècnica de difusió en disc. En el mètode E-test podem, mitjançant **lectura directa**, determinar la concentració inhibidora mínima (CMI).

Consisteix en una tira de plàstic no porós de 6 cm de llarg per 5 mm d'ample que incorpora un gradient predefinit d'antimicrobià equivalent a 15 dilucions.



El protocol és el mateix que el mètode de placa-disc.

Després de la incubació de les plaques, es pot observar una zona d'inhibició el·lipsoidal i simètrica. Després de la incubació la CMI serà el valor obtingut en el punt en el qual l'extrem d'inhibició fa **intersecció** amb la tira.



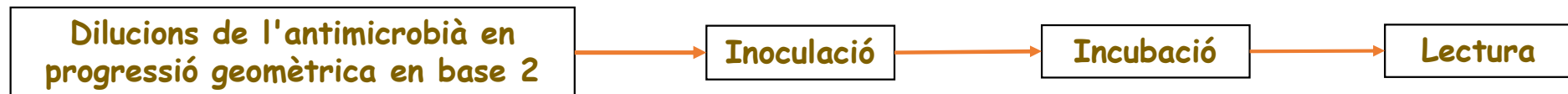


ANTIBIOGRAMA – Mètodes de dilució

Aquests mètodes es fonamenten en la determinació del creixement del microorganisme en presència de concentracions creixents de l'antimicrobià, que es troba diluït en el medi de cultiu (brou o agar).

- ❖ **Macrodilució.** Les primeres determinacions es van realitzar emprant bacteris de tubs amb brou de cultiu amb un interval determinat d'antimicrobià.
- ❖ **Microdilució.** S'usen micropipetes i plaques de microtitulació. Mètodes automatitzats.
- ❖ **Dilució en agar.** Cada placa, amb una certa concentració d'antimicrobià, permet inocular simultàniament un gran nombre de microorganismes. S'usen sistemes d'inoculació múltiple.

Tradicionalment aquests mètodes s'han emprat per a la determinació de la **CMI** i la concentració mínima bactericida (**CMB**) dels antimicrobians.



La **gran quantitat de variables** (dependents del microorganisme, del medi de cultiu, de l'inòcul) que influeixen en aquests mètodes són responsables d'oscil·lacions en el resultat finalment obtingut. Per això, per a avaluar-los correctament, cal realitzar-los de forma estandarditzada.



ANTIBIOGRAMA – Mètodes de dilució

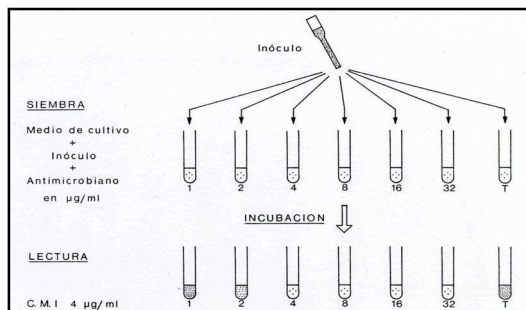
Dilució en brou

L'EUCAST recomana per a la majoria dels microorganismes utilitzar brou **Mueller-Hinton**, al qual s'afegiran els suplementes necessaris per a assegurar el creixement d'organismes exigits.

MÈTODE DE MACRODILUCIÓ

En el mètode de **macrodilució** s'empra per cada combinació microorganisme/antimicrobià una bateria de tubs.

ANTIBIOGRAMA: DILUCIÓ EN CALDO



MÈTODE DE MICRODILUCIÓ

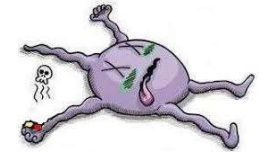
En el mètode de **microdilució** cadascun dels pouets de la placa de microtitulació amb pouets de fons en U representa un dels tubs del mètode de macrodilució.





ANTIBIOGRAMA – Mètodes especials

CONCENTRACIÓ MÍNIMA BACTERICIDA



El seu objectiu és determinar la menor concentració d'un antimicrobià que és capaç d'inactivar cèl·lules bacterianes.

Es parteix dels mateixos mètodes utilitzats per a obtenir la CMI per dilució en brou i les seues modificacions per a bacteris exigents. Es pot obtenir emprant el procediment de **macrodilució en tub**.

El que es pretén és comprovar en els tubs o pouets sense creixement quina concentració d'antimicrobians **ha reduït càrrega microbiana**, no sols inhibit, l'aïllat bacterià estudiat.

CULTIU EN
PLACA i
RECOMPTE

Es considera **CMB** la menor concentració d'antimicrobià que ha matat el **99,9% de l'inòcul original.**

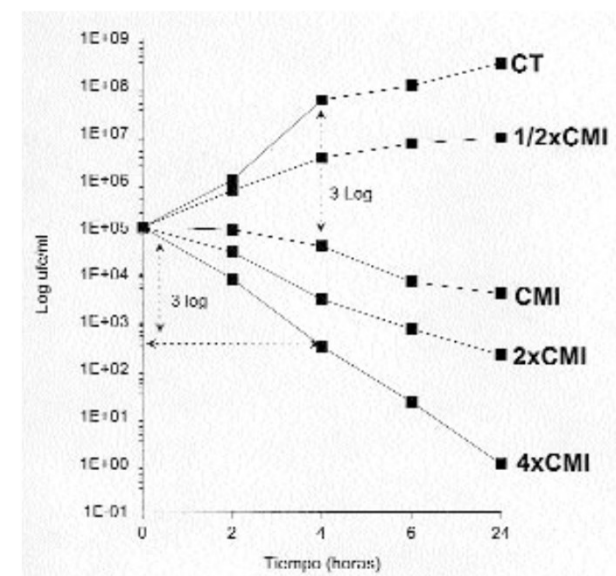
Reduïm 3 cicles \log_{10}



ANTIBIOGRAMA – Mètodes especials

Corba de letalitat o de mort

- ❑ És un mètode cinètic de **determinació del poder bactericida**. Es valora la capacitat de matar en relació amb el temps i amb diferents concentracions fixes d'antimicrobià.
En aquest sentit és complementari de la CMB.
- ❑ Proporcionen una informació important sobre la dinàmica de l'acció bactericida d'un antimicrobià i sobre la relació entre la concentració d'antimicrobià i la seua activitat microbicida.
- ❑ El poder bactericida es determina en la caiguda de **3 logaritmes decimals** (99,9%) en un temps determinat. És imprescindible el càlcul de la CMI preferentment pel mètode de dilució en brou.
- ❑ S'utilitza fonamentalment en investigació de nous antimicrobians o patògens emergents.





ANTIBIOGRAMA – Combinació d'antimicrobians

Una de les estratègies emprades per a combatre l'alarmant fenomen de la resistència i multiresistència als antibiòtics comprèn la **combinació d'antibiòtics tradicionals amb nous compostos antimicrobians (naturals i sostenibles - p.ex. procedents d'algues)**

L'efecte de la combinació entre agents antimicrobians pot ser:

- Indiferència:** l'activitat dels dos antimicrobians no difereix de l'activitat del més efectiu en solitari.
- Addició:** l'activitat dels dos antimicrobians és aproximadament la suma de les activitats dels dos antimicrobians separats.
- Sinergisme:** l'activitat dels dos antimicrobians és significativament major que l'addició de les activitats dels dos antimicrobians separats.
- Antagonisme:** l'activitat dels dos antimicrobians junts és significativament menor que la suma de les activitats dels dos antimicrobians separats.

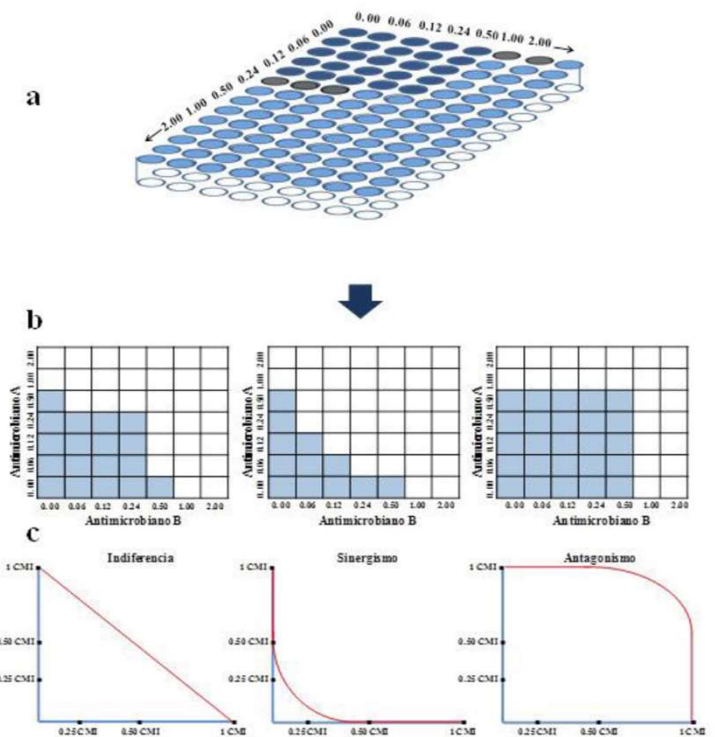
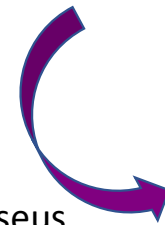


ANTIBIOGRAMA – Combinació d 'antimicrobians

El **propòsit** d'estudiar les combinacions d'antimicrobians és determinar si existeix sinergisme, la qual cosa permetria potenciar la seua aplicació per a contrarestar el desenvolupament de resistència en els microorganismes.

Una de les proves més utilitzades *in vitro* per a estudiar el comportament de sistemes binaris d'agents antimicrobians és la **titulació de tauler d'escacs**.

L'assaig es realitza en plaques de microtitulació en què en els seus pouets s'introdueixen el cultiu d'estudi, siga la soca indicadora o microorganisme a determinar susceptibilitat a una determinada concentració ($\sim 10^4$ UFC/ml), a més de les dilucions dels antimicrobians en estudi (A i B), i s'incuba la placa a les condicions de temperatura i temps òptimes de creixement.





ANTIBIOGRAMA

Procediment

En la pràctica es determinarà el patró de resistència/sensibilitat de diferents bacteris enfront de diversos antimicrobians.

| | | |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1. <i>E. coli</i> | 4. <i>Klebsiella</i> | 7. <i>Micrococcus</i> |
| 2. <i>Salmonella sp.</i> | 5. <i>Pseudomonas</i> | 8. <i>Bacillus sp.</i> |
| 3. <i>Proteus</i> | 6. <i>S. aureus</i> | |

| | | |
|------------------|--------------------|-----------------|
| 1. Àcid oxolínic | 4. Amoxicil·lina | 7. Clindamicina |
| 2. Polimixina B | 5. Nitrofurantoina | 8. Ceftazidima |
| 3. Novobiocina | 6. Kanamicina | 9. AMC |

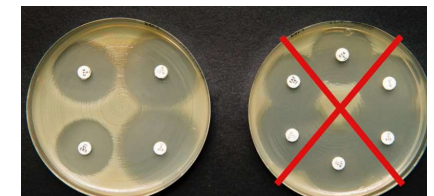
1. Utilitza un **cultiu jove del bacteri problema** que estiga creixent en medi líquid o una suspensió en sèrum salí a partir del creixement en medi sòlid: s'inocula amb diverses gotes (~ 0,4 ml) la superfície d'una placa d'agar Mueller-Hinton utilitzant una pipeta Pasteur estèril.
2. Reparteix l'inòcul per tota la superfície de manera uniforme amb un escovilló estèril prèviament amarat amb la suspensió del bacteri, escombrant tota la superfície en diverses direccions.
3. Deixa assecar la placa fins que l'agar haja absorbit tota la humitat.



ANTIBIOGRAMA

Procediment

4. Diposita en la **superfície de la placa els discos**, traient-los amb cura dels seus cartutxos amb una pinça metàl·lica plana prèviament flamejada amb alcohol. Procura que els diferents discos estiguen equidistants i queden fixos en la superfície de l'agar.
5. Inverteix totes les plaques de cada bacteri i porta-les juntes a l'estufa. Incuba-les ~ 18 h a la temperatura òptima del bacteri.
6. Mesura els halos d'inhibició amb un regle en mil·límetres i compara els resultats amb una taula com la que s'ofereix en la pàgina anterior. Anota si el bacteri és sensible, intermedi o resistent als antimicrobians utilitzats. Anota també qualsevol incidència, com puga ser l'aparició de colònies dins de l'halo d'inhibició d'algun dels compostos assajats.





EUCAST - EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING

1. La **kanamicina A**, antibiòtic del grup dels aminoglucòsids.
2. L'**estreptomicina**, antibiòtic del grup dels aminoglucòsids.
3. La **polimixina B (PB)**, equivalent a colistina (bactericida enfront dels gramnegatius).
4. L'**amoxicil·lina (AML)** és un antibiòtic del grup de les penicil·lines..
5. L'**imipenem (IPM)** és un antibiòtic beta-lactàmic. Primer membre de la família dels antibiòtics carbapenem.
6. La combinació **ampicil·lina/sulbactam (SAM)** està conformada per l'antibiòtic ampicil·lina, derivat de la penicil·lina, i sulbactam, un inhibidor de l'enzim bacterià beta-lactamasa.
7. **Ciprofloxacina**, fluoroquinolones
8. La **nitrofurantoïna (F)** "*miscellaneous agents*"

Laboratori de Microbiologia



La **kanamicina A**, antibiòtic del grup dels aminoglucòsids, d'ampli espectre, bactericida actiu enfront de bacteris grampositius, gramnegatius i *Mycobacterium*, efectiu contra diverses infeccions. A causa de la seua freqüent toxicitat, l'ús de la kanamicina s'ha limitat a l'ús tòpic i oral.

✓ **Inhibidor de la síntesi proteica**

L'**amoxicil·lina (AML)** és un antibiòtic del grup de les penicil·lines. Representa actualment al nostre país el 50% dels antibiòtics emprats. L'amoxicil·lina impedeix la **formació de la paret cel·lular dels bacteris** i n'afavoreix, per tant, la destrucció. És efectiva contra un ampli espectre de bacteris.

La **nitrofurantoina (F)** altera els ribosomes i altres molècules bacterianes. Interfereix en **diverses rutes enzimàtiques vinculades a respiració cel·lular, metabolisme glucídic, síntesi proteica, ADN, ARN, i paret bacteriana**.

Tractament de malalties del tracte urinari.

La **polimixina B (PB)** posseeix acció bactericida contra quasi tots els bacils Gram (-), a excepció de *Proteus*. Les polimixines augmenten la **permeabilitat de la membrana de la cèl·lula bacteriana**. Tots els bacteris Gram (+), fongs i cocs Gram (-) posseeixen resistència al sulfat de polimixina B.

Tractament d'infeccions dèrmiques.

Produït per *Bacillus polymyxa*.

Laboratori de Microbiologia



L'**imipenem**, antibiòtic beta-lactàmic. És principalment bactericida. Inhibeix la tercera i última etapa de la síntesi de la paret cel·lular bacteriana.

L'**estreptomicina** (S) és antibiòtic aminoglucòsid; bactericida d'espectre limitat.

Profilaxi d'endocarditis bacteriana i tuberculosi.

L'**ampicil·lina/sulbactam (SAM)**, tractament d'infeccions causades per bacteris resistents als antibiòtics beta-lactàmics.

Ciprofloxacina (CIP), grup fluoroquinolones.

Paralitza la replicació bacterial de l'ADN quan s'uneix amb un enzim anomenat DNA-girasa.



Notes

Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.

Lettered notes relate to the disk diffusion method.

1. Enterococci are intrinsically resistant to aminoglycosides and aminoglycoside monotherapy is ineffective. There is likely to be synergy between aminoglycosides and penicillins or glycopeptides against enterococci without acquired high-level aminoglycoside resistance. All testing is therefore to distinguish between intrinsic and high-level acquired resistance.

2/A. Gentamicin can be used to screen for high-level aminoglycoside resistance (HLAR).

Negative test: Isolates with gentamicin MIC ≤ 128 mg/L or a zone diameter ≥ 8 mm. The isolate is wild type for gentamicin and low-level intrinsic resistant. For other aminoglycosides, this may not be the case. Synergy with penicillins or glycopeptides can be expected if the isolate is susceptible to the penicillin or glycopeptide.

Positive test: Isolates with gentamicin MIC > 128 mg/L or a zone diameter < 8 mm. The isolate is high-level resistant to gentamicin and other aminoglycosides, except **streptomycin** which must be tested separately if required (see note 3/B). There will be no synergy with penicillins or glycopeptides.

3/B. Isolates with high-level gentamicin resistance may not be high-level resistant to **streptomycin**.

Negative test: Isolates with **streptomycin** MIC ≤ 512 mg/L or a zone diameter ≥ 14 mm. The isolate is wild type for **streptomycin** and low-level intrinsic resistant. Synergy with penicillins or glycopeptides can be expected if the isolate is susceptible to the penicillin or glycopeptide.

Positive test: Isolates with **streptomycin** MIC > 512 mg/L or a zone diameter < 14 mm. The isolate is high-level resistant to **streptomycin**. There will be no synergy with penicillins or glycopeptides.

Streptomycin: Diàmetre > 14 mm sensible / MIC < 512 mg/L

Streptomycin: Diàmetre < 14 mm resistant / MIC > 512 mg/L

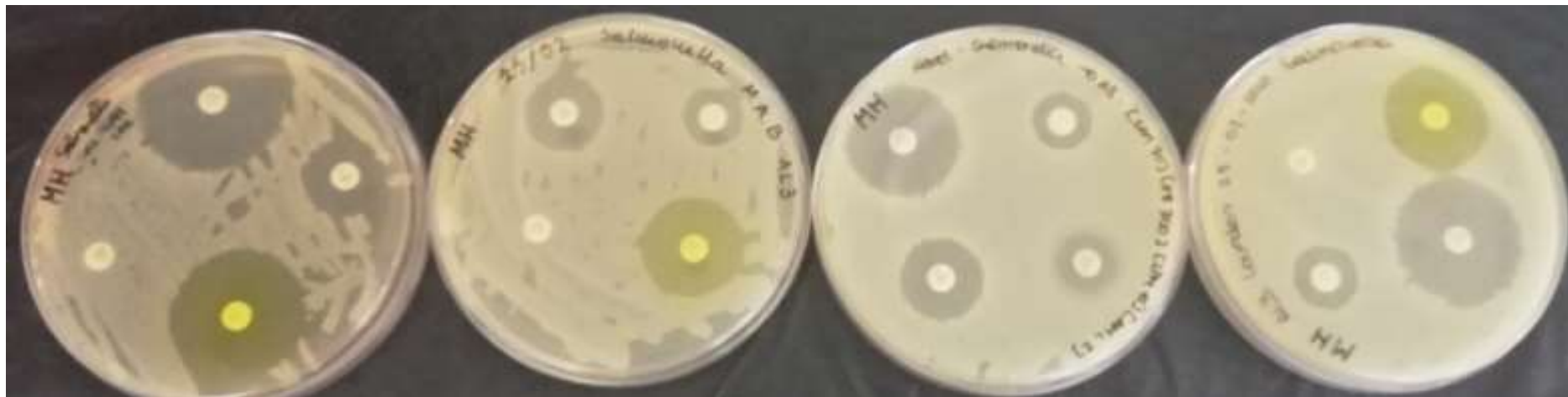


Interpretive Criteria/Categories and Quality Control Strains. There is no consensus between the two professional organizations establishing breakpoints for polymyxins, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (82) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (83) (Table 1), although attempts have recently been made to coordinate these. Neither CLSI nor EUCAST has recommended the disk diffusion (DD) method for polymyxin susceptibility testing, so there are currently no established zone diameter breakpoints for colistin or polymyxin B (82–84). Furthermore, MIC breakpoints for colistin and polymyxin B are available in CLSI guidelines for *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. but not for the *Enterobacteriaceae*, and also, no interpretative breakpoint for polymyxin B has been established by EUCAST guidelines (82, 83). CLSI has established a MIC epidemiological cutoff value (ECV) for colistin applicable to five members of the *Enterobacteriaceae*, including *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* (formerly *Enterobacter aerogenes*),





Salmonella sp.



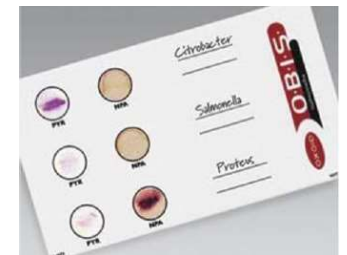
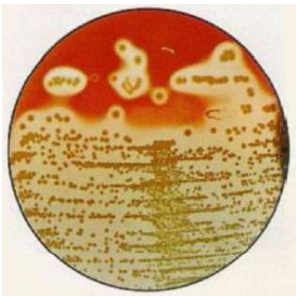


Pseudomonas sp.





■ SESSIÓ XII. Enzims hidrolítics extracel·lulars



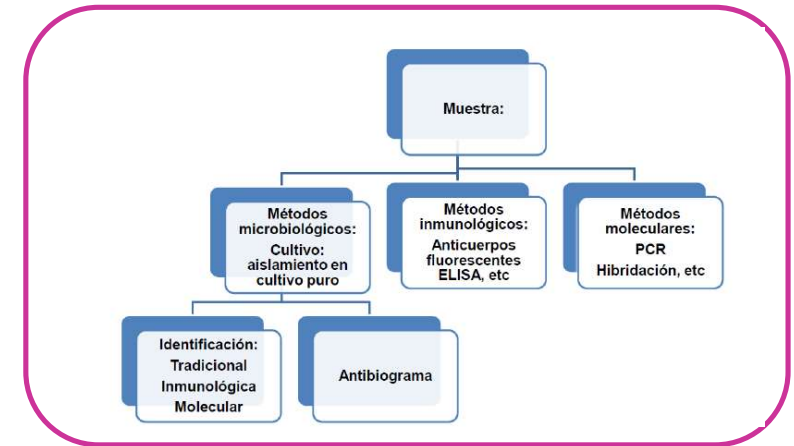


MÈTODES D'IDENTIFICACIÓ MICROBIANA



Una de la **tasques fonamentals** del laboratori de microbiologia és l'aplicació d'una metodologia precisa que permeta la **identificació dels microorganismes**.

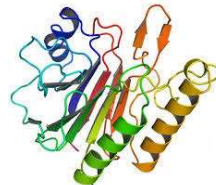
Amb l'objectiu **d'identificar l'agent etiològic responsable del procés infecciós** i per a conèixer les implicacions patogèniques/patològiques, l'evolució clínica, i per a aplicar una teràpia antimicrobiana eficaç, un pilar fonamental en la pràctica de la microbiologia clínica el constitueix l'assignació d'espècie a un aïllament microbià.



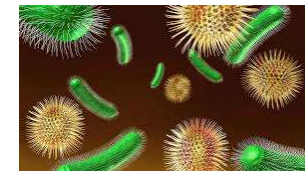
MÈTODES MOLECULARS



MÈTODES PROTEÒMICS



MÈTODES FENOTÍPICS

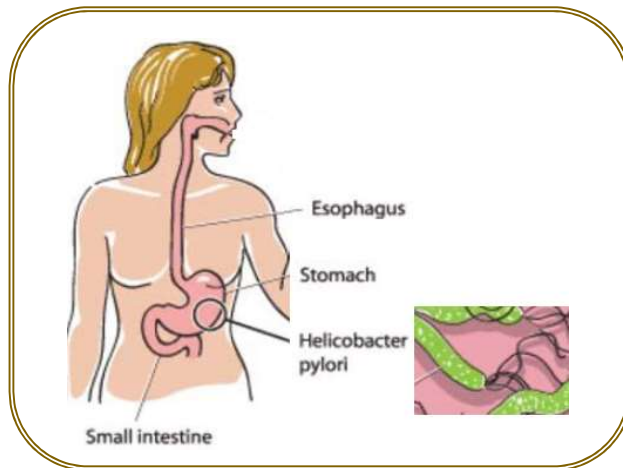




MOSTRES CLÍNiques, ALIMENTÀRIES O AMBIENTALS

Barreja complexa de microorganismes

Individu malalt



Productes o matrius
altament contaminats

- ✓ Mètodes alta especificitat
 - ✓ Simple
 - ✓ Ràpid
 - ✓ Econòmic

1. *Obtenir mostres representatives de la mostra a analitzar*
2. *Mostres en quantitat adequada*
3. *Processament d'obtenció i anàlisi en condicions asèptiques*
4. *Diagnòstic abans d'iniciar un tractament*



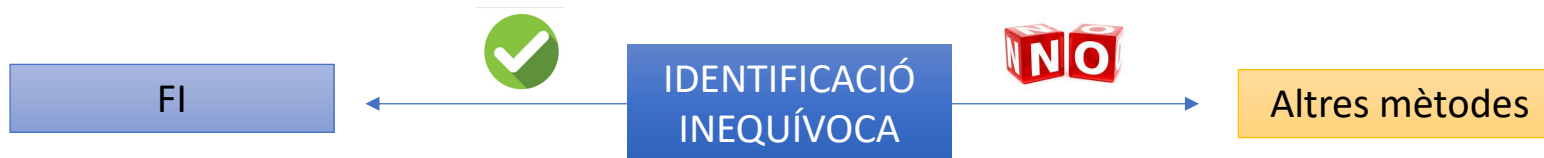
**Identificació
microbiana**



ACTIVITATS MICROBIANES

Mètodes fenotípics

Actualment, la identificació bacteriana es realitza principalment per mitjà de **mètodes convencionals**. La identificació fenotípica bacteriana es basa fonamentalment en la **comparació de les característiques fenotípiques** de bacteris desconeguts amb aquelles de **CULTIUS TIPUS**. La fiabilitat de la identificació està en proporció directa al nombre de característiques similars.



Esquema Identificació Fenotípica

- Morfologia
- Desenvolupament
- Propietats bioquímiques i metabòliques



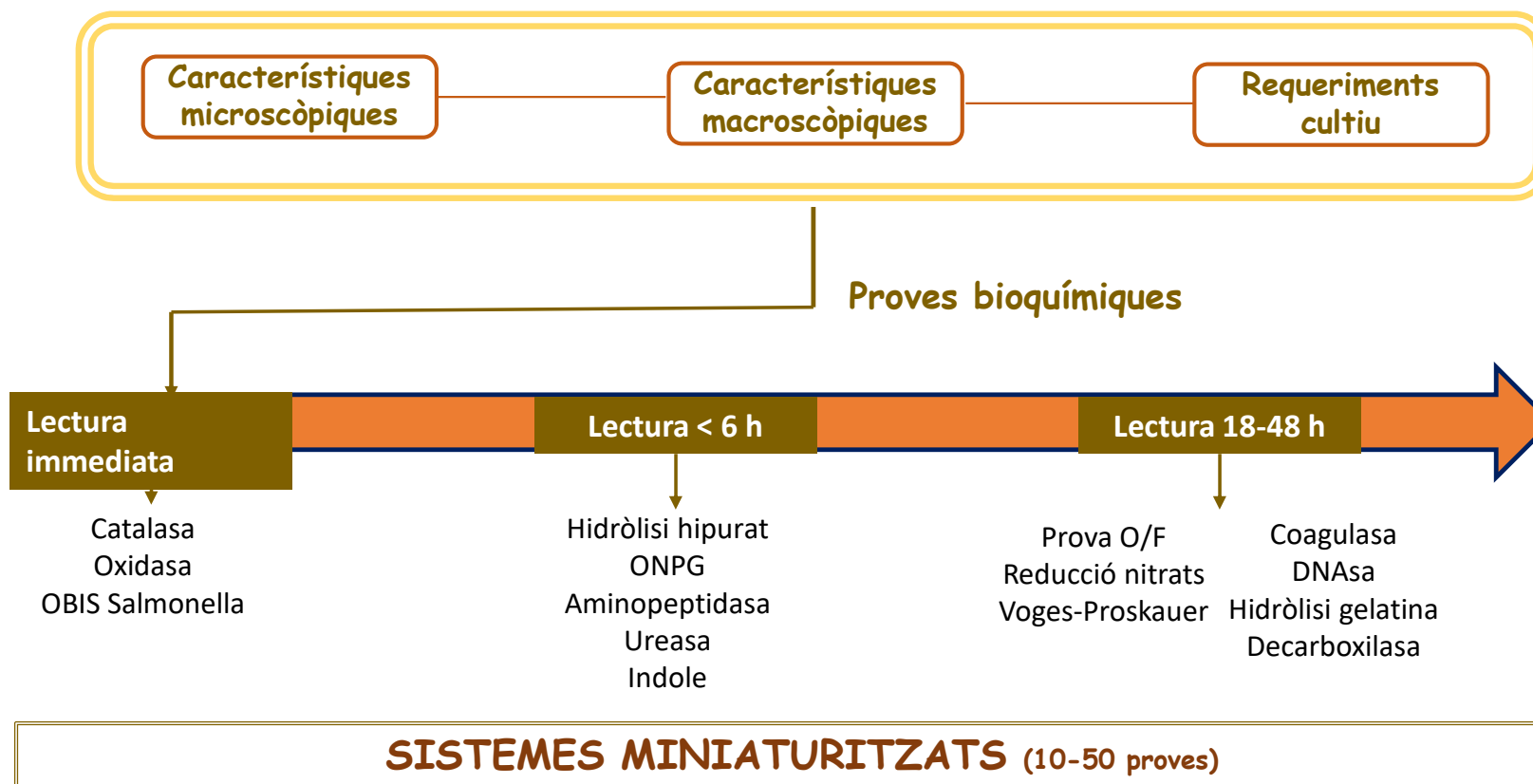
L'experiència del microbiòleg és fonamental per a l'elecció d'una prova o una bateria de proves de manera seqüencial, en funció de la fiabilitat d'aquestes, del gènere o de l'espècie bacteriana que es pretén identificar i de l'origen de l'aïllat bacterià.



Mètodes fenotípics

PROVES
PRIMÀRIES

PROVES SEGON NIVELL
(gènere i espècie)





ACTIVITATS MICROBIANES

IDENTIFICACIÓ - Mètodes fenotípics

❑ ACTIVITATS HIDROLÍTIQUES EXTRACEL·LULARS

Bacteris i fongs són incapaços de realitzar processos d'endocitosi, cosa que impedeix que puguen ingerir partícules alimentàries o aprofitar macromolècules en suspensió en el medi extern directament com a fonts de nutrients.

Macromolècules

Proteïnes

- Gelatina
- Caseïna

Polisacàrids

- Midó
- Cel·lulasa
- Alginat
- Quitina
- Pectina
- Agar

Hidrolases

Proteases

- Gelatinasa
- Caseïnasa

Polisacàrids

- Amilasa
- Cel·lulasa
- Alginasa
- Quitinasa
- Pectinasa
- Agarasa

Macromolècules

Lípids

- Tween 20
- Tween 40, 60, 80
- Lecitina
- Eritròcits

Àcids nucleics

- DNA
- RNA

Lipases/fosfolipases

- Lecitinasa
- Hemolisina (fosfolipasa)

Nucleases

- DNAsa
- RNAsa

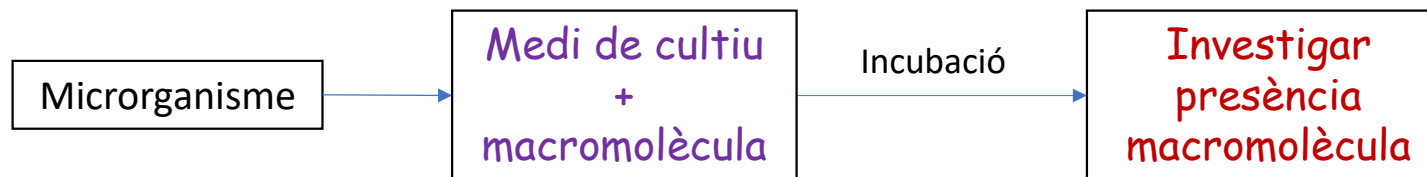


ACTIVITATS MICROBIANES- Activitat enzimàtica extracel·lular

Bacteris i fongs són incapaços de realitzar processos d'endocitosi, cosa que impedeix que puguen ingerir partícules alimentàries o aprofitar macromolècules en suspensió en el medi extern directament com a fonts de nutrients.



Aquests microorganismes són capaços de produir i excretar al medi enzims amb capacitat per hidrolitzar extracel·lularment diversos tipus de macromolècules, i així produeixen molècules més menudes (monòmers, dímers, oligòmers) que seran posteriorment incorporades per transport actiu al citoplasma.



Mol Microbiol. 2002 Aug;45(4):1095-106.

Listeria monocytogenes bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis.

Dussurget O¹, Cabanes D, Dehoux P, Lecuit M, Buchrieser C, Glaser P, Cossart P.



Clinical Microbiology
Reviews®

Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants

José A. Vázquez-Boland,^{1,2,*} Michael Kuhn,³ Patrick Berche,⁴ Trinad Chakraborty,⁵ Gustavo Domínguez-Bernal,¹ Werner Goebel,³ Bruno González-Zorn,¹ Jürgen Wehland,⁶ and Jürgen Kreft³



Activitat hemolítica



ACTIVITATS MICROBIANES- Activitats enzimàtiques extracel·lulars

Mycoses. 2005 Nov;48(6):365-77.

Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*.

Schaller M¹, Borelli C, Korting HC, Hube B.

Abstract

Candida albicans is a facultative pathogenic micro-organism that has developed several virulence traits enabling invasion of host tissues and avoidance of host defence mechanisms. Virulence factors that contribute to this process are the hydrolytic enzymes. Most of them are extracellularly secreted by the fungus. The most discussed hydrolytic enzymes produced by *C. albicans* are secreted aspartic proteinases (Saps). The role of these Saps for *C. albicans* infections was carefully evaluated in numerous studies, whereas only little is known about the physiological role of the secreted phospholipases (PL) and almost nothing about the involvement of lipases (Lip) in virulence. They may play an important role in the pathogenicity of candidosis and their hydrolytic activity probably has a number of possible functions in addition to the simple role of digesting molecules for nutrition. Saps as the best-studied member of this group of hydrolytic enzymes contribute to host tissue invasion by digesting or destroying cell membranes and by degrading host surface molecules. There is also some evidence that hydrolytic enzymes are able to attack cells and molecules of the host immune system to avoid or resist antimicrobial activity. High hydrolytic activity with broad substrate specificity has been found in several *Candida* species, most notably in *C. albicans*. This activity is attributed to multigene families with at least 10 members for Saps and Lips and several members for PL B. Distinct members of these gene families are differentially regulated in various *Candida* infections. In future, prevention and control of *Candida* infections might be achieved by pharmacological or immunological tools specifically modulated to inhibit virulence factors, e.g. the family of Saps.



ACTIVITATS MICROBIANES - Activitats enzimàtiques extracel·lulars

Carbohidrasas microbianas & salud intestinal

El género *Bacillus* dispone de diversos mecanismos de acción responsables de su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, como puede ser la producción de ciertas sustancias antimicrobianas. Sin embargo la producción de enzimas digestivos por parte de este tipo de bacterias también tiene su relevancia en la promoción de la salud intestinal del animal hospedador.

Recientemente, Blanch y Rouault (2016) indicaron que la acción de determinadas cepas de Bacillus subtilis y Bacillus licheniformis ha demostrado liberar ingentes cantidades de monosacáridos cuando dichas cepas son aplicadas in vitro sobre diversas materias primas, utilizadas habitualmente en la producción de piensos compuestos.

En dichos estudios, se observó que la liberación de monosacáridos era superior en aquellos ingredientes ricos en fibra. Estas observaciones sugieren que de la acción enzimática de estas bacterias intestinales se derivará una mayor presencia de monosacáridos en la luz intestinal, lo cual cobra especial importancia en los primeros estadios de la vida de los animales.



ACTIVITATS MICROBIANES- Activitat enzimàtica extracel·lular

OBJECTIU: S'assajaran en aquesta pràctica 4 activitats hidrolítiques diferents: la hidròlisi de midó, caseïna, Tween-80, del DNA.

MEDIS DE CULTIU:

- AGAR CASEÏNA:** La presència de caseïna confereix al medi un aspecte opac que desapareix quan la caseïna ha estat hidrolitzada. Al voltant dels microorganismes proteolítics sobre caseïna ha d'aparèixer al medi un halo transparent. Els no proteolítics no produeixen canvi en l'aspecte original del medi.
- AGAR TWEEN-80:** El medi conté un lípid sintètic que presenta enllaços èster entre el sorbitol i l'àcid oleic (Tween-80). Conté, a més, sals de calci. Si el microorganisme posseeix activitat estearasa (lipasa), hidrolitzarà l'enllaç èster i alliberarà l'àcid oleic del Tween-80. Aquest àcid oleic, en presència d'un excés de Ca^{+2} precipitarà en forma de petits cristalls d'oleat càlcic que formaran un halo opac al voltant del creixement.



Agar caseïna

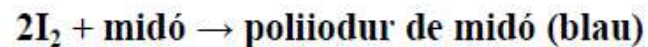


Activitat lipasa en tween
agar



ACTIVITATS MICROBIANES - Activitats enzimàtiques extracel·lulars

- ❑ **AGAR MIDÓ:** Per revelar la presència de midó cal tenyir-lo amb lugol. Afegeix un parell de mil·lilitres de lugol a la placa i observa el desenvolupament del color violeta fosc en aquelles zones on hi ha midó. Si apareixen halos transparents al voltant del creixement d'un microorganisme, això indica que hi ha hagut hidròlisi del polisacàrid.



AGAR MIDÓ

- ❑ **AGAR DNAsa:** Igual que en el cas anterior, cal revelar la presència de DNA sense hidrolitzar. Per fer-ho s'utilitza la precipitació d'aquest amb uns mil·lilitres de HCl 1N que s'afegeixen a la placa. Després d'uns minuts, el DNA precipitat torna opaques totes aquelles zones del medi on l'àcid nucleic no ha estat degradat. Al voltant del creixement dels que produïsquen DNasa extracel·lular apareixerà un halo transparent.



AGAR DNAsa

- ❑ **AGAR SANG:** L'agar sang és un medi d'aïllament especialment dissenyat per a facilitar el creixement de microorganismes exigents, bacteris grampositius i totes les espècies trobades en mostres d'origen clínic. Conté una barreja de peptones particularment adaptada al cultiu de microorganismes exigents (*estreptococs*, *Listeria*, *Helicobacter*, etc.). La presència de sang permet la determinació de l'hemòlisi, criteri bàsic en l'orientació cap a la identificació bacteriana.



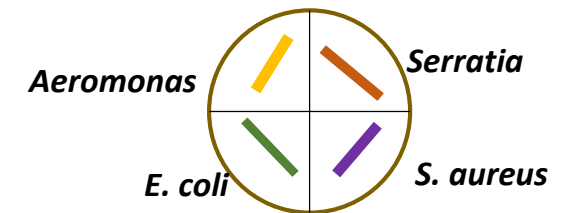
AGAR SANG



ACTIVITATS MICROBIANES - Activitats enzimàtiques extracel·lulars

Procediment

1. Cada grup de quatre persones disposarà de **quatre soques microbianes i de quatre plaques dels següents medis**: agar caseïna, agar midó, agar tween-80 i agar DNasa. Cal dividir cada placa en 4 sectors amb un retolador resistent a l'aigua per la base i retolar el nom d'un dels microorganismes en cada sector.



2. Utilitzant l'ansa redona i mitjançant els procediments asèptics habituals, cal inocular cada sector de cada placa amb un microorganisme i fer una sola estria en el centre d'aquest.

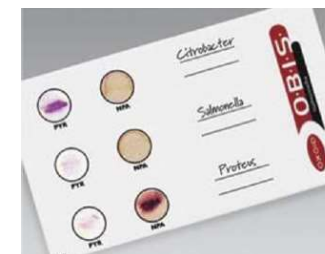
3. Cal repetir el procés amb el segon microorganisme i inocular així el segon sector de cada placa.

4. Es porten les quatre plaques a incubació (28 °C, 2-5 dies).

5. Transcorregut el temps d'incubació, cal llegir el resultat de les proves seguint els criteris que s'indiquen i anotar-lo en una taula.



- SESSIÓ XIII. Metabolisme dels carbohidrats en absència i presència de O₂

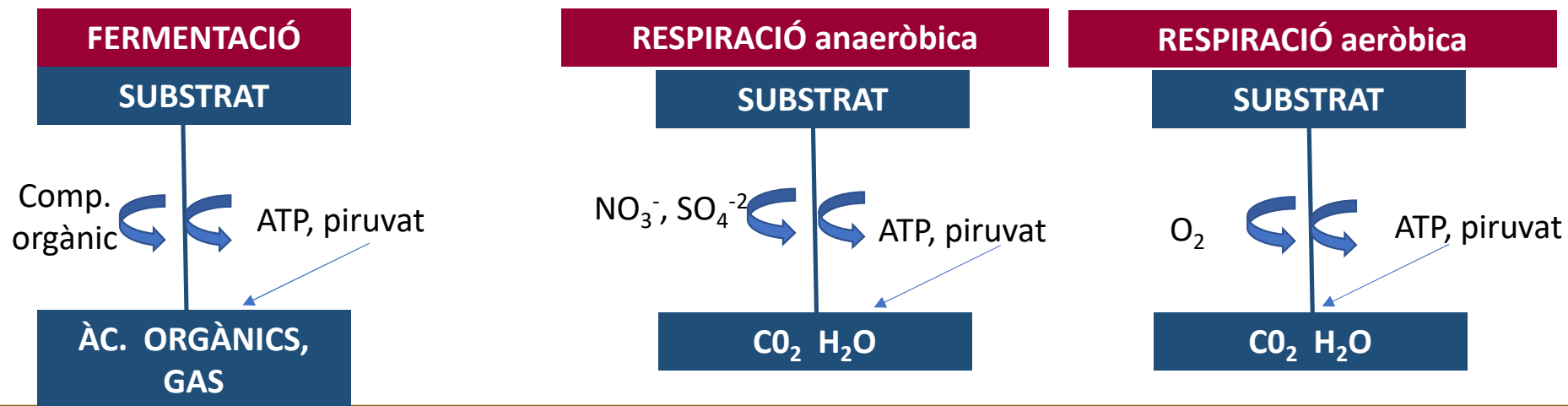




❖ METABOLISME MICROBIÀ

Metabolisme: conjunt de reaccions químiques que es produeixen en la cèl·lula

- ✓ Obtenir energia química de l'entorn i emmagatzemar-la
- ✓ Convertir els nutrients exògens en unitats precursoras de components cel·lulars
- ✓ Formar i degradar molècules necessàries per a accomplir funcions específiques: mobilitat o captació de nutrients





ACTIVITATS MICROBIANES- Oxidació-fermentació

La capacitat d'un bacteri per a **metabolitzar carbohidrats** de manera oxidativa o fermentativa en condicions aeròbies o anaeròbies és una de les característiques bàsiques de la identificació.

Medi d'Hugh i Leifson

- Una petita quantitat de peptona com a **font de N**,
- un carbohidrat (habitualment glucosa, però es pot investigar qualsevol altre) com a **font de C** i energia,
- una baixa concentració d'**agar** (medi semisòlid),
- un **indicador de pH** (blau de bromotimol) que és groc a pH àcid, verd a pH neutre i blau a pH alcalí.

Medi de oxidació – fermentació (O/F) segons Hugh i Leifson

| | |
|---------------------------------|-------|
| Peptona | 2 g/L |
| Glucosa | 10 |
| NaCl | 5 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,3 |
| Blau de bromotimol | 0,03 |
| Agar | 3 |



pH àcid (pH < 6)



pH neutre (pH = 6.5-7.5)



pH alcalí (pH 8-14)



ACTIVITATS MICROBIANES- Oxidació-fermentació

Procediment

1. Retola els dos tubs de medi amb el nom del bacteri que s'ha d'inocular.
2. Esterilitza una ansa recta en tota la seua extensió i pren l'inòcul del bacteri impregnant l'extrem del filferro.
3. Obre un dels tubs de O / F en condicions asèptiques i inocula l'agar en tota la seua profunditat punxant amb l'ansa recta. Tanca el tub.
4. Inocula de la mateixa manera el segon tub.
5. Agafa una petita quantitat de vaselina estèril d'un matràs amb una pipeta estèril de plàstic d'un sol ús, flameja la boca del matràs després d'obrir-lo i abans de tancar-lo, com és habitual.



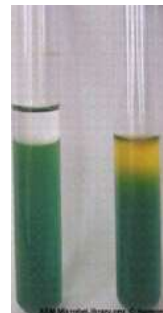


ACTIVITATS MICROBIANES- Oxidació-fermentació

Procediment

- Introdueix a un dels dos tubs de O / F la quantitat necessària de vaselina estèril perquè el tub quede segellat amb aprox. 1 cm de vaselina sobre l'agar. Descarta la pipeta o introdueix-la en la funda original perquè la puga utilitzar un altre company.
- Porta a covar els dos tubs a 28 °C durant 24-48 h i, un cop transcorregut aquest temps, anota els resultats i interpreta'ls d'acord amb la taula prèvia.

Anaerobiosi



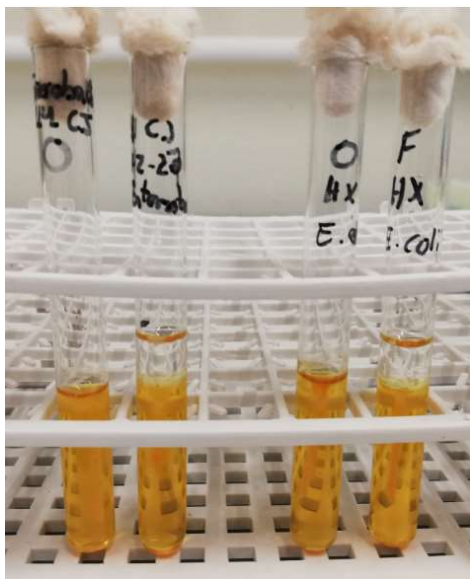
Aerobiosi





ACTIVITATS MICROBIANES- Oxidació-Fermentació

La capacitat d'un bacteri per a **metabolitzar carbohidrats** de manera oxidativa o fermentativa en condicions aeròbiques o anaeròbiques és una de les característiques bàsiques de la identificació.



Enterobacter

E. coli



Pseudomonas

Alcaligenes

| TUB AEROBI | TUB ANAEROBI | COMPORTAMENT |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Groc (= acidificat) | Groc (= acidificat) | Fermentador (1) |
| Groc en superfície (= acidificat) | Verd (= neutre) | Oxidador (2) |
| Blau en superfície (= alcalinitzat) | Verd (= neutre) | No sacarolític (3) |
| Verd (= neutre) | Verd (= neutre) | [no creix en el medi] |

Enterobacteriaceae

Gèneres ràpida fermentació: *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*

Gèneres lenta fermentació: *Serratia* i *Citrobacter*

No fermentadors: *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Shigella* i *Salmonella*



ACTIVITATS MICROBIANES- Oxidació-fermentació

La capacitat d'un bacteri per a **metabolitzar carbohidrats** de manera oxidativa o fermentativa en condicions aeròbies o anaeròbies és una de les característiques bàsiques de la identificació.



Enterobacter

E.coli



Pseudomonas

Alcaligenes

| TUB AEROBI | TUB ANAEROBI | COMPORTAMENT |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Groc (= acidificat) | Groc (= acidificat) | Fermentador (1) |
| Groc en superfície (= acidificat) | Verd (= neutre) | Oxidador (2) |
| Blau en superfície (= alcalinitzat) | Verd (= neutre) | No sacarolític (3) |
| Verd (= neutre) | Verd (= neutre) | [no creix en el medi] |

Gram (-) no fermentadors de la GLUCOSA

Gènere Pseudomonas



ACTIVITATS MICROBIANES- Oxidació-fermentació

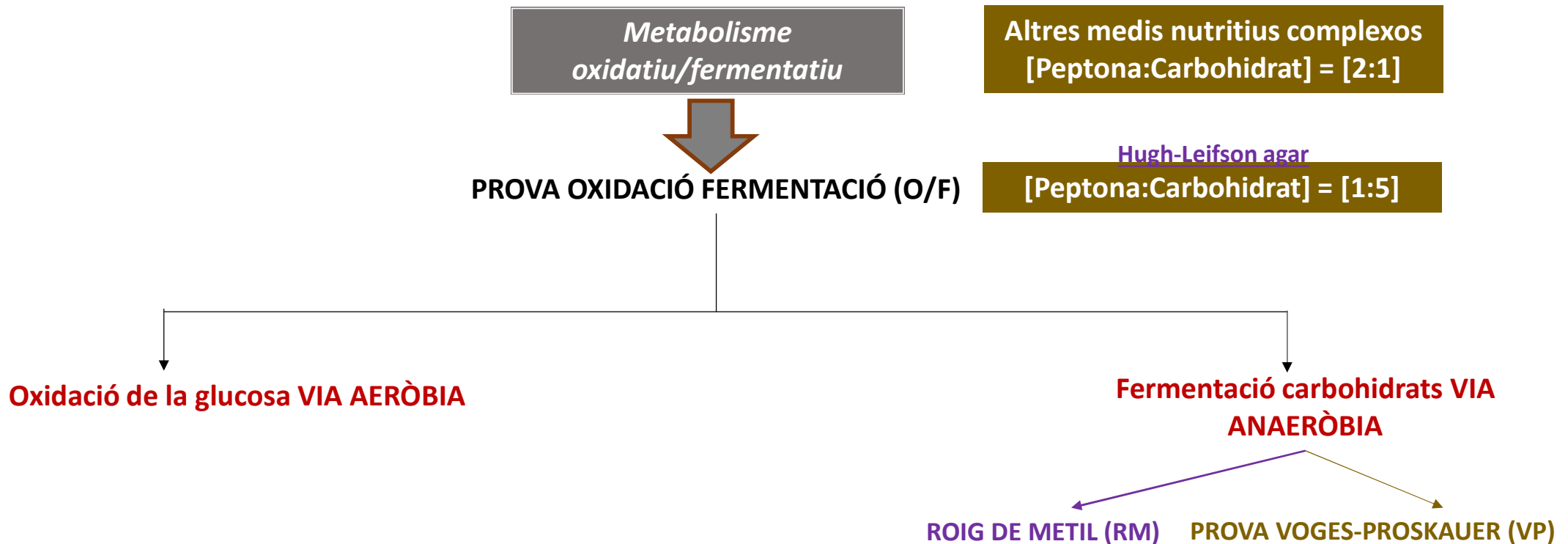
El medi d'OF va ser desenvolupat per **Hugh & Leifson**, que descobriren la importància taxonòmica de la distinció entre el metabolisme fermentatiu i l'oxidatiu dels carbohidrats per part dels bacteris gramnegatius.

Per tal de posar de manifest la propietat **fermentativa o oxidativa** dels bacteris, s'utilitza aquest medi semisòlid. La prova es realitza amb dos tubs per cada mostra. Ambdós són inoculats amb el bacteri problema, un dels dos es cobreix amb vaselina, per garantir condicions anaeròbiques.

| Soques bacterianes | Tub en condicions aeròbies | Tub en condicions anaeròbies |
|--|------------------------------|------------------------------|
| <i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750 | Sense canvis de color | Sense canvis de color |
| <i>Pseudomonas auruginosa</i> AATCC 9027 | Color groc | Sense canvis de color |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Color groc, generació de gas | Color groc, generació de gas |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 | Color groc, generació de gas | Color groc, generació de gas |
| <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028 | Color groc, generació de gas | Color groc, generació de gas |
| <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 | Color groc | Color groc |

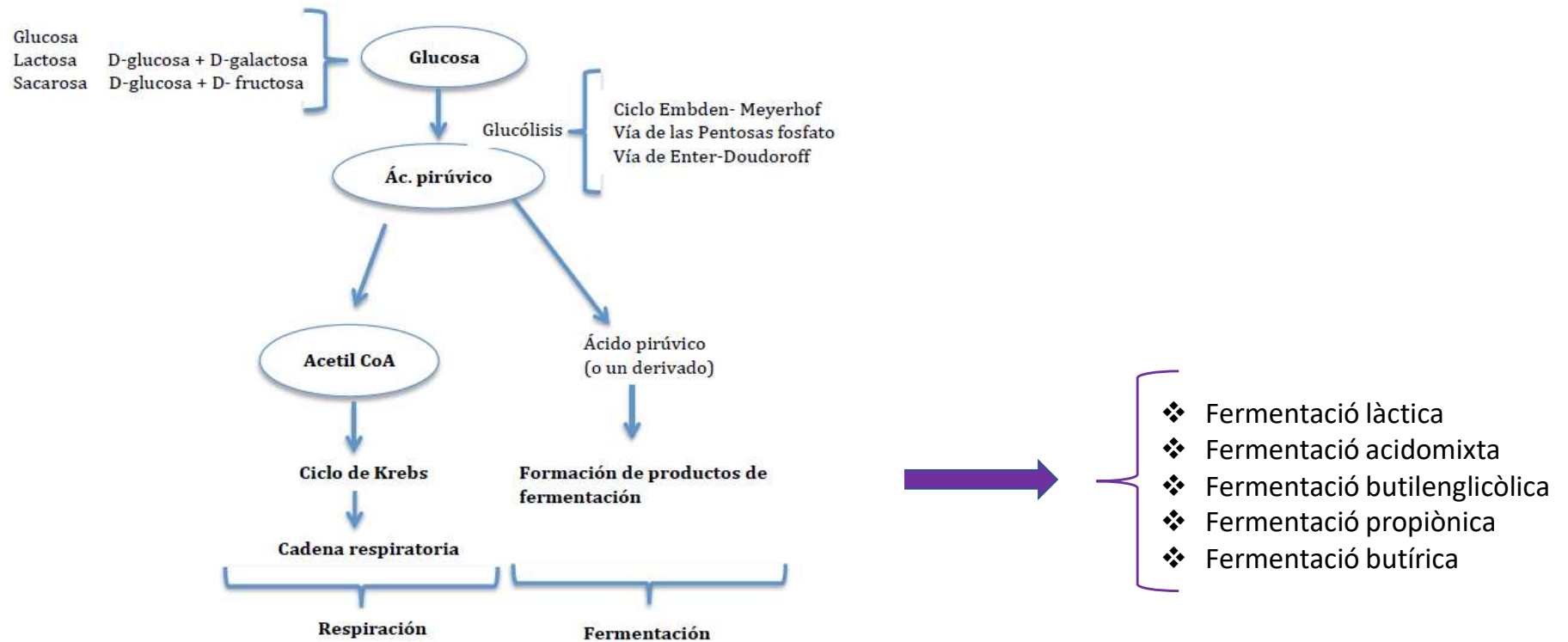


Metabolisme dels carbohidrats enfront de O₂





Metabolisme fermentatiu - Enterobacteris prova MR-VP



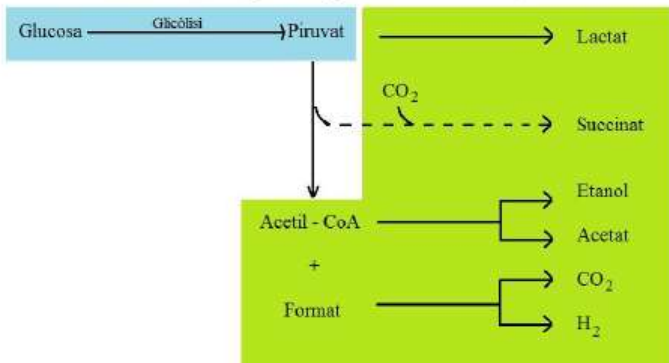


Metabolisme fermentatiu - Enterobacteris prova MR-VP

Enterobacteriaceae

Fermentació acidomixta

Fermentació àcid mixta (per exemple, *Escherichia coli*)



Productes típics
(quantitats molars)

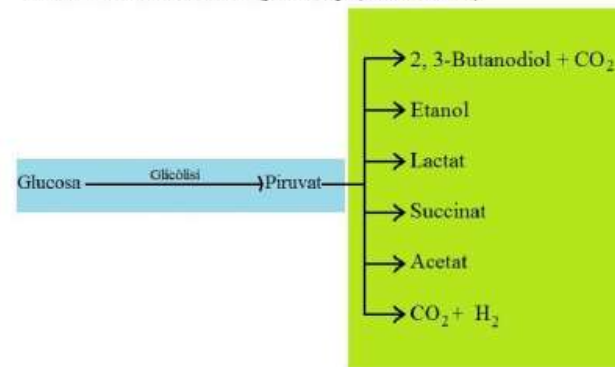
Àcidic : neutral
4 : 1
CO₂ : H₂
1 : 1

PROVA ROIG DE METIL

pH < 4.2 producció àcids variats ROIG
pH > 4.2 GROC- ATARONJAT

Fermentació butanediòlica

Fermentació butanediòlica (per exemple, *Enterobacter*)



Productes típics (quantitats molars)

Àcidic : neutral
1 : 6
CO₂ : H₂
5 : 1



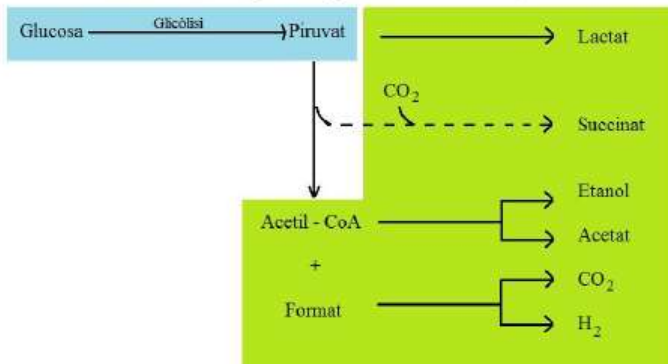
PROVA VOGES-PROSKAUER



Metabolisme fermentatiu - Enterobacteris prova MR-VP

Prova ROIG DE METIL (MR)

Fermentació àcid mixta (per exemple, *Escherichia coli*)



Productes típics
(quantitats molars)

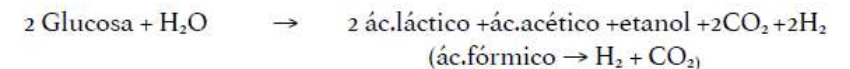
Àcidic : neutral
4 : 1
CO₂ : H₂
1 : 1

pH < 4.2 producció àcids variats ROIG
pH > 4.2 GROC- ATARONJAT

IDENTIFICACIÓ al nivell d'espècie dels bacils entèrics gramnegatius

- ❖ El roig de metil és un indicador amb interval de pH entre 6 (**GROC**) i 4.2 (**ROIG**).
- ❖ El pH al qual el roig de metil detecta àcids és molt més baix que altres indicadors en cultiu bacteriològic.
- ❖ Es requereix una elevada producció d'àcids per a provocar el viratge de color en ROIG DE METIL; àcids làctic, acètic, fòrmic de la utilització de la glucosa.

Ferm. àcida mixta:



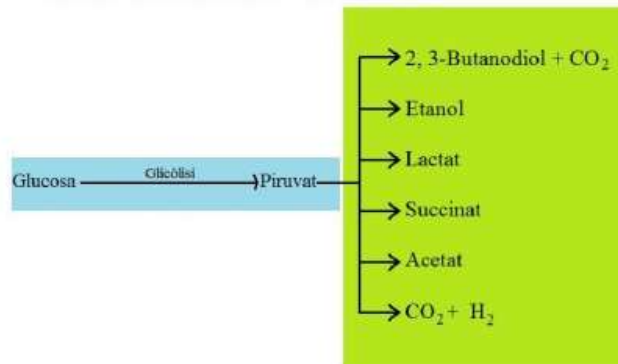


Metabolisme fermentatiu - Enterobacteris prova MR-VP

Prova VOGES-PROSKAUER

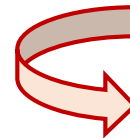
Fermentació butanediòlica (per exemple, *Enterobacter*)

Productes típics (quantitats molars)

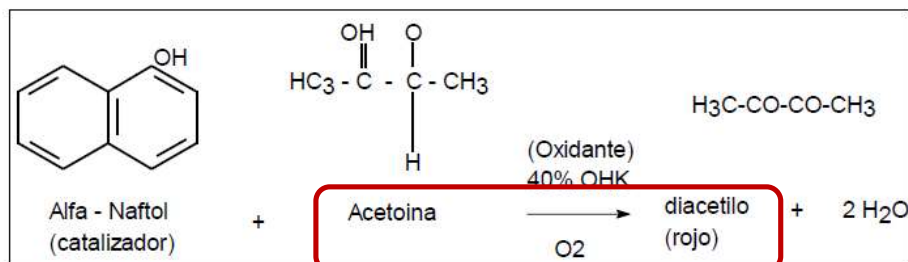


Àcidic : neutre
1 : 6
CO₂ : H₂
5 : 1

OBJECTIU: Determinar la capacitat de produir un producte final neutre, l'**acetilmetilcarbinol (acetoïna)**, a partir de la fermentació de la glucosa (fermentació butanediòlica).



Detecció acetoïna a partir de la fermentació butanediòlica de la glucosa





Metabolisme fermentatiu - Enterobacteris prova MR-VP

Prova ROIG METILÈ i VOGES-PROSKAUER

1. Cal retolar un tub de brou glucosat amb el nom del bacteri que es vol inocular.
2. S'inocula el brou amb l'ansa redona.
3. Es porta a incubació a 28/37 °C durant 48 h.
4. S'extrau 1 ml del brou glucosat crescut i es diposita en un tub net.
5. S'hi afegeix 0,3 ml d'**α-naftol** (5%, solució alcohòlica) i 0,5 ml de **KOH** (40% en aigua), s'agita i es deixa a la gradeta. S'agita de tant en tant fins que es compleixen 15 minuts. S'anota el canvi de color a roig cirera, si es dona.
6. S'hi afegeixen 3-4 gotes de roig de metil al brou glucosat que ha quedat al tub i s'anota el viratge.
7. Les soques **RM+** i **VP-** seran fermentadores acidomixtes, mentre que les **RM-** i **VP+** seran fermentadores butanediòliques.



Metabolisme fermentatiu - prova MR-VP

PROCEDIMENT

Voges - Proskauer

1. S'extrau **1 ml del brou glucosat** crescut i es diposita en un tub net.
2. S'hi afegeix **0,3 ml d' α -naftol** (5%, solució alcohòlica) i **0,5 ml de KOH** (40% en aigua), s'agita i es deixa en la gradeta.
3. Cal agitar de tant en tant fins que es complisquen 15 minuts. S'anota el canvi de color a roig cirera, si es dóna.

Roig de Metil

4. S'afegeixen **3-4 gotes de roig de metil** al brou glucosat que ha quedat al tub i s'anota el viratge.

Les soques **RM+** i **VP-** seran **fermentadores acidomixtes**,
Les soques **RM-** i **VP+** seran **fermentadores butanediòliques**

Les **soques no fermentadores** seran negatives en ambdues proves.



ACTIVITATS MICROBIANES- VOGES-PROSKAUER

Tabla. Reacción de la prueba Voges-Proskauer de algunos microorganismos de importancia clínica.

| Microorganismo | VP |
|---------------------------------|----|
| <i>Escherichia coli</i> | - |
| <i>Shigella sonnei</i> | - |
| <i>Edwardsiella tarda</i> | - |
| <i>Salmonella sp</i> | - |
| <i>Salmonella typhi</i> | - |
| <i>Citrobacter freundii</i> | - |
| <i>Citrobacter koseri</i> | - |
| <i>Citrobacter amaloniticus</i> | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | + |
| <i>Klebsiella ozaenae</i> | - |
| <i>Klebsiella planticola</i> | + |

Tabla. Reacción de la prueba Voges-Proskauer de algunos microorganismos de importancia clínica.

| Microorganismo | VP |
|------------------------------------|-----|
| <i>Klebsiella planticola</i> | + |
| <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> | - |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | + |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | + |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> | + |
| <i>Enterobacter taylorae</i> | + |
| <i>Hafnia alvei</i> | + |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | +/- |
| <i>Serratia marcescens</i> | + |
| <i>Proteus vulgaris</i> | - |
| <i>Proteus mirabilis</i> | +/- |
| <i>Morganella morganii</i> | - |
| <i>Providencia rettgeri</i> | - |
| <i>Providencia stuartii</i> | - |
| <i>Providencia alcalifaciens</i> | - |

RM +
Escherichia
Shigella
Salmonella
Vibrio



■ SESSIÓ XIV. Activitat citocrom-oxidasa i Activitat catalasa

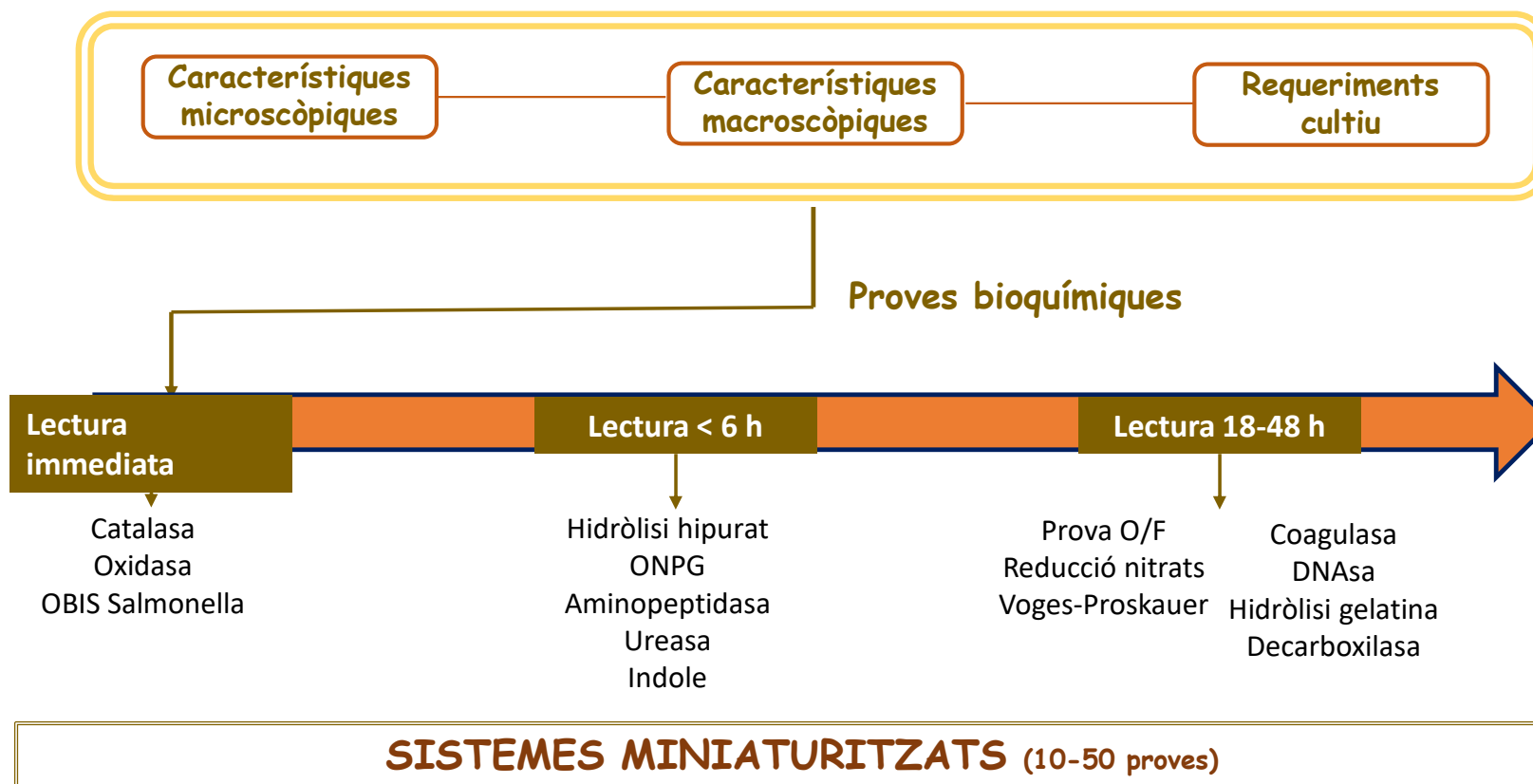




Mètodes fenotípics

PROVES
PRIMÀRIES

PROVES SEGON NIVELL
(gènere i espècie)





ACTIVITATS MICROBIANES - Oxidasa-Catalasa

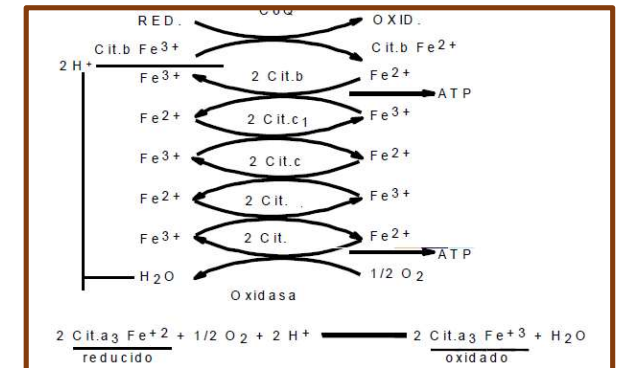
La presència d'aquests dos enzims és crucial en la identificació de diversos grups de bacteris:

- Citocrom-oxidasa (**oxidasa**) és una determinació habitual en el procés d'identificació de bacteris **Gram (-) heteròtrofs**
- Activitat **catalasa** és habitual en la identificació de **Gram (+)**

Citocrom-oxidasa (indofenol-oxidasa)



Forma part de la cadena de transport electrònic de multitud de bacteris i correspon a un **citocrom de tipus c**.



Oxidasa: Activitat Oxidasa (+) es deu a la presència d'un sistema **CITOCROM-OXIDASA**, que activa l'oxidació del citocrom, el qual transfereix electrons del H, al O₂, i així es produeix H₂O o H₂O₂ segons l'espècie. Per regla general, la citocrom oxidasa sols es troba en bacteris aerobis, anaerobis facultatius i, excepcionalment, en microaeròfils (*Vibrio fetus*), però els bacteris anaerobis estrictes manquen d'activitat OXIDASA.

2 citocromo C + 2 H⁺ + 1/2 O₂ + oxalato de p-amino dimetilnilina (reactivo)


citocromo
compuesto coloreado
oxidasa



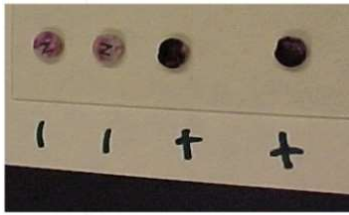
ACTIVITATS MICROBIANES - Oxidasa-Catalasa

Procediment - oxidasa

1. Amb un escuradents de fusta estèril recull una petita quantitat de creixement del bacteri problema des d'una placa de TSA.
2. Submergeix una tira de paper de filtre (8 x 2 cm aprox.) en la solució del reactiu de l'oxidasa acabat de preparar. Escorre lleument el paper contra la paret del recipient.
3. Estén el bacteri que has recollit amb l'escuradents sobre la part humida de la tira de paper i observa el canvi de color de la zona impregnada:
 - Si es produeix un canvi immediat (en menys de 10 ") i la zona es torna violeta fosc-negra, el bacteri posseeix citocroms c i és, per tant, oxidasapositiu.
 - Si no es produeix canvi de color, el bacteri és oxidasanegatiu.



Oxydase +



Dimetil-p-fenilendiamina al 1%

Acceptors artificials d'electrons

□ Para-fenilendiamina → Indofenol

Forma reduïda ➔ Forma oxidada

incolora ➔ **morada**



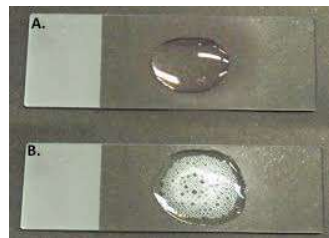
ACTIVITATS MICROBIANES - Oxidasa-Catalasa

Catalasa

La catalasa és un dels enzims que intervenen en el procés de destoxificació de les cèl·lules en condicions aeròbies (producció de H_2O_2 com a resultat del procés de respiració).

Els bacteris que sintetitzen **CATALASA**, hidrolitzen el **peròxid d'hidrogen i produeixen H_2O i O_2 gasós**, que s'allibera en forma de bombolles. Ex. Separació *Micrococacceae* (+) de *Streptococcus* spp. (catalasa -) i *Enterococcus* spp. (catalasa -).

La CATALASA està present en molts (però no tots) dels bacteris capaços de desenvolupar-se en presència de O_2 .

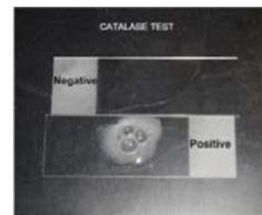




ACTIVITATS MICROBIANES - Oxidasa-Catalasa

Procediment - catalasa

1. Diposita en un portaobjectes net una o dues gotes de H_2O_2 de 10 vol. de concentració.
2. Agafa una quantitat de cultiu d'un bacteri a partir d'un medi sòlid amb l'ansa rodona estèril i emulsiona-la amb la gota de H_2O_2 .
3. Observa a simple vista si es produeixen bombolles a la gota en contacte amb les cèl·lules bacterianes. Si això passa, el bacteri és catalasapositiu.
4. Si el bombolleig no és observable a simple vista, mira la gota en una lupa o microscopi a baixos augments per observar si hi ha producció de petites bombolles. Si tampoc així s'observen, el bacteri és catalasanegatiu.



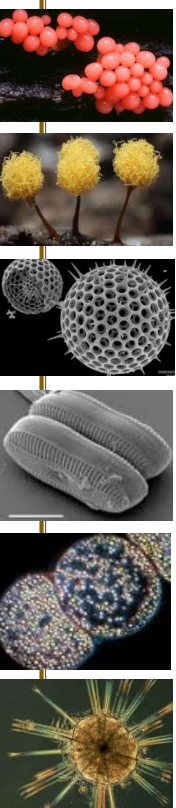


■ SESSIÓ XV. Recompte de microorganismes per filtració





❖ RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ



*Es calcula que cada any moren unes **842000 persones al món** per la presència de patògens en l'aigua per al consum (OMS, 2019).*

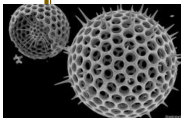


❖ RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ

Reial decret 902/2018, del 20 de juliol, pel qual es modifiquen el Reial decret 140/2003, del 7 de febrer, mitjançant el qual s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà, i les especificacions dels mètodes d'anàlisi.

Els paràmetres a controlar quant a l'aigua de consum humà són:

- a) Olor
- b) Sabor
- c) Color
- d) Terbolesa
- e) Conductivitat
- f) pH
- g) Amoni
- h) Bacteris coliformes
- i) ***Escherichia coli*** (*E. coli*)
- j) Coure, crom, níquel, plom, o un altre paràmetre quan se sospite que la instal·lació interior té aquest material instal·lat.
- k) Clor lliure residual i/o clor combinat residual: quan s'utilitze clor o els seus derivats per al tractament d'aigua potabilitzada.





❖ RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ

1. Bacteris COLIFORMES

Grup d'espècies bacterianes indicadores de contaminació d'aigües i aliments

- Ser aerobis o anaerobis facultatius;
- ser bacils gramnegatius;
- no ser esporògens (si és gramnegatiu NO esporula);
- oxidasanegatiu;
- capacitat de fermentar la lactosa, amb producció de gas en 48 hores a una temperatura de 37 °C.

El grup coliforme està format pels següents gèneres:

- ❖ *Escherichia* → ***Escherichia coli***
- ❖ *Klebsiella*
- ❖ *Enterobacter*
- ❖ *Citrobacter*

Theodor Escherich (29 de novembre de 1857 – 15 de febrer de 1911) fue un pediatra y profesor austroalemán famoso por descubrir la bacteria *Escherichia coli*,



Theodor Escherich recibió su doctorado en medicina en 1881. Inicialmente se dedicó al estudio de la bacteriología

- Principal organisme anaerobi facultatiu del sistema digestiu
- Adherit a la mucosa gastrointestinal humana 48 h després de la primera ingesta neonatal



❖ RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ

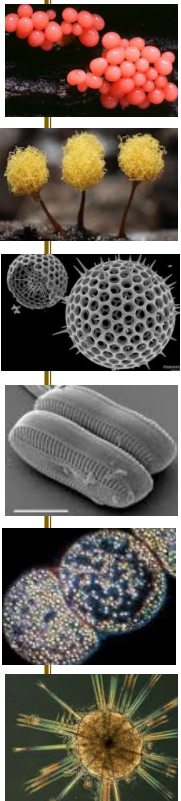
OBJECTIU Concentrar el microorganismes per fer el RECOMPTE EN PLACA



Materials

- Rampa de filtració, bomba de buit i matràs de Kitasato
- Membranes d'acetat estèrils
- Pinces Millipore
- Plaques Petri **Agar MacConkey (AdMC)**
- Plaques Petri amb **TSA**
- Aigua problema
- Provetes

MEDI DE CULTIU: selectiu i diferencial





❖ MEDIS DE CULTIU SELECTIUS I DIFERENCIAL

MATERIALS PER A LA PRÀCTICA

- ❑ Cultiu *Escherichia coli* CECT101 (**Gram -**)
- ❑ 1 placa Petri amb agar **TSA**, que és un medi general i complex
- ❑ 1 placa Petri amb **agar de MacConkey (AdMC)**, que és un medi selectiu i diferencial (*fermentació lactosa*)

LACTOSA
Indicador pH

DIFERENCIAL

Violeta cristall
Sals biliars

SELECTIU

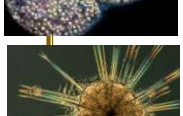
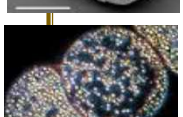
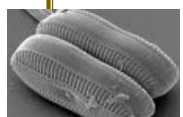
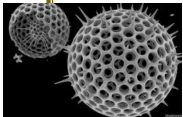
Lac+ (esquerra) Lac - (dreta)



Fórmula (por litro)

Composición (g/l):

| | | | |
|----------------------|---------|--------------------------------|--------|
| Lactosa | 10,0 g | Peptona (carne y caseína)..... | 3,0 g |
| Sales Biliars | 1,5 g | Peptona de Gelatina | 17,0 g |
| Rojo Neutro..... | 0,03 g | Sodio Cloruro..... | 5,0 g |
| Violeta Cristal..... | 0,001 g | Agar | 13,5 g |
| pH final: 7,1 ± 0,2 | | | |



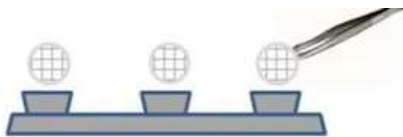


❖ RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ

Procediment

- Filtrar per triplicat 50, 100, 200 mL de la mostra d'aigua.
- Posar les tres membranes en plaques petri
- Incubar a 37 °C durant 24-48 h (*coliformes totals*).

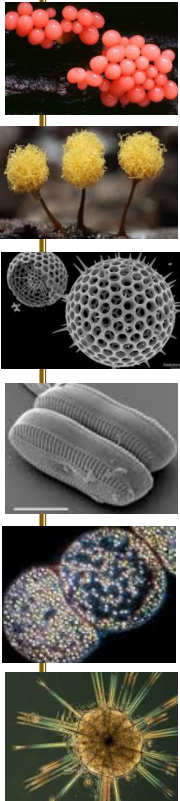
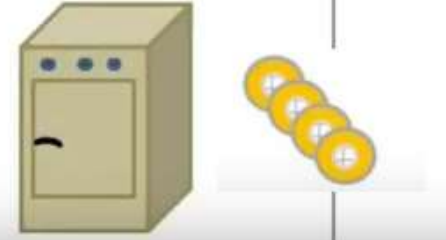
FILTRACIÓ



CULTIU



INCUBACIÓ





❖ Avaluació Resultats RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ



COLIFORMES

- Ser aerobis o anaerobis facultatus;
- ser bacils gramnegatius;
- no ser esporògens (si és gramnegatiu NO esporula)
- oxidasanegatius;
- capacitat de fermentar la lactosa, amb producció de gas en 48 hores a una temperatura de 37 °C.

COLIFORMES TOTALS

Incubació 24-48 h, 37 °C

UFC/100 mL
> 1000 UFC/mL



Diluir la mostra

El grup coliforme està format pels següents gèneres

❖ *Escherichia*
❖ *Klebsiella*
❖ *Enterobacter*
❖ *Citrobacter*

→ Lactosa (+)



Agar McConkey

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Digerit pancreàtic de gelatina | 17.0 g/L |
| Digerit pancreàtic de caseïna | 1.5 |
| Digerit peptídic de teixit animal | 1.5 |
| Lactosa | 10.0 |
| Roig neutre | 0.03 |
| Sals biliars | 1.5 |
| Violeta cristall | 0.001 |
| Clorur de sodi | 5.0 |
| Agar | 13.5 |
| pH = 7.1. | |

SIGNIFICANCE

Bile salts are extremely abundant molecules in the mammalian intestine and play important roles in food digestion. Much less well known is the fact that bile salts are also highly antimicrobial and control bacterial growth in the gut. Here, we report the discovery that bile salts affect bacterial growth by causing widespread unfolding and aggregation of cytosolic proteins in bacteria, while simultaneously triggering a prooxidizing shift in the cellular ratio of reduced to oxidized glutathione. Our studies therefore reveal an important and unrealized property of a set of compounds long known to be important in human physiology, demonstrate how bacteria such as *Escherichia coli* defend themselves against bile salts

AGENT SELECTIU:

- Violeta cristall
- Sals biliars

AGENT DIFERENCIAL:

- Lactosa
- Indicador pH roig neutre (6.8 – 8.4) roig - groc



Els bacteris lactosa (+) → **rosa-roig** (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*)
 Els bacteris lactosa (-) → **incolors** (*Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, entre altres)



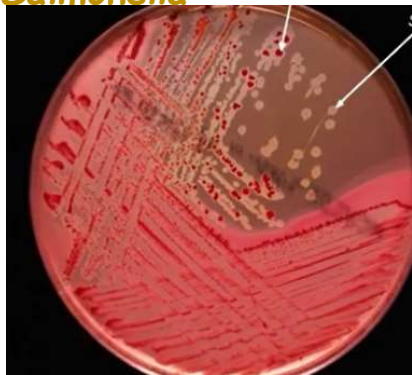
Colònies ROSADES

Klebsiella



Colònies incolores

Salmonella



Colònies ROGES

E. coli (halo rosa)



Microorganismes Lac (-)

- ✓ No acidifiquen el medi
- ✓ Colònies transparents, pH del medi torna groc (pH≈8)

| | Lac (+) | Lac (-) |
|-------------------------|---------|---------|
| <i>Salmonella</i> | | x |
| <i>Klebsiella</i> | x | |
| <i>Proteus</i> | | x |
| <i>Pseudomonas</i> | | x |
| <i>Escherichia coli</i> | x | |
| <i>Enterobacter</i> | x | |

| | Indol | RM | VP | Cit. | Urea | Mov. | Lac |
|-------------------------------|----------------|----|----|----------------|------|------------------------|-----|
| <i>Citrobacter freundii</i> | - | + | - | + | - | + | + |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - | - | + | V ⁺ | + | - | + |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | + | - | + | V ⁺ | + | - | + |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | - | - | + | + | - | + | + |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | - | - | + | + | - | + | V |
| <i>Proteus mirabilis</i> | - | + | - | + | + | + | - |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | - | - | - | + | + |
| <i>Salmonella spp.</i> | - | + | - | + | - | + | - |
| <i>Shigella spp.</i> | V | + | - | - | - | - | - |
| <i>Yersinia spp.</i> | V ⁻ | + | - | - | - | + a 22° C - a 37° C | V |

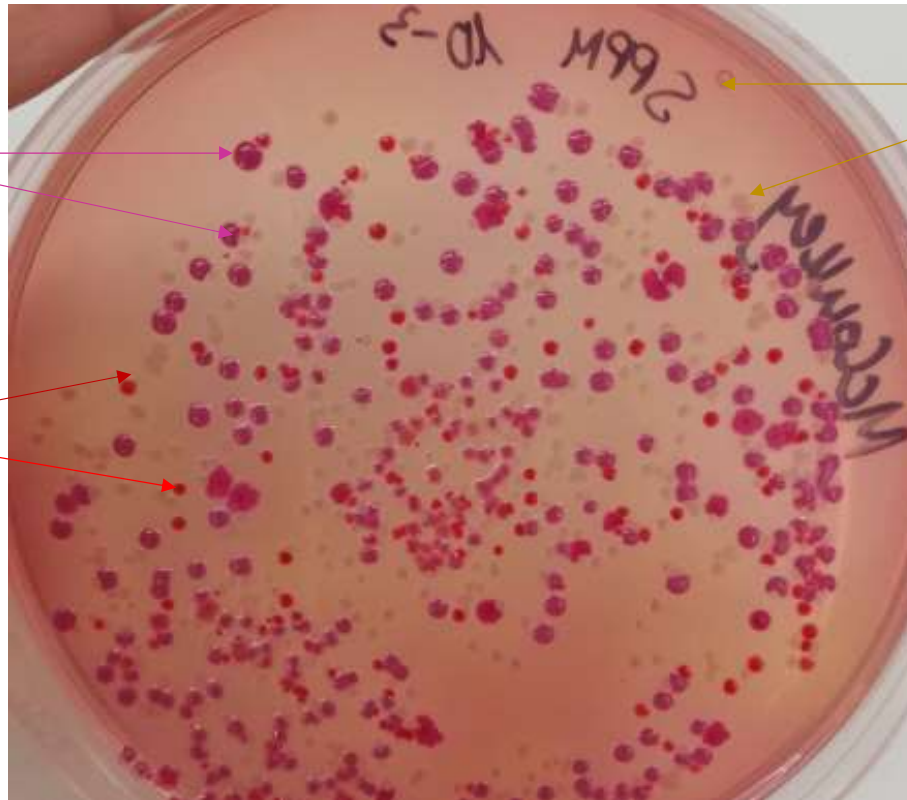


Coliformes

Colònies rosades/roges

Escherichia coli,
Klebsiella, Enterobacter

Colònies roges
Serratia



Colònies incolores
Salmonella, Proteus



❖ RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ

Procediment

- Filtrar per triplicat 100 mL de la mostra d'aigua.
- Col·locar les tres membranes Petri agar MacConkey
- Incubar a 37 °C durant 24-48 h (**coliformes totals**).

Reial decret 902/2018, del 20 de juliol, per el qual es modifiquen el Reial decret 140/2003, del 7 de febrer, mitjançant el qual s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà, i les especificacions dels mètodes d'anàlisi.



Absència d'*E. coli* en 100 ml d'aigua

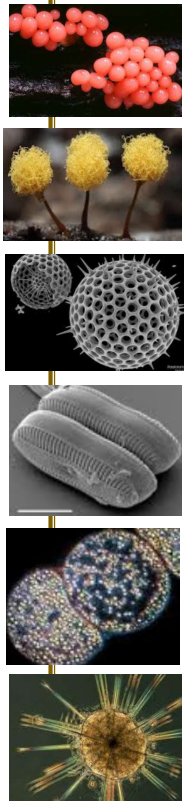
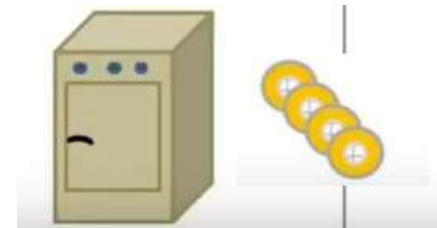
FILTRACIÓ



CULTIU



INCUBACIÓ





❖ Avaluació Resultats RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ



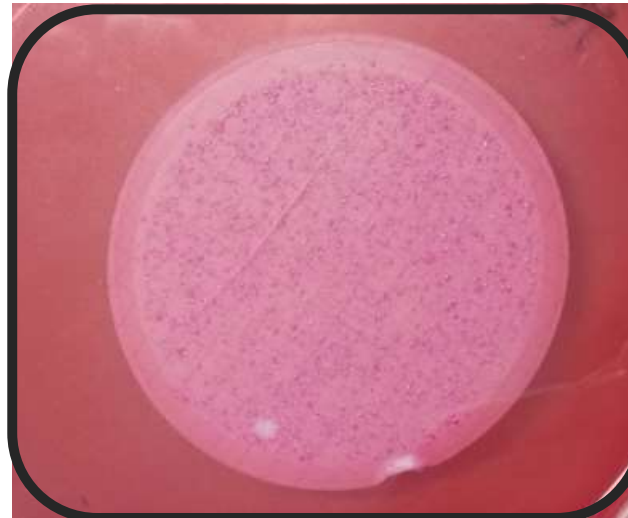
COLIFORMS TOTALS

Incubació 24-48 h, 37°C

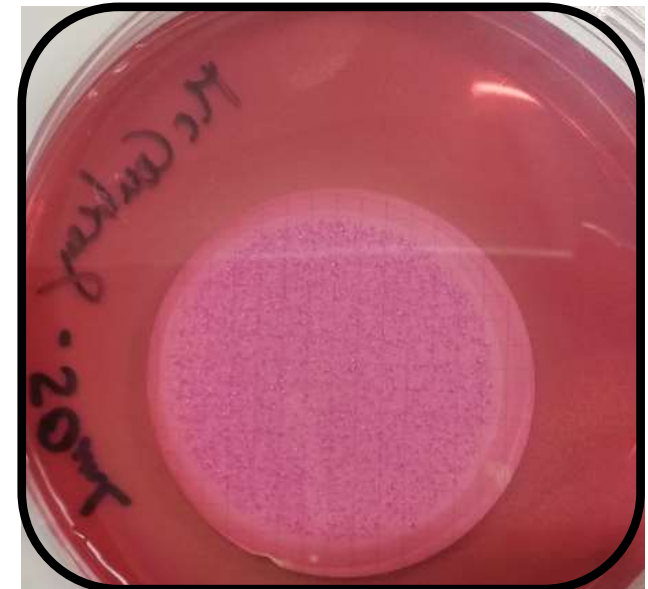
UFC/100 mL
> 1000 UFC/100 mL



Diluir la mostra



Membrana filtració 1
> 1000 UFC/100 mL



Membrana filtració 2
> 1000 UFC/50 mL



❖ Avaluació Resultats RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ

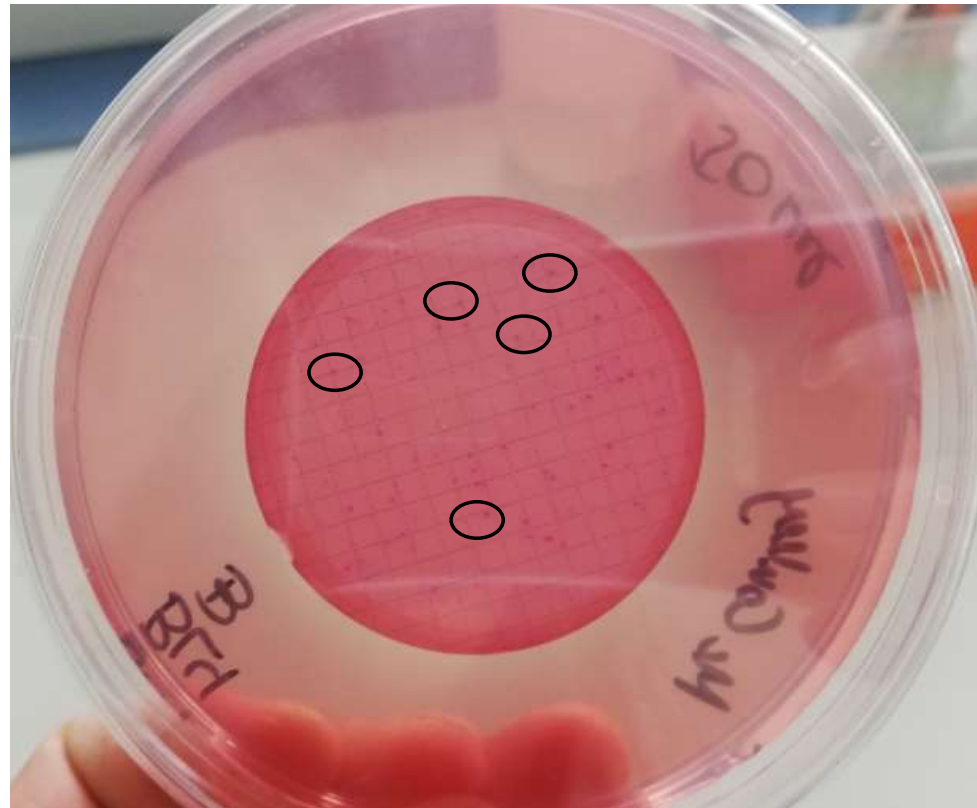


COLIFORMS TOTALS

Incubació 24-48 h, 37°C

UFC/100 mL
> 1000 UFC/mL

↓
Diluir la mostra

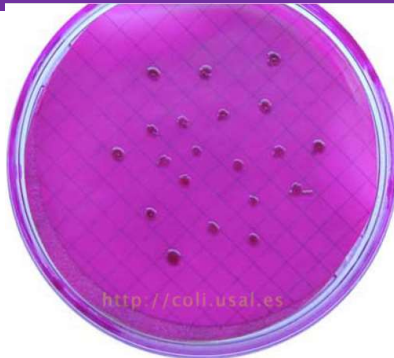


70 UFC/50ml





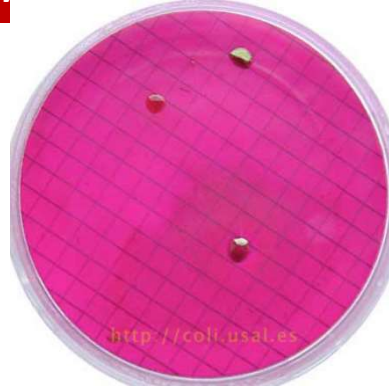
Aigua d'una font urbana 100 mL



El resultat de l'anàlisi és:

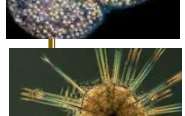
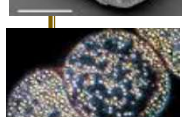
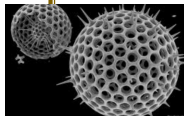
- a) Absència d'UFC de coliformes totals en **100 mL** d'aigua problema
- b) 2 UFC de coliformes totals per **100 mL** d'aigua problema
- c) 20 UFC de coliformes totals per **100 mL** d'aigua problema
- d) 200 UFC de coliformes totals per **100 mL** d'aigua problema
- e) Més de 100 colònies. Repetir filtració amb menor volum d'aigua

Aigua embotellada 250 mL



El resultat de l'anàlisi és:

- a) Absència d'UFC de coliformes totals en **100 mL** d'aigua problema
- b) Absència d'UFC de coliformes totals per **250 mL** d'aigua problema
- c) 4 UFC de coliformes totals per **100 mL** d'aigua problema. Repetir volum major
- d) 4 UFC de coliformes totals per **250 mL** d'aigua problema. Repetir volum major
- e) Més de 100 colònies. Repetir filtració amb menor volum d'aigua





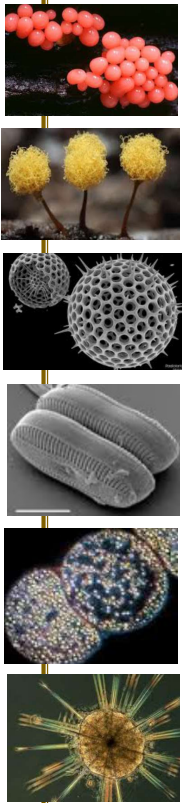
❖ RECOMPTE DE COLIFORMES PER FILTRACIÓ

Aigua residual 10 mL



El resultat de l'anàlisi és:

- a) Absència d'UFC de coliformes totals en **1000 mL** d'aigua problema
- b) 50 UFC de coliformes totals per **1000 mL** d'aigua problema
- c) 50 UFC de coliformes totals per **100 mL** d'aigua problema
- d) 50 UFC de coliformes totals per **10 mL** d'aigua problema
- e) Més de 1000 colònies. Cal repetir filtració diluint la mostra d'aigua.





PROBLEMES DE RECOMPTE PER FILTRACIÓ

Es desitja avaluar la qualitat microbiològica d'una aigua corresponent a un riu. S'agafen 4 mostres periòdiques d'aigua problema al gener, abril, juliol i novembre (per triplicat). El volum d'aigua de mostreig es fa passar per filtració utilitzant membranes de porus = $0.22 \mu\text{m}$ per retenir els microorganismes, i portar a incubació en agar MacConkey (37°C , 24 h).

Els resultats es detallen a continuació:

Gener → 2 UFC/50 ml mostra aigua
Abril → 150 UFC/100 ml mostra aigua
Juliol → 10^6 UFC/100 ml mostra aigua
Novembre → 0 UFC/10ml mostra aigua

Feu una anàlisi de la influència estacional en la contaminació de les aigües, expressant els resultats d'acord amb la legislació (RD

1341/2007 aigua de bany)

***E. coli* 900-1000 UFC/100 ml** qualitat suficient-bona

***E. coli* 500 UFC/100 ml** qualitat excel·lent

Gener – fer analitzar 200-500 ml de mostra d'aigua (comprovació UFC/100ml)

Abril - Qualitat excel·lent < 500 UFC/100ml aigua

Juliol – NO COMPLEIX LEGISLACIÓ (excés de contaminació) -> diluir la mostra

Novembre – fer analitzar 100-500 ml de mostra d'aigua (comprovació UFC/100ml)

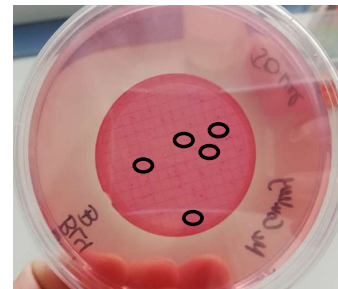


PROBLEMES DE RECOMPTE PER FILTRACIÓ

Es desitja avaluar la qualitat microbiològica d'una mostra d'aigua. Es prepara l'experimentació següent:

D_M = dilució 1/100 mostra d'aigua
Filtració membrana 0,2 μm grandària de porus
Per triplicat

Concentració de microorganismes
per 10 ml de mostra d'aigua?



Agar MacConkey



180 UFC/100 ml
120 UFC/100 ml
150 UFC/100 ml



1.5×10^4 UFC/100ml
 1.5×10^3 UFC/10ml



PROBLEMES DE RECOMPTE PER FILTRACIÓ

Hem de preparar **20 ml de la dilució 10^{-3} d'un cultiu microbià**. Indiqueu com es realitzaria:



Dilució 10^{-1} = 1ml de mostra + 9 ml de diluent

Dilució 10^{-2} = 1 ml de mostra (10^{-1}) + 9 ml de diluent

Dilució 10^{-3} = 2 ml de mostra (10^{-2}) + 9 ml de diluent

A continuació:

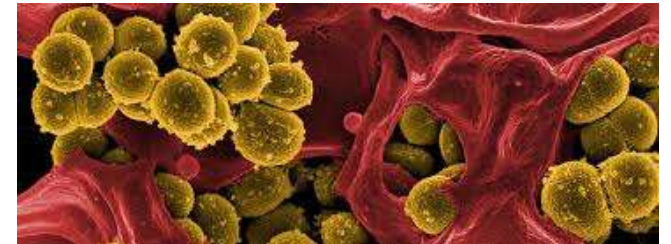
- 5 ml d'aquesta dilució es filtren per quantificar els **bacteris cultivables** presents. Aquest filtre es col·loca en un medi adequat. Després d'incubar, es recompten 125 colònies. Quin nombre d'UFC/ml conté la mostra?

$$R(\text{UFC/ml}) = \frac{1}{1} \times \frac{1}{10^{-3}} \times \frac{1}{5} \times 125$$

2.5×10^4 UFC/ml

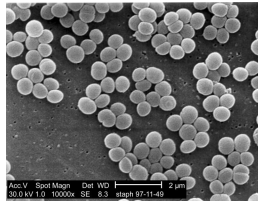
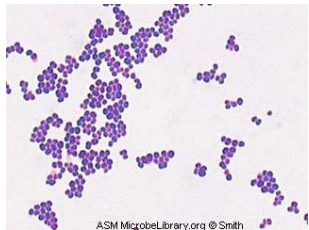


■ SESSIÓ XVI. *Staphylococcus aureus*



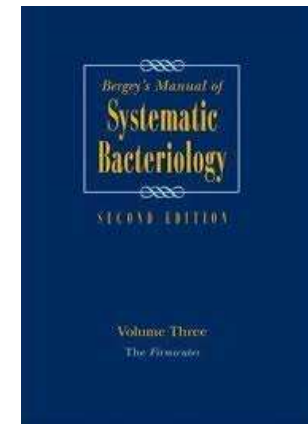


Staphylococcus



Classificació del *Staphylococcus*:

- Regne: *Prokaryota*
- Fílum: *Firmicutes*
- Classe: *Bacilli*
- Ordre: *Bacillales*
- Família: *Staphylococcaceae*
- Gènere: *Staphylococcus*



El nom de *Staphylococcus* prové de la paraula grega *staphyle* que significa 'raïm', per analogia amb l'agrupació observada per a aquest bacteri en una tinció GRAM.

En 1880 *Staphylococcus* va ser vist per primera vegada en la pus d'infeccions pirogèniques. Identificació com a cocs grampositius.

En 1884 *S. aureus* va ser identificat com el bacteri causant d'infeccions en ferides, així com la furunculosi.

En 1928 Alexander Fleming descobreix que el fong *Penicillium* contamina mitjans de cultius amb soques de *Staphylococcus aureus*, i observa la inhibició del bacteri, de manera que així s'evidencia una nova substància (antibiòtic): la penicil·lina.



Staphylococcus

En l'actualitat existeixen 49 espècies dins del gènere *Staphylococcus*, caracteritzats per un contingut G + C de 30-39 mol%.

Table 1 Species of *Staphylococcus* recognized by the National Center for Biotechnology Information

| | | |
|--|--|--|
| <i>Staphylococcus agnetis</i> | <i>Staphylococcus condimentii</i> | <i>Staphylococcus croceolyticus</i> |
| <i>Staphylococcus delphini</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> ^a | <i>Staphylococcus arlettae</i> |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> ^a | <i>Staphylococcus caprae</i> ^a | <i>Staphylococcus devriesei</i> |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | <i>Staphylococcus auricularis</i> | <i>Staphylococcus cohnii</i> |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ^a | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> ^a | <i>Staphylococcus piscifermentans</i> |
| <i>Staphylococcus hominis</i> ^a | <i>Staphylococcus hyicus</i> | <i>Staphylococcus intermedius</i> |
| <i>Staphylococcus kloosii</i> | <i>Staphylococcus equorum</i> | <i>Staphylococcus lentus</i> |
| <i>Staphylococcus nepalensis</i> | <i>Staphylococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus felis</i> |
| <i>Staphylococcus chromogenes</i> | <i>Staphylococcus gallinarum</i> | <i>Staphylococcus muscae</i> |
| <i>Staphylococcus simulans</i> | <i>Staphylococcus vitulinus</i> | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| <i>Staphylococcus xylosum</i> | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> ^a | <i>Staphylococcus fleurettii</i> |
| <i>Staphylococcus pettenkoferi</i> | <i>Staphylococcus leei</i> | <i>Staphylococcus succinus</i> |
| <i>Staphylococcus rostri</i> | <i>Staphylococcus lyticans</i> | <i>Staphylococcus massiliensis</i> |
| <i>Staphylococcus microti</i> | <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ^a |
| <i>Staphylococcus schleiferi</i> | <i>Staphylococcus sciuri</i> | <i>Staphylococcus simiae</i> ^a |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i> | <i>Staphylococcus lutrae</i> | |
| <i>Staphylococcus pseudolugdunensis</i> | <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> ^a | |

^aSpecies with DNA sequence available.

Cèl·lules esfèriques **Gram (+)** de 0,5-1,5 µm de diàmetre que es troben com a cèl·lules aïllades o agrupades en parelles, tètades o formant curtes cadenes o agrupaments irregulars.

Microorganismes no mòbils i no formadors d'endòspores; de vegades, en cultius joves, s'observa la formació de càpsules, però desapareix en cultius en fase estacionària.

Són microorganismes anaerobis facultatius i posseeixen metabolisme tant respiratori com fermentatiu:

- Oxidasa +
- Catalasa +
- Fermenten carbohidrats



Staphylococcus aureus - Identificació

La major part de les soques de *Staphylococcus aureus* es caracteritzen per presentar en cultiu colònies d'un **color groc daurat** (d'ací ve el seu nom), la qual cosa es deu a la producció de pigments carotenoides.



Una altra de les característiques que presenten la major part de les soques és la formació d'un halo de β -hemòlisi quan creixen en un medi de cultiu amb sang.

S. aureus és un bacteri que creix sense dificultat en mitjans amb **altes concentracions de NaCl**, i que és poc exigent, ja que pot créixer en mitjans no selectius, a excepció d'algunes soques descrites poc comunes, que, per a créixer, podrien requerir la presència de CO₂, de certs metabòlits (hemina, menadiona, etc.) o de mitjans hipertònics.



Staphylococcus aureus - Identificació

S. aureus és l'espècie més virulenta del gènere que es coneix, ja que aquest bacteri té un ampli espectre de factors que contribueixen a produir infeccions i malaltia.

| Factor | Crecimiento microorganismo | | Producción toxina estafilocócica | |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| | Óptimo | Intervalo | Óptimo | Intervalo |
| Temperatura | 37°C | 7 - 48 °C | 40 - 45 °C | 10 - 48 °C |
| pH | 6 - 7 | 4 - 10 | 7 - 8 | 4 - 9,6 |
| Actividad de agua (a _w) | 0,98 | 0,83 - >0,99 ¹ | 0,98 | 0,85 - >0,99 ² |
| NaCl (%) | 0 | 0-20 | 0 | 0 - 10 |
| Potencial redox (E _h) | >+200 mV | <-200mV hasta >+200mV | >+200 mV | <-100mV hasta >+200mV |
| Atmósfera | Aerobia | Anaerobia - Aerobia | Aerobia (5-20% oxígeno disuelto) | Anaerobia - Aerobia |

¹Aerobia (anaerobia 0,90 - > 0,99)

²Aerobia (anaerobia 0,92 - > 0,99)



Laboratori de Microbiologia



Staphylococcus aureus – Identificació amb tècniques de cultiu

Medis no selectius

- ✓ Agar sang
- ✓ BHIA
- ✓ PCA + Ilet
- ✓ TSA



Medis selectius

- ✓ Mannitol - sal
- ✓ Baird-Parker
- ✓ Vogel and Johnson

Components selectius

- ✓ Alta concentració en sal
- ✓ Clorur de liti
- ✓ Glicina
- ✓ tel·lurit de potassi
- ✓ Acriflavina i colistina
- ✓ Incubació > 42 °C



Bacteris subletalment danyats



Staphylococcus aureus – Identificació amb tècniques de cultiu

| <i>Media</i> | <i>Selective agents</i> | <i>Diagnostic criterion</i> |
|---|--|---|
| Mannitol-salt | Sodium chloride | Mannitol fermentation |
| Mannitol-salt-acriflavine | Sodium chloride Acriflavine | Mannitol fermentation |
| Baird–Parker | Potassium tellurite Glycin Lithium chloride | Tellurite reduction (black colonies) Clear halo (egg yolk) |
| Baird–Parker – Rabbit plasma fibrinogen | Potassium tellurite Glycin Lithium chloride | Coagulase |
| Vogel and Johnson modified | Potassium tellurite Glycin Lithium chloride | Tellurite reduction Mannitol fermentation DNase |
| 4S | Sodium chloride Potassium tellurite Incubation at 42 °C | Tellurite reduction Clear halo (egg yolk) |
| KRANEP | Potassium thiocyanate Lithium chloride Sodium azide Cycloheximide (antifungal compound) | Mannitol fermentation Clear halo (egg yolk) Pigment |
| Columbia CNA | Nalidixic acid Colistin sulfate | Pigment Hemolysis |



Staphylococcus aureus – Identificació amb tècniques de cultiu

BD Baird-Parker Agar és un medi moderadament selectiu i de diferenciació per a l'aïllament i recompte de *Staphylococcus aureus* en aliments, mostres ambientals i clíniques.

BD Baird-Parker Agar

Fórmula* por litro de agua purificada

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Bacto Tryptone | 10,0 g |
| Bacto Beef Extract | 5,0 |
| Bacto Yeast Extract | 1,0 |
| Cloruro de litio | 5,0 |
| Glicina | 12,0 |
| Piruvato sódico | 10,0 |
| Telurito potásico | 0,1 |
| Agar | 20,0 |
| Emulsión de yema de huevo | 50,0 mL |

pH 6,8 ± 0,3

El medi no s'ha d'utilitzar per a l'aïllament d'estafilococs diferents de *S. aureus*.

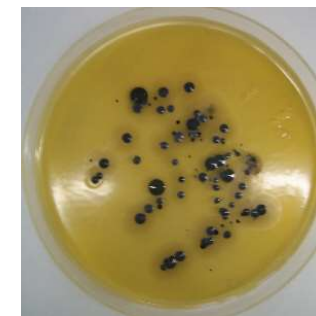
Agents selectius

Els estafilococs produeixen colònies de color de gris fosc a negra a causa de la reducció del tel·lurit.

És possible que es forme una zona de precipitació a causa de l'activitat de lipases.

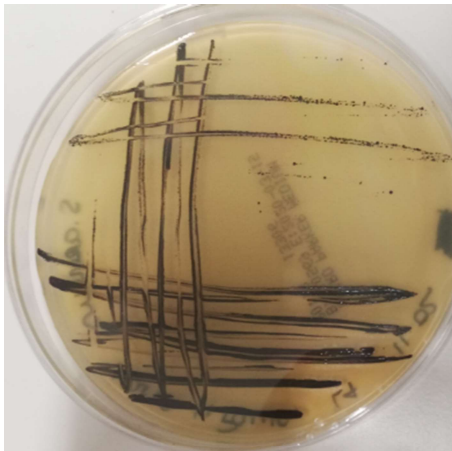
Determina la producció de lecitinasa i l'activitat de la lipasa

Els estafilococs que produeixen lecitinasa descomponen el rovell d'ou i creen zones transparents al voltant de les colònies corresponents.

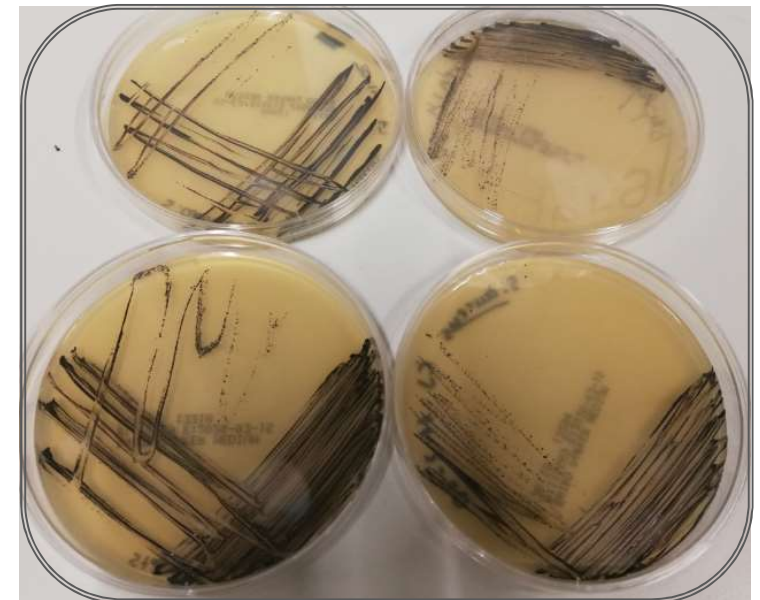




Staphylococcus aureus – Identificació amb tècniques de cultiu



Creixement TSA



Creixement Agar Baird Parker

Reducció del **tel·lurit** → **tel·luri**



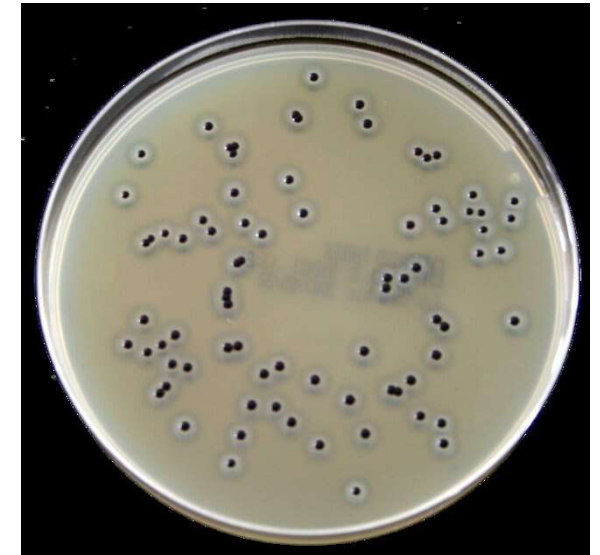
Staphylococcus aureus – Identificació amb tècniques de cultiu

Els **estafilococs coagulasapositius** (*S. aureus*) produeixen colònies brillants, convexes, de color gris fosc a negre, amb una zona opaca al voltant de les colònies o sense aquesta.

Els estafilococs amb **resultat negatiu a la coagulasa** produeixen creixement feble o nul, amb colònies de color gris a negre, habitualment sense zones transparents ni opaques.

Sovint s'inhibeixen els organismes diferents dels estafilococs. Si es produeix creixement, les colònies poden adquirir un color de marró a gris o tornar-se incolores, sense zones transparents ni opaques.

La identificació presumptiva que s'obté d'aquest medi s'ha de confirmar amb proves addicionals.





Staphylococcus aureus - Identificació

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de identificación de *S. aureus* y algunas especies de ECN.

| | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. schleiferi</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. lugdunensis</i> |
|--------------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| Clumping factor | + | – | + | – | + |
| DNAasa | + | – | + | – | – |
| Coagulasa en porta | + | – | + | – | + |
| Coagulasa en tubo | + | – | – | – | – |
| Fosfatasa alcalina | + | + | + | – | – |
| PYR | – | – | + | + | + |
| ODC | – | V | – | – | + |
| Ureasa | V | + | + | – | V |
| β-galactosidasa | – | – | + | – | – |

^aSímbolos. –: prueba negativa; +: prueba positiva; V: variable. Abreviaturas en el texto.



[View this Article](#) | [Submit to PLOS](#) | [Get E-Mail Alerts](#) | [Contact Us](#)

PLoS One. 2012; 7(7): e40586.

Published online 2012 Jul 11. doi: [10.1371/journal.pone.0040586](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040586)

PMCID: PMC3394727

PMID: [22792377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22792377/)

Staphylococcus aureus Protein A Plays a Critical Role in Mediating Bone Destruction and Bone Loss in Osteomyelitis

[Amro Widaa](#),^{1,2} [Tania Claro](#),¹ [Timothy J. Foster](#),³ [Fergal J. O'Brien](#),^{2,4} and [Steven W. Kerrigan](#)^{1,5,*}

PNAS

Proceedings of the
National Academy of Sciences
of the United States of America

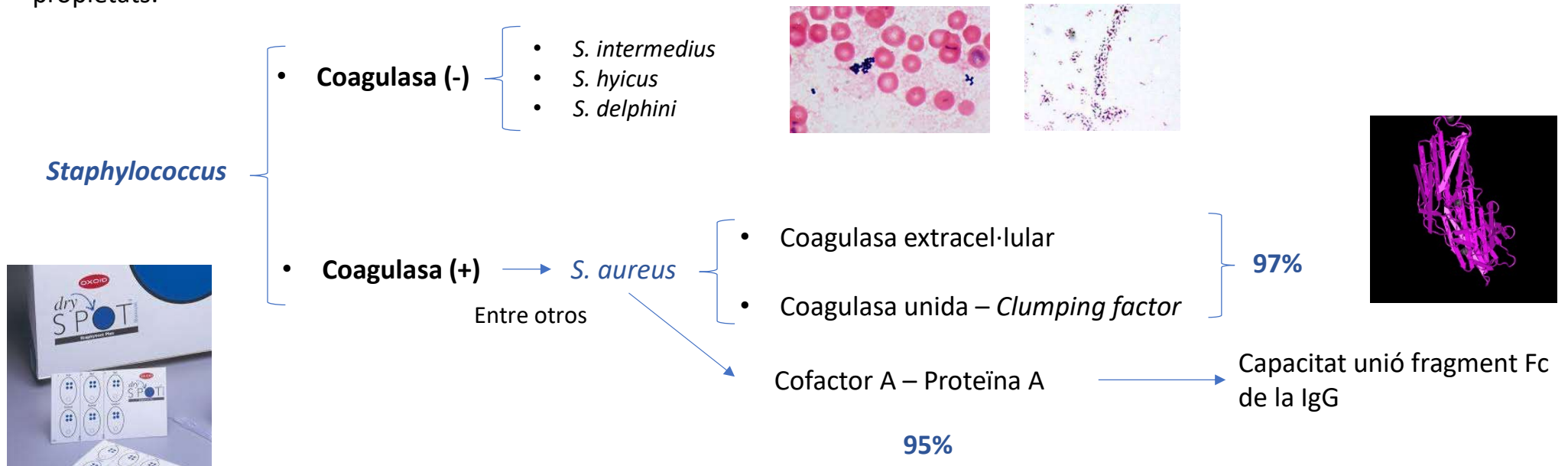
RESEARCH ARTICLE

Staphylococcus aureus clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion



Staphylococcus aureus – Prova de la coagulasa

Dryspot Staphylect Plus és una prova d'aglutinació amb làtex emprada per a la diferenciació de les soques de *Staphylococcus aureus* que posseeixen el factor **d'agregació (clumping factor)**, **proteïna A** i un cert **polisacàrid capsular** trobat en les soques resistents a la meticil·lina o MRSA (de l'anglès *methicillin-resistant S. aureus*), d'aquells que no posseeixen aquestes propietats.



Laboratori de Microbiologia



Staphylococcus aureus – Prova de la coagulasa



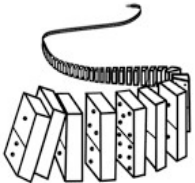
Certes soques de *S. aureus* resistents a la meticil·lina (MRSA) poden expressar quantitats indetectables de factor d'agregació (*clumping factor*) i de proteïna A.



No obstant això, s'ha observat que totes aquestes soques posseeixen **polisacàrid capsular**.



La càpsula pot emmascarar tant la proteïna A com el *clumping factor*, i així obstaculitzar-se l'aglutinació.



Quan el reactiu de la targeta es barreja amb colònies de *S. aureus* emulsionades en solució salina es dóna una aglutinació per reacció entre:

el fibrinogen i el *clumping factor*

el fragment Fc de la IgG i la proteïna A

IgG específica i el polisacàrid capsular



Staphylococcus aureus – Prova de la coagulasa – Dryspot StaphyTECT Plus

partícules blaves de làtex unides a fibrinogen + IgG de conill + anticossos policlonals enfront de polisacàrids capsulars de *S. aureus*

PROCEDURE



1 Remove pouch from box and cut open along the top with scissors.



2 Remove a card and re-seal the pouch with the clip provided.



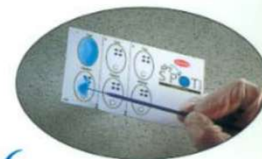
3 Add 1 drop of saline to the small rings in both the test and control reaction areas.



4 Using a sterile loop select 3-5 suspect colonies from culture media plate.



5 Mix the culture sample with the saline drop ensuring that the resulting suspension is smooth.



6 Spread the saline culture mix into the dry latex spots up to the edges of the circle.



7 Rock card for up to 20 seconds and observe for agglutination under normal lighting conditions.



8 On completion of tests dispose of reaction card safely into disinfectant.

Quan el reactiu de la targeta es barreja amb colònies de *S. aureus* emulsionades en solució salina es dona una aglutinació per reacció entre:

el fibrinogen i el *clumping factor*

el fragment Fc de la IgG i la proteïna A

IgG específica i el polisacàrid capsular



Staphylococcus aureus – Prova de la coagulasa

1. Afegiu 1 gota de sèrum fisiològic (0,85%) als cercles menuts de cadascuna de les dues àrees de reacció, prova i control. Comproveu que el líquid no es barrege amb els reactius de làtex dessecats.
2. Utilitzeu una ansa estèril per a recollir l'equivalent de 5 colònies presumptament estafilocòcciques de mida mitjana, obtingudes en una placa de cultiu i emulsioneu-les en la gota de sèrum fisiològic.
3. Amb l'ansa estèril, barregeu la suspensió estenent-la cap a les taques de Làtex Control dessecat, fins que aquest s'haja ressuspès completament i cobrisca tota l'àrea de reacció.
4. Utilitzant una ansa nova, procediu de la mateixa manera amb el Làtex de Prova.
5. Feu girar la targeta a mà durant 20 s i observeu si apareix aglutinació sota condicions normals d'il·luminació. No utilitzeu lents d'augment.
6. Un cop finalitzada la prova, llanceu les targetes de reacció a un recipient amb desinfectant.

Laboratori de Microbiologia



Staphylococcus aureus – Prova de la coagulasa



RESULTADOS

Resultat positiu

Es considera resultat positiu si es produeix l'aglutinació de les partícules de làtex en un màxim de 20 segons. Això indica la presència presumible de *S. aureus*.



Resultat negatiu

Es considera resultat negatiu si no es dona aglutinació i roman una suspensió blava homogènia en les àrees de reacció en un màxim de 20 segons. Això indica que l'aïllament no és, presumiblement, de *S. aureus*.

Resultats ininterpretables

La prova es considera ininterpretable si el reactiu control mostra aglutinació, la qual cosa indica que el cultiu és autoaglutinable.



Resultat equívoc

Una lleugera granulació en el làtex de prova sense canvis en l'aspecte del làtex de control s'interpretarà com un resultat equívoc. Es tornaran a analitzar les soques després del subcultiu en un medi no selectiu.





▪ SESSIÓ XVII. Identificació microbiana mitjançant sistemes miniaturitzats





ACTIVITATS MICROBIANES

IDENTIFICACIÓ – Sistemes multiproves

Existeixen al mercat nombrosos sistemes multiprova per a fer una ràpida identificació bacteriana.

Sistemes miniaturitzats

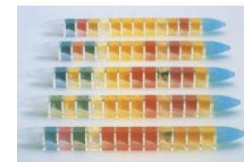
Es tracta de pouets aïllats amb un substrat liofilitzat, que s'han d'inocular amb una suspensió del bacteri problema. Es poden resoldre simultàniament **10 - 50 proves bioquímiques (4-24 h)**.

Cada espècie està definida per un codi numèric, resultat de la codificació del total de proves positives i negatives assajades.

Donat un resultat per a tota la sèrie de proves, se cerca el microorganisme a la base de dades en funció del resultat positiu o negatiu per a cada prova.



**API (bioMérieux), Enterotube (BBL),
Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems i MicroID
(Remel), Biochemical ID systems (Microgen)**





IDENTIFICACIÓ – Sistemes multiproves

ACTIVITATS MICROBIANES

API per a la identificació de gramnegatius

API -20E -18-24 h d'incubació per fer la identificació d'*Enterobacteriaceae* i altres microorganismes Gram (-) de difícils creixement

API Rapid 20E- 4 h per a la identificació d'*Enterobacteriaceae*

API 20NE -24 a 48 h per a la identificació de gramnegatius no-*Enterobacteriaceae*

API NH – 2 h per a la identificació de *Neisseria Haemophilus* i *Branhamella catarrhalis*

API per a la identificació de grampositius

API Staph – Identificació (8 h) de *Staphylococci* i *Micrococci*

RAPIDEC® Staph – 2 h per a la identificació dels més comuns *Staphylococci*

SPI 20 Strep – 4-24 h per a la identificació de *Streptococci* i *Enterococci*

API Coryne -24 h per a la identificació de *Corynebacteria* i organismes semblants.

API per a la identificació de llevats

API 20C AUX – 48 a 72 h per a la identificació de llevats

ID 32C- 24 h per a la identificació de llevats

Altres

API 50 CH – realització de tests per a avaluar el metabolisme dels carbohidrats

API CHL – Identificació de *Lactobacillus*

API CHB – Identificació de *Bacillus*

API ZYM® - Semiquantificació d'activitats enzimàtiques

McFarland Kit – Estàndards corresponents a l'escala 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 McFarland.



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Identificació de microorganismes mitjançant sistemes miniaturitzats – Identificació *Enterobacteriaceae*

Sistema API 20E (Biomerieux)

Conté **20 proves** que es realitzen en una galeria amb 20 pouets que s'inoculen amb una suspensió bacteriana i ofereix resultats després de **24 h d'incubació a 35-37 °C**.

Aquest sistema permet la identificació ràpida de bacteris **gramnegatius, fermentadors de glucosa** (presumptes enterobacteris) d'interès sanitari, incloent-hi *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* i *Yersinia*.





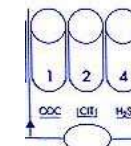
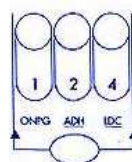
ACTIVITATS MICROBIANES

IDENTIFICACIÓ – API20E

| Pueba | Reacció / Enzimas | Negativo | Positivo |
|------------------|--|-----------------------|------------------------|
| ONPG | beta-galactosidasa | sin color | amarillo |
| ADH | arginina deshidrolasa | amarillo | rojo o naranja |
| LDC | lisina descarboxilasa | amarillo | rojo o naranja |
| ODC | ornitina descarboxilasa | amarillo | rojo o naranja |
| CIT | utilización del citrato | verde | azul oscuro o turquesa |
| H ₂ S | producción de H ₂ S | sin precipitado negro | precipitado negro |
| URE | ureasa | amarillo | rojo o naranja |
| TDA | triptófano desaminasa | amarillo | marrón-rojo |
| IND | producción de indol | amarillo | anillo rojo |
| VP | producción de acetoina (Voges-Proskauer) | sin color | rojo |
| GEL | gelatinasa | sin difusión | difusión de pigmento |
| GLU | fermentación/oxidación de glucosa | azul o verde | amarillo |
| MAN | fermentación/oxidación de manitol | azul o verde | amarillo |
| INO | fermentación/oxidación de inositol | azul o verde | amarillo |
| SOR | fermentación/oxidación de sorbitol | azul o verde | amarillo |
| RHA | fermentación/oxidación de ramnosa | azul o verde | amarillo |
| SAC | fermentación/oxidación de sacarosa | azul o verde | amarillo |
| MEL | fermentación/oxidación de melobiosa | azul o verde | amarillo |
| AMY | fermentación/oxidación de amigdalina | azul o verde | amarillo |
| ARA | fermentación/oxidación de arabinosa | azul o verde | amarillo |
| OX | citocromo oxidasa | | |

| | ONPG | ADH | LDC | ODC | [CIT] | H ₂ S | URE | TDA | IND | VP | [GEL] | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|-------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Negativo | White | Yellow | Yellow | Yellow | Green | White | White | White | White | White | White | Blue | Blue | Blue | Blue | Blue | Blue | Blue | Blue | Blue | Blue | White |
| Positivo | Yellow | Red | Red | Red | Blue | Black | Red | Red | Red | Red | Black | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | White |

https://www.youtube.com/watch?v=ew3amo02_b0





IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

| POCILLO | PRUEBA | ACTIVIDAD | POSITIVO | NEGATIVO |
|---------|------------------|--|----------|----------|
| 1 | ONPG | β -galactosidasa | ● ● | ○ |
| 2 | ADH | Arginina dihidrolasa | | |
| 3 | LDC | Lisina descarboxilasa | ● | ○ ● |
| 4 | ODC | Ornitina descarboxilasa | | |
| 5 | CIT | Citrato, utilización | ● ● | ● |
| 6 | H ₂ S | H ₂ S, producció a partir de tiosulfato | ● | ● |
| 7 | URE | Urea, hidròlisis | ● | ● |
| 8 | TDA | Triptòfano desaminasa | ● ● | ● |
| 9 | IND | Indol, producció a partir de triptòfano | ● | ● |
| 10 | VP | Voges-Proskauer | ● ● | ● |
| 11 | GEL | Hidròlisis de gelatina | ● | ● |
| 12 | GLU | Glucosa, fermentació. | | |
| 13 | MAN | Manitol, - | | |
| 14 | INO | Inositol, - | | |
| 15 | SOR | Sorbitol, - | | |
| 16 | RHA | Ramnosa, - | ● | ● |
| 17 | SAC | Sacarosa, - | | ● |
| 18 | MEL | Melibiosa, - | | ● |
| 19 | AMY | Amigdalina, - | | ● |
| 20 | ARA | Arabinosa, - | | ● |

- És l'enzim que hidrolitza el disacàrid lactosa en glucosa i galactosa.
 - Actuen sobre els aminoàcids descarboxilant i convertint-los en diamines.
 - L'ús de citrat com a única font de carboni i energia.
 - La producció de H₂S es detecta per la formació de S₂Fe, negre.
 - L'enzim ureasa hidrolitza la urea i forma CO₂ i NH₄
 - Aquest enzim desamina el triptòfan i produeix àcid fenilpirúvic.
 - Mitjançant la triptofanasa, el triptòfan és degradat i es forma indol com a residu.
 - Permet detectar la formació de butanodiol en la fermentació de la glucosa.
 - La hidròlisi d'aquesta proteïna provoca la dispersió de la pols de carbó per tot el pouet, el qual s'ennegreix.
- En aquests pouets es pot observar l'acidificació que es produeix quan els carbohidrats que contenen són fermentats i l'indicador vira a groc.

Laboratori de Microbiologia



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES – Pràctica 10

Codificació numèrica dels resultats

- Prova negativa → **0 punts**
- Primera prova del triopositiva → **1 punt**
- Segona prova del triopositiva → **2 punts**
- Tercera prova del triopositiva → **4 punts**



A continuació se sumen els punts de cada tríada de proves i s'obté un nombre de 7 xifres que serà el codi per a buscar la identificació que corresponga a la soca en la base de dades. L'últim valor ha de ser el de la prova de l'oxidasa.

| ONP | AD | LD | OD | CIT | H2 | UR | TD | IN | VP | GE | GI | MA | INO | SO | RH | SA | ME |
|-----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|
| + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - | + | - |
| 1 | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 |
| 7 | | | 0 | | | 0 | | | 6 | | | 5 | | | 2 | | |

El nombre que cercarem a la base de dades serà: 7006520



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Procediment

1. Obriu un ampolla de solució salina i ressuspeneu-hi una **colònia aïllada** del bacteri o una petita quantitat de **biomassa** d'un cultiu pur massiu.
2. **Homogeneïtzau** la suspensió i ajusteu la terbolesa a 0,5 en l'escala de McFarland.
3. Tragueu una galeria del seu envàs i deixeu que es **tempere**. Poseu aigua destil·lada en els vasos de l'envàs transparent que contindrà la galeria durant la incubació.
4. **Retoleu** amb la notació de la mostra.
5. **Inoculeu** cada pouet amb la suspensió bacteriana seguint les indicacions: tub i cúpula per a reaccions aeròbiques (nom enquadrat), només tub per a la resta.
6. Afegiu **vaselina** estèril als pouets de reaccions anaeròbiques (noms subratllats).
7. Cobriu la placa amb la seua tapadora i dueu a **incubar** a 35-37 °C, 18- 24 h.
8. Després de la incubació, afegiu:
 - 1 gota d' α -naftol i 1 gota de KOH al 40% en pouet **VP** i espereu 15 minuts;
 - 2 gotes de reactiu de Kovac per l'indole al pouet **IND**;
 - 2 gotes de solució de Cl_3Fe al 10% en solució aquosa al pouet **TDA**.
9. Anoteu els **canvis de color** en tots els pous i ompliu el **full de resultats**.
10. **Codifiqueu** els resultats numèricament i busqueu el codi resultant en la base de dades.



| Nº TUBO | UFC | ABSORBANCIA |
|---------|------------------|-------------|
| 0 | 0 | 0 |
| 0,5 | $1,5 \cdot 10^8$ | 0,074 |
| 3 | $9 \cdot 10^8$ | 0,846 |
| 5 | $15 \cdot 10^8$ | 1,040 |
| 6 | $18 \cdot 10^8$ | 1,272 |



IDENTIFICACIÓ – API20E

RESULTATS POSITIUS



RESULTATS NEGATIUS



| Pueba | Reacció / Enzimas | Negativo | Positivo |
|-------|--|-----------------------|------------------------|
| ONPG | beta-galactosidasa | sin color | amarillo |
| ADH | arginina deshidrolasa | amarillo | rojo o naranja |
| LDC | lisina descarboxilasa | amarillo | rojo o naranja |
| ODC | ornitina descarboxilasa | amarillo | rojo o naranja |
| CIT | utilización del citrato | verde | azul oscuro o turquesa |
| H2S | producción de H ₂ S | sin precipitado negro | precipitado negro |
| URE | ureasa | amarillo | rojo o naranja |
| TDA | triptófano desaminasa | amarillo | marrón-rojo |
| IND | producción de indol | amarillo | anillo rojo |
| VP | producción de acetoína (Voges-Proskauer) | sin color | rojo |
| GEL | gelatinasa | sin difusión | difusión de pigmento |
| GLU | fermentación/oxidación de glucosa | azul o verde | amarillo |
| MAN | fermentación/oxidación de manitol | azul o verde | amarillo |
| INO | fermentación/oxidación de inositol | azul o verde | amarillo |
| SOR | fermentación/oxidación de sorbitol | azul o verde | amarillo |
| RHA | fermentación/oxidación de ramnosa | azul o verde | amarillo |
| SAC | fermentación/oxidación de sacarosa | azul o verde | amarillo |
| MEL | fermentación/oxidación de melobiosa | azul o verde | amarillo |
| AMY | fermentación/oxidación de amigdalina | azul o verde | amarillo |
| ARA | fermentación/oxidación de arabinosa | azul o verde | amarillo |
| OX | citocromo oxidasa | | |



IDENTIFICACIÓ – API20E

TIRA API 20E *Escherichia coli*



Escherichia coli



+ + + + - - - - - - - + + - + + + + - +

RESULTATS POSITIUS



API 20 E V5.0 [Instrucciones](#) [Chequear colores](#) [Reinicializar](#)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|-----|-----|------|------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | + | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX |
| 7 | | | 1 | | | 0 | | | 4 | | 5 | | | 7 | | | | 2 | | |
| + | - | + | + | + | + | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₂ | N ₂ | MOB | McC | OF-O | OF-F | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

[Validar](#)



IDENTIFICACIÓ – API20E

TIRA API 20E *Klebsiella*



Klebsiella pneumoniae



RESULTATS POSITIVS



API 20 E V5.0 [Instrucciones](#) [Chequear colores](#) Reinicializar

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|----------------|---|---|-----|---|---|-----|---|---|------|---|---|------------------|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|----|---|---|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|-----|--|--|----|--|--|
| + | | | - | | | + | | | - | | | - | | | + | | | + | | | + | | | + | | | + | | | + | | | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ONPG | | | ADH | | | LDC | | | ODC | | | CIT | | | H ₂ S | | | URE | | | TDA | | | IND | | | VP | | | GEL | | | GLU | | | MAN | | | INO | | | SOR | | | RHA | | | SAC | | | MEL | | | AMY | | | ARA | | | OX | | |
| 5 | | | 2 | | | 1 | | | 5 | | | 7 | | | 7 | | | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | | | - | | | + | | | + | | | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | 2 | | | 4 | | | 1 | | | 2 | | | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₂ | | | N ₂ | | | MOB | | | McC | | | OF-O | | | OF-F | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Validar



IDENTIFICACIÓ – API20E

TIRA API 20E *Salmonella*



Salmonella



RESULTATS POSITIUS





IDENTIFICACIÓ – API20E

TIRA API 20E Enterobacter AL-4



Enterobacter cloacae



RESULTATS POSITIVS



API 20 E V5.0 [Instrucciones](#) [Chequear colores](#) [Reinicializar](#)

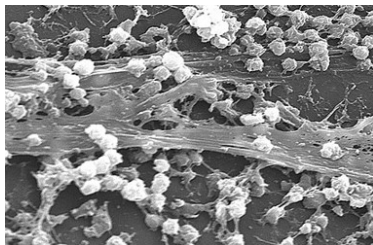
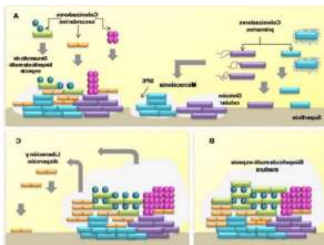
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| + | + | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX |
| 3 | 3 | 3 | 0 | 5 | 5 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |

| | | | | | | |
|-----------------|----------------|-----|-----|------|------|---|
| + | - | + | + | + | + | + |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| NO ₂ | N ₂ | MOB | McC | OF-O | OF-F | |
| 5 | 5 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |

[Validar](#)



■ SESSIÓ XVIII. Formació de biofilms





BIOFILMS

- ❖ Importància de la formació de biofilms en l'àmbit industrial i clínic
→ **CONTAMINACIÓ de superfícies, equipament, i material**
- ❖ EPS – Matriu polimèrica que protegeix les cèl·lules individuals enfront dels tractaments antimicrobians, prevenint la difusió i la penetració de les molècules amb capacitat bactericida.
- *Quorum sensing* -> Interacció i comunicació entre els microorganismes
- Desencadenat d'acord amb condicions ambientals determinades
- ❖ Diferències amb els organismes lliures, no formants de BIOFILMS
→ **Incrementada resistència i virulència**

COMPOSICIÓ:

1. Masa cel·lular (elevada densitat; una o diverses espècies microbianes)
2. Espais intercel·lulars o canals
3. Matriu EXOPOLISACÀRIDS, proteïnes, àcids nucleics i altres substàncies



Concentració de nutrients
Protecció contra agents antimicrobians

[Sci Rep. 2017; 7: 15948.](#)

Published online 2017 Nov 21. doi: [10.1038/s41598-017-15769-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-15769-9)

Rapid *in situ* imaging and whole genome sequencing of biofilm in neonatal feeding tubes: A clinical proof of concept

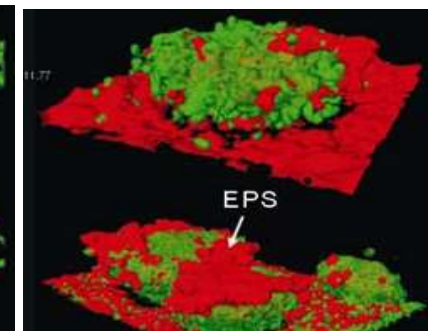
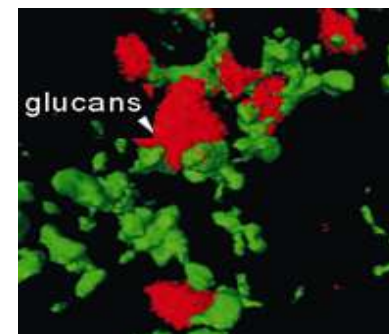
Pauline Ogrodzki, Chi Shing Cheung, Mohamed Saad, Khaled Dahmani, Rebecca Coxill, Haida Liang, and Stephen J. Forsythe

Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and Its Involvement for Antibiotic Resistance

Some studies demonstrated that this microorganism has biofilm forming ability in the environment and on human gastric mucosa epithelium as well as on *in vitro* abiotic surfaces.

In the human

stomach, *H. pylori* forms biofilms on the surface of gastric mucosa, suggesting one possible explanation for eradication therapy failure.





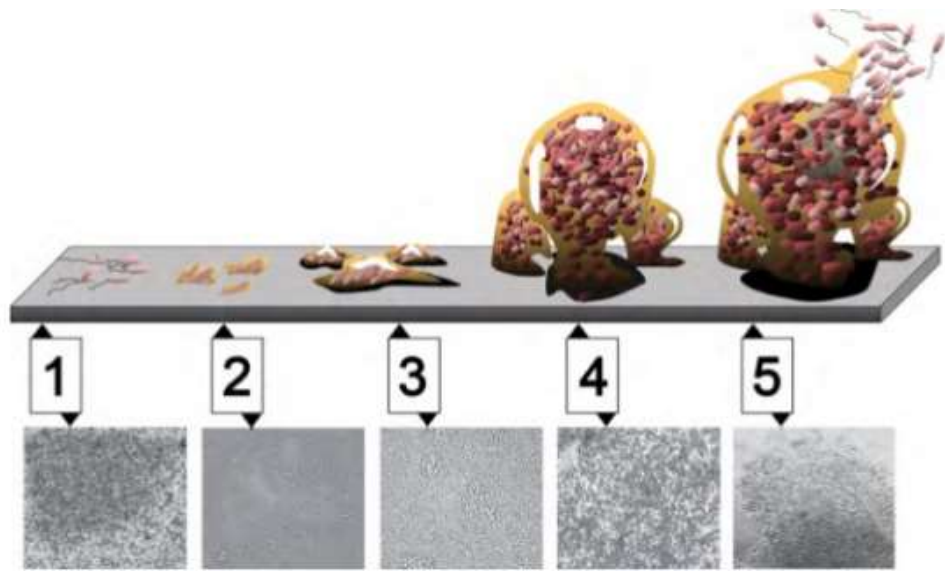
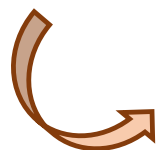
BIOFILMS

Formació de biofilms: 5 etapes

1. Microorganismes en estat lliure "planctònic" s'adhereixen a la superfície



2. Adhesió profunda a les superfícies mitjançant estructures específiques



3. Comunicació entre cèl·lules que inicien la proliferació i producció d'EPS



4. El biofilm **ESTÀ FORMAT** i protegeix la comunitat d'agents externs



5. Alliberament de cèl·lules per formar i establir altres biofilms



BIOFILMS

Procediment experimental

1. Cultiveu en medi LB durant 24 h

- | | | |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1. <i>E. coli</i> | 4. <i>Klebsiella</i> | 7. <i>Micrococcus</i> |
| 2. <i>Salmonella sp.</i> | 5. <i>Pseudomonas</i> | 8. <i>Bacillus sp.</i> |
| 3. <i>Proteus</i> | 6. <i>S. aureus</i> | |

2. Diluïu en medi estèril 1:100 cada suspensió microbiana preparada prèviament.

3. Inoculeu per triplicat 100 µl del microorganisme en pouets de plaques de 96.

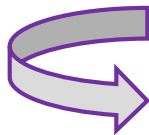
4. Incubeu 28 °C durant 48 h.

5. Transcorregut el temps d'incubació, afegiu 25µl d'una solució **VIOLETA CRISTALL** al 1% (v/v) a cada pouet.

6. La barreja s'ha d'incubar durante 30 minuts.

7. Llavar les plaques amb solució **salina estèril**, diverses vegades, per tal d'eliminar les cèl·lules no adherides.

8. Per observar el desenvolupament d'un biofilm, adherit a les parets de cada pouet de la placa, s'**EXTRAU el violeta cristall retingut pel biofilm**.



200 µl d'etanol 95% (durant 30 minuts en agitació suau)

Determinació espectrofotomètrica Abs 575, lector Microplaques ELISA.

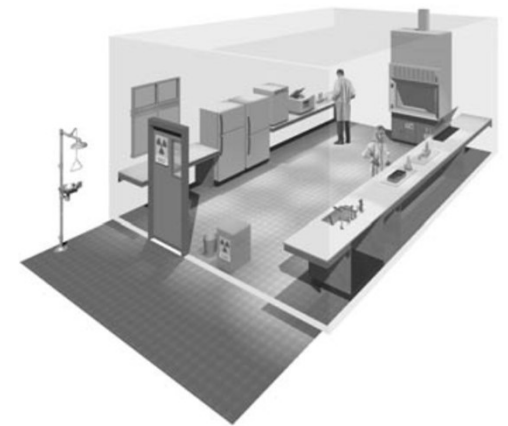


Figura 1. Ensayo in vitro para la detección de biofilm en placa de poliestireno.



▪ SESSIÓ XIX. Nivells de BIOSEGURETAT al laboratori de microbiologia

Bio 
Seguridad





IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

La classificació d'un microorganisme en un grup de risc ha de tenir en compte els factors següents:

1. La **patogènia** del microorganisme;
2. La **manera de transmissió i la gamma d'hostes del microorganisme**. Pot dependre de:
 - nivells d'immunitat existents en la població local
 - la densitat i els moviments de la població d'hostes
 - la presència de vectors apropiats
 - el nivell d'higiene ambiental
3. La disponibilitat local de **mesures preventives eficaces**, entre les quals cal citar la profilaxi mitjançant l'administració d'antisèrums (immunització passiva) o vacunes; les mesures d'higiene (higiene dels aliments i de l'aigua, per exemple), i la lluita contra els reservoris animals o els artròpodes vectors.
4. La disponibilitat local de **tractaments eficaços**, que comprèn la immunització passiva, la vacunació postexposició i l'administració d'antimicrobians, antivírics i quimioteràpia, i ha de tenir en compte la possibilitat que apareguen soques farmacoresistents.





GRUPS DE RISC I MESURES DE PREVENCIÓ

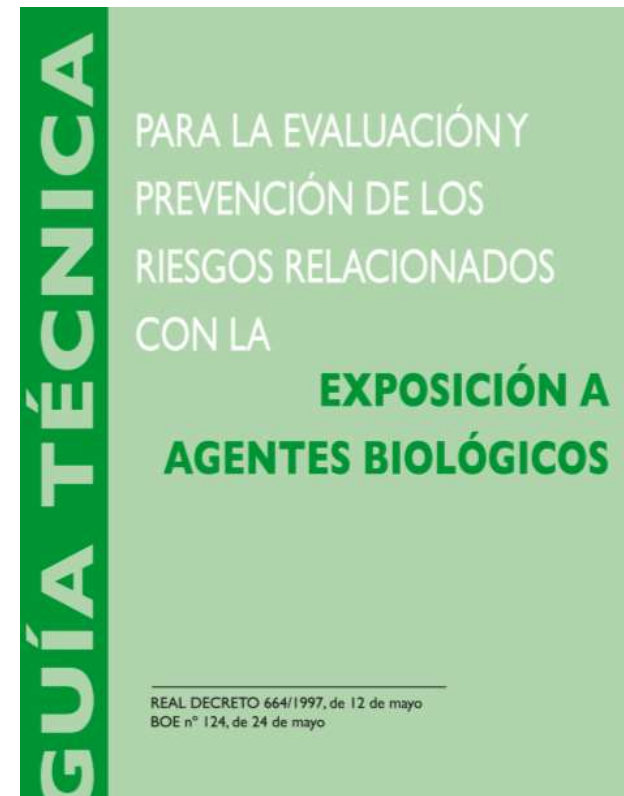
Institut Nacional de Seguretat i Salut al Treball (INNST)

Reial decret 664/1997 BOE núm. 124, 24 de maig

NOTA TÈCNICA 376: Exposició a agents biològics



NTP 376: Exposición a agentes biológicos: seguridad y buenas prácticas de laboratorio





RISCOS BIOLÒGICS

Perquè es produísca malaltia, han de donar-se simultàniament els factors següents:

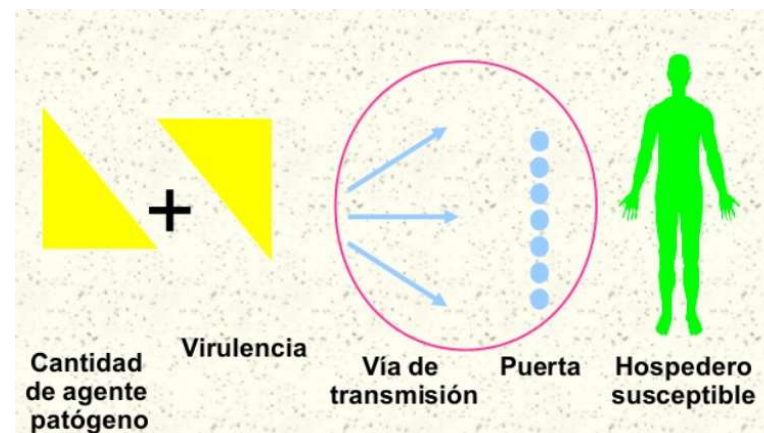
1. Presència del factor infecció

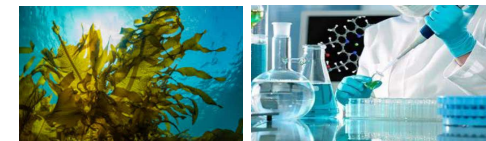
2. Via de transmissió adequada

- respiratòria
- dèrmica
- parenteral
- digestiva

3. Presència d'un hoste susceptible

4. Concentració suficient de l'agent infecció





IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Les designacions del nivell de bioseguretat es fonamenten en una **combinació** de les característiques de disseny, construcció, mitjans de contenció, equip, pràctiques i procediments d'operació necessaris per a treballar amb agents patògens dels diferents grups de risc.



Cuadro 2. Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo

| GRUPO DE RIESGO | NIVEL DE BIOSEGURIDAD | TIPO DE LABORATORIO | PRÁCTICAS DE LABORATORIO | EQUIPO DE SEGURIDAD |
|-----------------|---------------------------|--|--|---|
| 1 | Básico Nivel 1 | Enseñanza básica, investigación | TMA | Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto |
| 2 | Básico Nivel 2 | Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación | TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico | Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles |
| 3 | Contención Nivel 3 | Diagnóstico especial, investigación | Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire | CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades |
| 4 | Contención máxima Nivel 4 | Unidades de patógenos peligrosos | Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos | CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado |

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas (Véase la parte IV del presente manual). CSB: cámara de seguridad biológica.



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

L'assignació d'un agent a un nivell de bioseguretat per al treball de laboratori ha de basar-se en una **avaluació del risc**.

El nivell de bioseguretat dependrà del judici professional basat en l'avaluació del risc, i **no en l'assignació automàtica** d'un nivell de bioseguretat corresponent al grup de risc al qual pertanga l'agent patogen.

EXEMPLE: un agent patogen assignat al GR 2 en general requerirà instal·lacions, equip, pràctiques i procediments del nivell de bioseguretat 2 per a treballar sense risc. Però si certs experiments comporten la generació d'aerosols amb elevades concentracions, potser és més apropiat el nivell de bioseguretat 3 per a proporcionar el grau necessari de seguretat.

Cuadro 3. Resumen de los requisitos por nivel de bioseguridad

| | NIVEL DE BIOSEGURIDAD | | | |
|---|-----------------------|-------------|--------------------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Aislamiento ^a del laboratorio | No | No | Sí | Sí |
| Sala que pueda precintarse para ser descontaminada | No | No | Sí | Sí |
| Ventilación: | | | | |
| — Flujo de aire hacia el interior | No | Conveniente | Sí | Sí |
| — Sistema de ventilación controlada | No | Conveniente | Sí | Sí |
| — Salida de aire con HEPA | No | No | Sí/No ^b | Sí |
| Entrada de doble puerta | No | No | Sí | Sí |
| Cámara de cierre hermético | No | No | No | Sí |
| Cámara de cierre hermético con ducha | No | No | No | Sí |
| Antesala | No | No | Sí | — |
| Antesala con ducha | No | No | Sí/No ^c | No |
| Tratamiento de efluentes | No | No | Sí/No ^c | Sí |
| Autoclave: | | | | |
| — En el local | No | Conveniente | Sí | Sí |
| — En la sala de trabajo | No | No | Conveniente | Sí |
| — De doble puerta | No | No | Conveniente | Sí |
| CSB | No | Conveniente | Sí | Sí |
| Capacidad de vigilancia de la seguridad del personal ^d | No | No | Conveniente | Sí |

^a Aislamiento ambiental y funcional respecto del tráfico general.

^b Según la localización de la salida de aire (véase el capítulo 4).

^c Según cuáles sean los agentes empleados en el laboratorio.

^d Por ejemplo, ventana, sistema de televisión en circuito cerrado, comunicación en dos sentidos.

HEPA: filtración de partículas aéreas de gran eficiencia (del inglés *High-Efficiency Particulate Air*). CSB: cámara de seguridad biológica.



Operacions que produeixen un augment del risc biològic

TRANSPORT DE MATERIAL BIOLÒGIC

Intern:

- Caiguda i trencament de contenidors, flascons, vials, etc.
- Vessaments, esquitxades, aerosols.

Extern:

- Inexistència de sistemes de concentració.
- Implicació de terceres persones i medi ambient.



INFECCIÓ EXPERIMENTAL: Recollida de mostres clíniques, sacrifici d'animals, biòpsies i necròpsies.

- Recollida de mostres de fluids, excrements, i teixits corporals.
- Operacions que impliquen la utilització de material de tall i punxant.
- Proximitat a l'individu malalt (exposició a aerosols, contacte amb la pell directe i amb fluids corporals, i vísceres).

Laboratori de Microbiologia



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Accés

Laboratoris de nivell de bioseguretat 1 i 2

1. El símbol i signe internacional de perill biològic haurà de col·locar-se a les portes dels locals on es manipulen microorganismes del grup de risc 2 o superior.
2. Només podrà entrar en les zones de treball del laboratori el personal autoritzat.
3. Les portes del laboratori es mantindran tancades.

Protecció personal

1. S'empraran en tot moment bates o uniformes especials per al treball al laboratori.
2. S'empraran guants protectors apropiats. Una vegada utilitzats, els guants es retiraran de manera asèptica i a continuació es llavaran les mans.
3. Estarà prohibit usar les peces protectores fora del laboratori.
4. A les zones de treball estarà prohibit menjar, beure, fumar, aplicar cosmètics o manipular lents de contacte.
5. La roba protectora de laboratori no es guardarà als mateixos armaris o armariets que la roba de carrer.



PELIGRO BIOLÓGICO

ACCESO RESTRINGIDO.
SÓLO PERSONAL AUTORIZADO

Nivel de bioseguridad: _____

Investigador encargado: _____

En caso de emergencia, avísese a: _____

Teléfono diurno: _____

Teléfono particular: _____

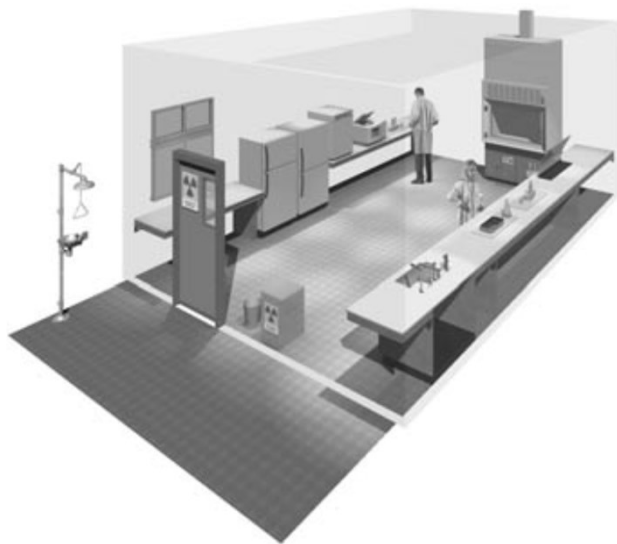
Las autorizaciones de entrada deberán solicitarse al
investigador encargado mencionado más arriba



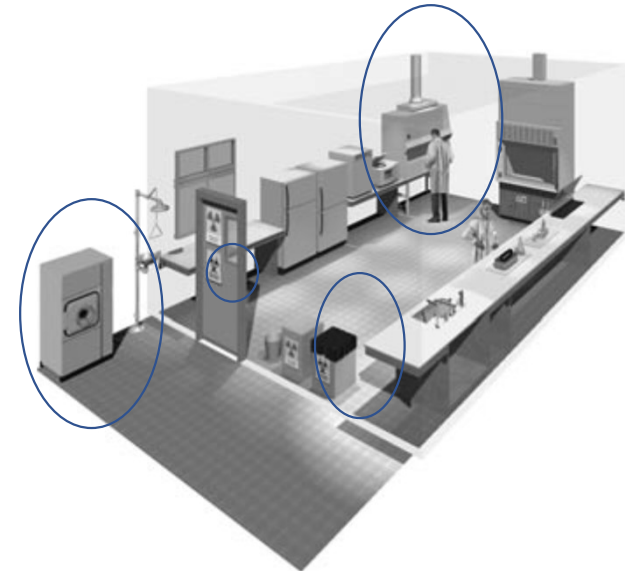
IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Disseny

Laboratorios de nivell de bioseguretat 1 i 2



Laboratori típic del nivell de bioseguretat 1



Laboratori típic del nivell de bioseguretat 2



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Laboratoris de contenció - nivell de bioseguretat 3

El laboratori de contenció - nivell de bioseguretat 3 està concebut per a treballar amb microorganismes del **GR 3**, així com amb grans volums o concentracions de microorganismes del **GR 2**, pel fet que comporta un major risc de difusió d'aerosols.

Aquest nivell de contenció exigeix enfortir els programes de treball i de seguretat corresponents als laboratoris bàsics.

Codi de pràctiques

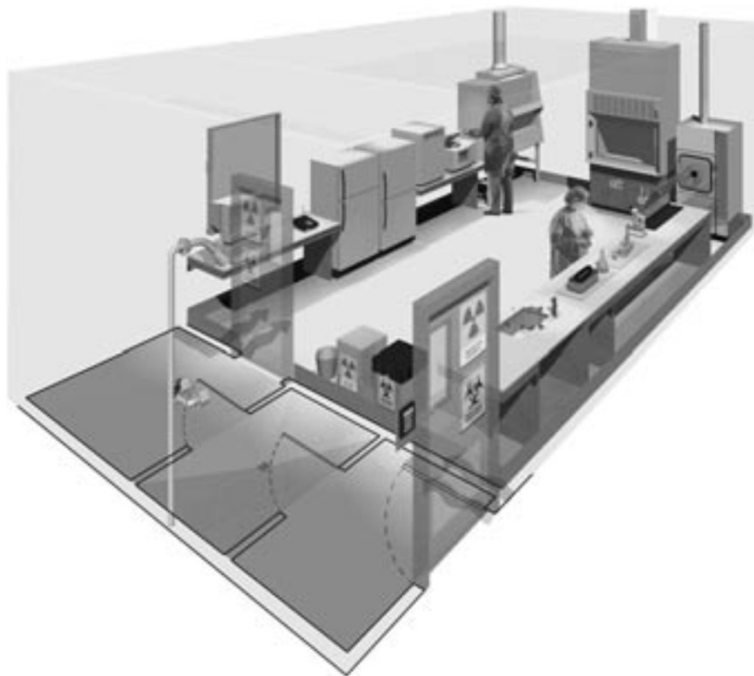
1. El símbol i signe internacional d'advertència de perill biològic exposat a les portes d'accés al laboratori ha d'especificar el nivell de bioseguretat i el nom del supervisor del laboratori que controla l'accés a aquest, així com també indicar qualsevol condició especial d'entrada en la zona, com pot ser la immunització.
2. Al laboratori s'ha de portar roba protectora apropiada (bates sense obertura davantera, vestits de dues peces de tipus pijama, granotes, casquets i, si correspon, protecció per al calçat o calçat especial). La roba de laboratori no ha d'usar-se fora d'aquest i ha de descontaminar-se.
3. Tota manipulació oberta de material potencialment infecciosos ha de realitzar-se dins d'una CSB o altre dispositiu de contenció primària.



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Disseny

Laboratoris de contenció - nivell de bioseguretat 3



Laboratori típic del nivell de bioseguretat 3

El laboratori està separat de la circulació general i té accés per un vestíbul o una cambra de tancament hermètic.

Dins de la sala es disposa d'una autoclau per a la descontaminació de residus abans d'eliminar-los.

Hi ha també un lavabo amb aixeta que pot accionar-se sense usar les mans.

El corrent d'aire circula cap a l'interior i tota la feina amb material infecciosos s'efectua en una cambra de seguretat biològica.



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Laboratoris de contenció màxima- **nivell de bioseguretat 4**

El laboratori de contenció màxima – nivell de bioseguretat 4 està concebut per a treballar amb microorganismes del **GR 4**.

Els laboratoris de contenció màxima - nivell de bioseguretat 4 en funcionament han d'estar sotmesos al **control de les autoritats sanitàries nacionals** o altres apropiades.

Codi de pràctiques

1. Cal aplicar la regla de la feina feta per dues persones, en virtut de la qual cap persona ha de treballar sola a l'interior del laboratori.
2. En entrar i en eixir del laboratori és imprescindible un canvi complet de roba i calçat.
3. El personal ha de rebre capacitació en procediments d'evacuació d'emergència en cas que un membre del personal patisca lesions o caiga malalt.
4. Ha d'establir-se un mètode de comunicació entre el personal que treballa dins del laboratori del nivell de bioseguretat 4 i el personal de suport que es troba fora del laboratori.



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Cambrà de seguretat biològica (CSB)

Les CSB estan dissenyades per a protegir el treballador, l'ambient del laboratori i els materials de treball de l'exposició a les esquitxades i els aerosols infecciosos que poden generar-se en manipular material que conté agents infecciosos, com ara cultius primaris, solucions mare i mostres de diagnòstic.



Cuadro 8. Selección de una cámara de seguridad biológica (CSB) según el tipo de protección necesaria

| TIPO DE PROTECCIÓN | SELECCIÓN DE LA CSB |
|---|--|
| Protección personal, microorganismos de los grupos de riesgo 1 a 3 | Clase I, clase II, clase III |
| Protección personal, microorganismos del grupo de riesgo 4, laboratorio para trabajar con cámara de guantes | Clase III |
| Protección personal, microorganismos del grupo de riesgo 4, laboratorio para trabajar con trajes especiales | Clase I, clase II |
| Protección del producto | Clase II, clase III sólo si incluye flujo laminar |
| Protección contra cantidades mínimas de sustancias químicas/ radionúclidos volátiles | Clase IIB1, clase IIA2 ventilada hacia el exterior |
| Protección contra sustancias químicas/ radionúclidos volátiles | Clase I, clase IIB2, clase III |

Laboratori de Microbiologia



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

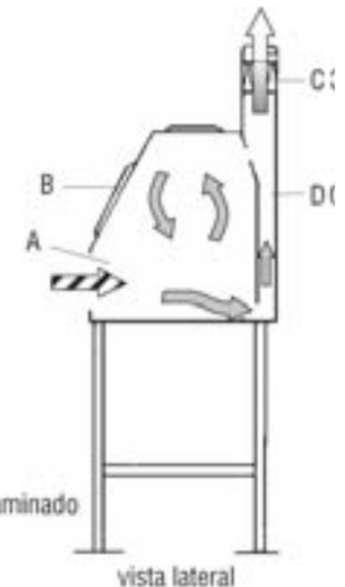
Cambra de seguretat biològica (CSB)-Clase I

La **CSB de classe I** va ser la primera CSB reconeguda, i a causa de la simplicitat del seu disseny continua tenint un ús molt estès a tot el món.

PROTECCIÓ AMBIENTAL

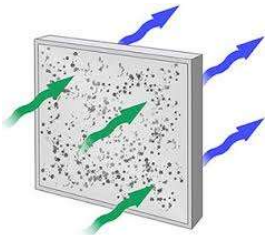
PROTECCIÓ PERSONAL

PROTECCIÓ PRODUCTE



L'aire procedent de la cambra s'evacua a través d'un **filtre HEPA**:

- al laboratori i a continuació a l'exterior de l'edifici a través del sistema d'evacuació d'aire de l'edifici;
- a l'exterior a través del sistema d'evacuació d'aire de l'edifici; o
- directament a l'exterior.



Els **filtres HEPA** retenen el 99,97% de les partícules de 0,3mm de diàmetre i el 99,99% de les partícules de grandària major o menor; això els permet retenir eficaçment tots els agents infecciosos coneguts i garantir que de la cambra només ix aire exempt de microorganismes.



IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Cambra de seguretat biològica (CSB)-Clase II

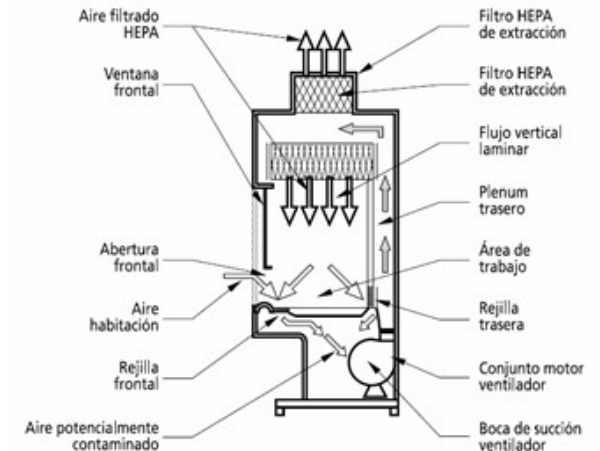
Les **CSB de classe II**, de les quals hi ha quatre tipus (A1, A2, B1 i B2), difereixen de les CSB de classe I en el fet que només permeten que entre en contacte amb la superfície de treball, aire que ha passat per un filtre HEPA (aire estèril).

Les CSB de classe II poden utilitzar-se per a treballar amb agents infecciosos dels grups de risc 2 i 3, i també amb agents infecciosos del grup de risc 4, sempre que s'utilitzen vestits pressuritzats.

Classe II tipus A1

Un ventilador intern succiona aire de la sala (aire d'entrada) cap a la cambra a través de l'obertura frontal i el dirigeix cap a la reixeta frontal d'entrada.

Aqueix aire passa a continuació per un filtre HEPA abans de dirigir-se, descendint verticalment, cap a la superfície de treball.





IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

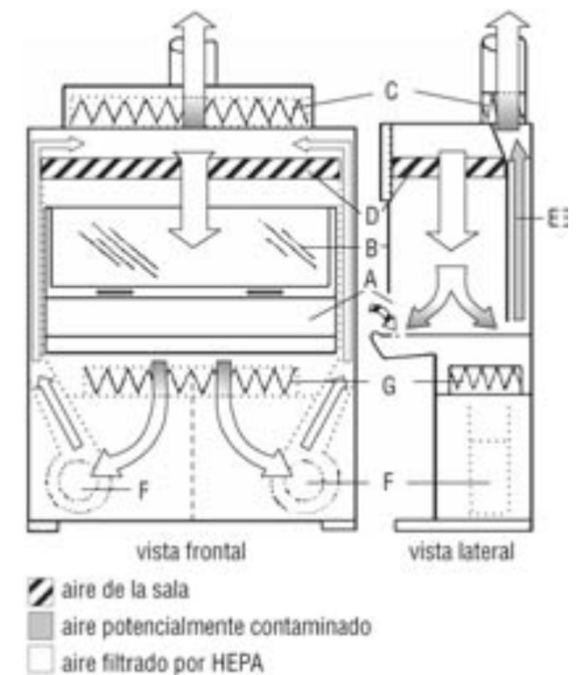
Cambra de seguretat biològica (CSB)-Clase II

Clase II de tipus A2 amb eixida a l'exterior, i de tipus B1 i B2

Són variacions del tipus II A1. Cadascuna d'aqueixes variacions permet utilitzar la *CSB per a finalitats específiques.

Aquestes *CSB es distingeixen entre si en diversos aspectes:

- la velocitat d'entrada de l'aire per l'obertura frontal;
- la quantitat d'aire que es torna a fer passar per la superfície de treball i que ix de la cambra;
- el sistema d'extracció d'aire, que determina si l'aire s'evacua cap a la sala o a l'exterior pel seu propi sistema d'evacuació o pel sistema d'evacuació d'aire de l'edifici;
- les pressions a l'interior de la cambra.



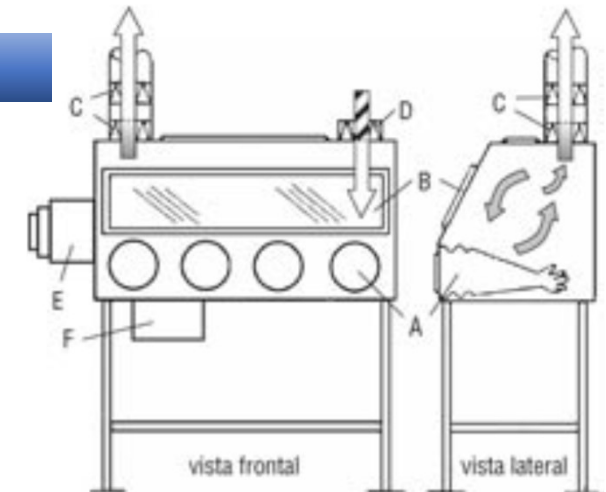


IDENTIFICACIÓ DE MICRORGANISMES

Cambrà de seguretat biològica (CSB)-Clase III

Aquest tipus de cambres és el que proporciona major nivell de protecció personal i s'utilitza per a treballar amb agents del GR 4. Es caracteritza per:

- Tots els **orificis estan segellats** per a impedir el pas de gasos.
- L'aire d'entrada és filtrat per HEPA i l'aire d'eixida passa per dos filtres HEPA.
- El corrent d'aire es manté mitjançant un sistema d'extracció propi en l'exterior de la cambra, que manté l'interior d'aquesta a una **pressió negativa**.
- L'accés a la superfície de treball es fa mitjançant **guants de goma gruixuda**, connectats a uns orificis en la cambra.
- La cambra ha de tenir una caixa de pas que pugui esterilitzar-se i vaja equipada amb una eixida d'aire proveïda d'un filtre HEPA.
- Pot anar connectada a una autoclau de doble porta en la qual es descontaminarà tot el material que entre o isca de la cambra.



- ▨ aire de la sala
- aire potencialment contaminat
- aire filtrat per HEPA

A: orificis per a guants; **B:** finestra; **C:** dobles filtres HEPA d'eixida; **D:** filtre HEPA d'entrada; **E:** autoclau de doble porta o caixa de pas; **F:** tanc d'immersió química.



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

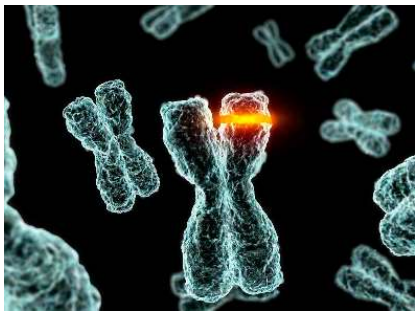


Laboratori de Microbiologia

Curs acadèmic 2019-2020

Departament de Microbiologia i Ecologia

Facultat de Ciències Biològiques



Prof. Dr. María Consuelo Pina Pérez
e-mail: maria.c.pina@uv.es