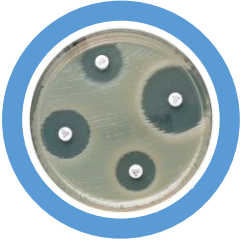
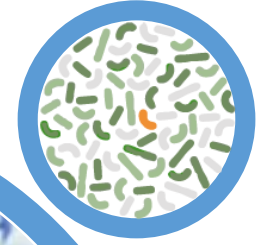


UD5. PRuebas de identificación E ANTIBIOGRAMAS



CONTIDOS



1

PROBAS BIOQUÍMICAS



2

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

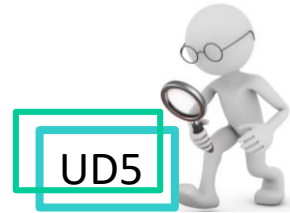


3

PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

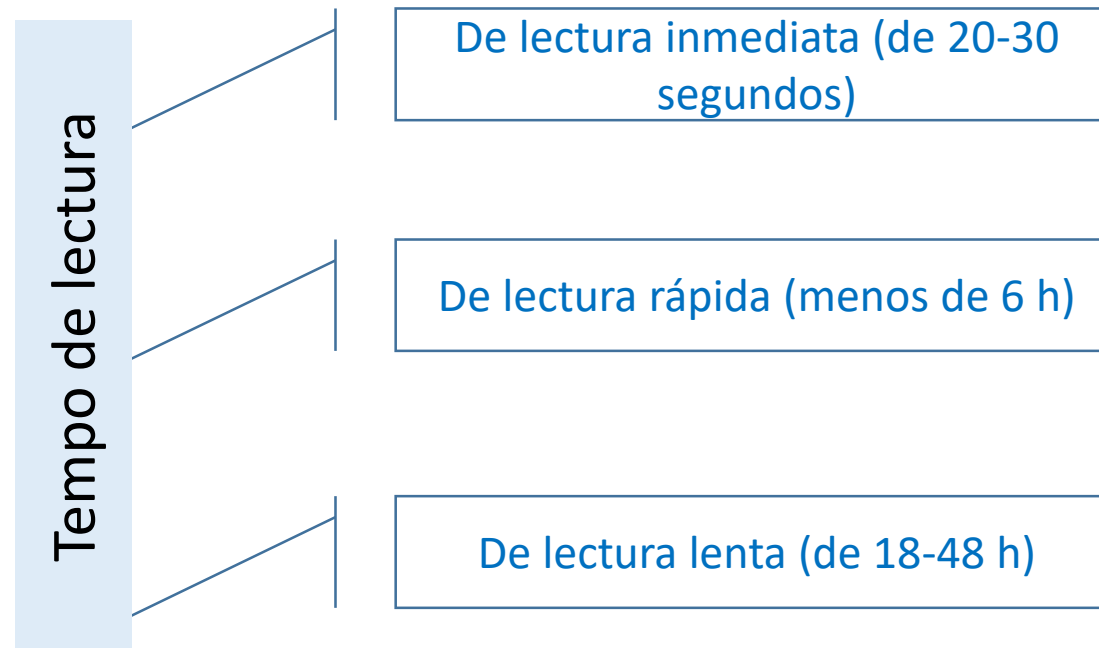


1. PRuebas Bioquímicas



- ❑ As pruebas bioquímicas permiten determinar características metabólicas das bacterias.
- ❑ Permiten valorar diferentes aspectos do metabolismo bacteriano, como: a respiración, utilización de compostos, utilización de carbohidratos, capacidade de degradación de compostos, etc).

- ❑ As pruebas bioquímicas pódense clasificar segundo o tempo de lectura en:



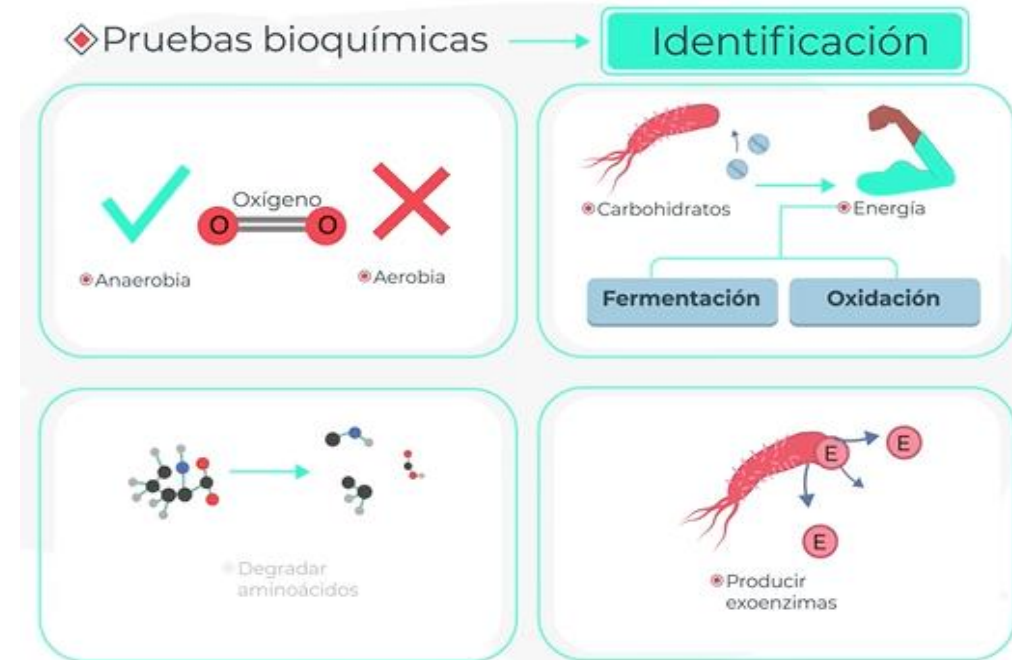
1. PRuebas Bioquímicas

UD5



	Pruebas bioquímicas	Lectura
Enzimas vinculadas a la respiración	Prueba de la catalasa	Inmediata
	Prueba de la oxidasa	Inmediata
	Prueba OF (oxidación-fermentación)	18-48 h
Vías metabólicas	Prueba de ONPG	< 6 h
	Prueba VP (Voges-Proskauer)	18-48 h
	Prueba del rojo de metilo	18-48 h
	Prueba de fermentación de azúcares	18-48 h
	Prueba del agar hierro de Kligler	18-48 h
	Prueba TSI	18-48 h
	Prueba de utilización de citrato	18-48 h
Utilización de compuestos	Prueba de utilización de malonato	18-48 h
	Prueba de reducción de nitratos	18-48 h
	Prueba de la hidrólisis del hipurato	< 6 h
	Prueba de la hidrólisis de la esculina	18-48 h
Degradación y síntesis de compuestos	Prueba de CAMP	18-48 h
	Prueba de la ureasa	< 6 h
	Prueba del indol	18-48 h
Capacidad de degradación de aminoácidos	Prueba de descarboxilasas	18-48 h
	Fenilalanina-desaminasa	18-48 h
	Prueba LAP (leucinoaminopeptidasa)	< 6 h
Exoenzimas	Prueba PYR (pirrolidoniil arilamidasa)	< 6 h
	Prueba de la coagulasa	18-48 h
	Prueba de la DNasa	18-48 h
Sensibilidad a compuestos	Prueba de las hemolisinas	18-48 h
	Prueba de sensibilidad a optoquina	18-48 h
	Prueba de sensibilidad a bacitracina	18-48 h
	Prueba de solubilidad en bilis	18-48 h
	Prueba de crecimiento en caldo hipersalino	18-48 h

- As probas relacionadas coa respiración son de lectura inmediata e pódense aplicar a unha identificación preliminar.
- O resultado de cada proba vai determinar cal será a seguinte que se debe realizar.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5



REQUISITOS PARA A CORRECTA REALIZACIÓN DAS PROBAS BIOQUÍMICAS

- ⇒ Debemos utilizar un cultivo puro e fresco. O cultivo non debe ter máis de 18-24 h, as bacterias deben ser todas viables para poder valorar adecuadamente as súas capacidades metabólicas.
- ⇒ Os medios de cultivo utilizados deben ser os indicados para cada proba. Non deben interferir nos resultados.
- ⇒ Manter as condicións de asepsia durante todo o procedemento.
- ⇒ Debemos aplicar protocolos validados e reproducibles.



Para unha correcta identificación, debemos partir dun cultivo puro, utilizar o medio de cultivo adecuado a cada proba, traballar en condicións de asepsia e con protocolos reproducibles.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

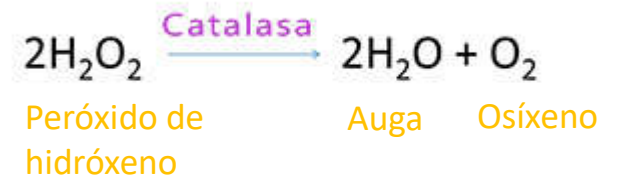
UD5

1.1 VALORACIÓN DE ENZIMAS VINCULADAS Á RESPIRACIÓN.

Trátase de dúas probas de lectura inmediata que se utilizan na caracterización inicial das bacterias, son a **proba da catalasa** e a **proba da oxidasa**.

PROBA DA CATALASA

- A **catalasa hidroliza o peróxido de hidróxeno** a auga e osíxeno gaseoso, que se libera en forma de burbullas.
- A catalasa está presente nas bacterias aerobias e anaerobias facultativas, excepto en *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.
- O principal **obxectivo** desta proba é **diferenciar entre *Micrococacceae*** (positivo para catalasa) de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (negativos para catalasa).



1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5



1.1 VALORACIÓN DE ENZIMAS VINCULADAS Á RESPIRACIÓN.

PROBA DA CATALASA

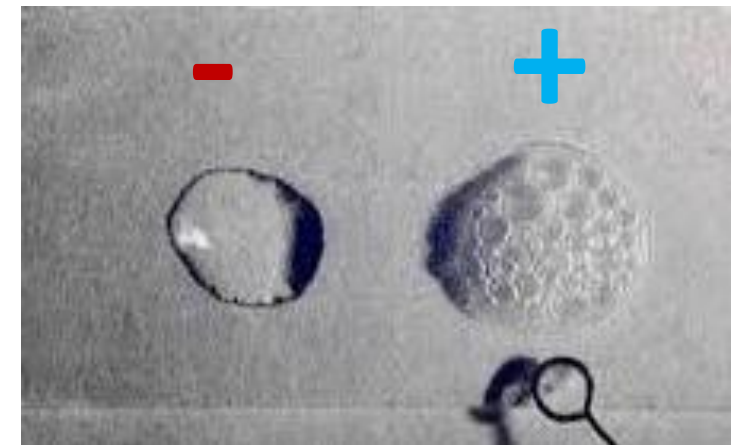
➤ Procedemento:

1. Depositar unha colonia a partir dun cultivo puro, nun portaobxetos.
2. Engadir unha gota de peróxido de hidróxeno ó 30%.
3. Esperar 5 segundos e realizar a lectura

➤ Resultados:

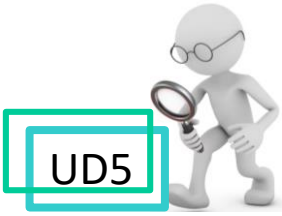
1. Fòrmanse **burbullas** ⇒ **catalasa positivo**
2. **Non** se forman **burbullas** ⇒ **catalasa negativo**

NON é recomendable utilizar medios de cultivo con sangue porque o sangue forma burbullas en presenza do peróxido de hidróxeno e podería levar a falsos positivos. No caso de utilizar un medio con sangue debe terse especial coidado de non arrastrar medio cando se recolle a colonia.



Resultados da proba da catalasa.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.1 VALORACIÓN DE ENZIMAS VINCULADAS Á RESPIRACIÓN.

PROBA DA OXIDASA

- A enzima oxidasa, en presenza de osíxeno, oxida a fenilendiamina formando **indofenol**, composto de cor violeta. O sustrato en estado reducido é incoloro, pero en presenza da citocromo oxidasa e osíxeno, oxídase e forma azul de indofenol.
- A oxidasa está presente nas bacterias aerobias, nalgunhas anaerobias facultativas e excepcionalmente nalgunha microaerofílica (*Vibrio fetus*). **As bacterias anaerobias estrictas carecen de actividade oxidasa.**
- A presenza de **oxidasa vai ligada á produción de catalasa**, xa que ésta degrada o peróxido de hidróxeno que se produce como consecuencia da redución do osíxeno e cuxa acumulación é tóxica.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5



1.1 VALORACIÓN DE ENZIMAS VINCULADAS Á RESPIRACIÓN.

PROBA DA OXIDASA

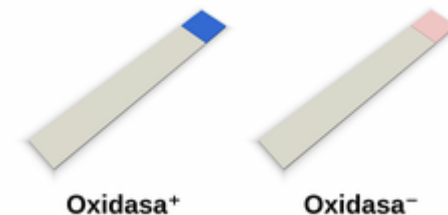
➤ Procedemento:

1. Coller a colonia en estudo e frotala sobre unha tira comercial impregnada co reactivo (fenilendiamina), ou impregnar previamente un papel de filtro co reactivo e despois depositar a colonia.
2. Facer a lectura despois de 10-30 segundos. Despois de 60 segundos a lectura xa non é fiable pois o reactivo podería oxidarse por efectos do osíxeno atmosférico e cambiar de cor.

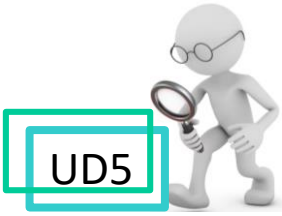
➤ Resultados:

1. Cambio de cor de incoloro a azul-violeta ⇒ **oxidasa positivo**
2. Non hai cambio de cor (ou cambio a lixeiramente rosado) ⇒ **oxidasa negativo**

NON se deben usar medios de cultivo que conteñan azucres e que coa actividade metabólica bacteriana se acidifique o medio, xa que os resultados non serían fiables. O pH inflúe nas reaccións de óxido-redución; o sistema é máis oxidante en medio ácido, e podería dar falsos positivos.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



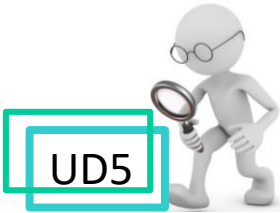
1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

Este grupo de probas está dirixido a identificar se as bacterias presentan un metabolismo oxidativo ou fermentativo, e no caso de metabolismo fermentativo qué tipo de sustratos poden utilizar.

PROBA OF (de oxidación-fermentación ou de Hugh-Leifson)

- Valora se a bacteria en estudo presenta metabolismo oxidativo ou fermentativo.
- O fundamento é que o metabolismo fermentativo produce unha acidificación do medio mentres que o oxidativo non modifica o pH.
- A detección faise incorporando un indicador de pH no medio, **azul de bromotimol**, que **vira de verde a amarelo se aumenta a acidez do medio**.
- O azucre utilizado no medio suele ser **glucosa**.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

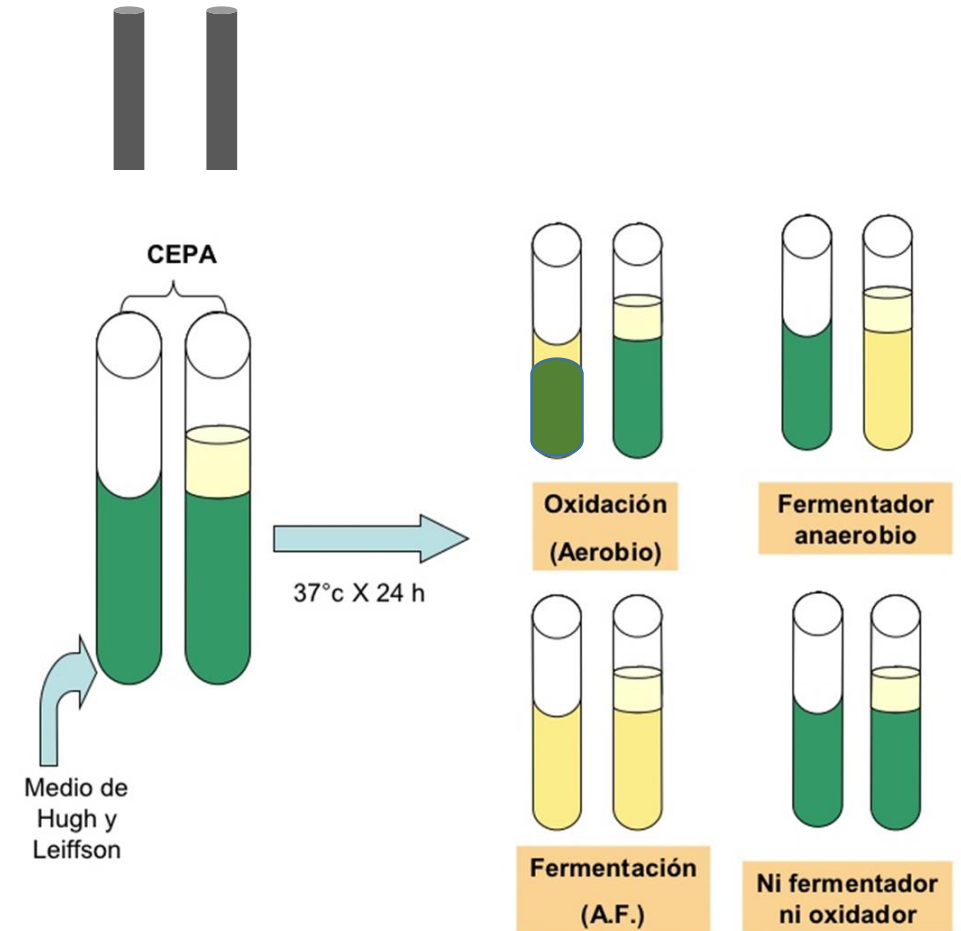


1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA OF (de oxidación-fermentación ou de Hugh-Leifson)

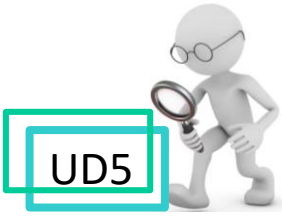
➤ Procedemento:

1. Sementar dous tubos de agar recto con medio OF (Hugh-Leifson), por picadura e cubrir un deles con vaselina ou aceite de parafina estéril.
2. Incubar en condicións de aerobiose e anaerobiose durante 24-48 horas a 35 ± 2 °C en aerobiose.



Procedemento e resultados proba OF.

1. PRuebas Bioquímicas



1.2 ESTUDIO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA OF (de oxidación-fermentación ou de Hugh-Leifson)

➤ Resultados:

Tubo sin cubrir	Tubo cubierto	Lectura
Amarillo	Verde	Solo se ha producido oxidación: la bacteria es aerobia estricta.
Amarillo	Amarillo	Se ha producido tanto oxidación como fermentación: la bacteria es anaerobia facultativa.
Verde	Amarillo	Solo se ha producido fermentación: la bacteria es anaerobia estricta.
Verde	Verde	No hay ni fermentación ni oxidación.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

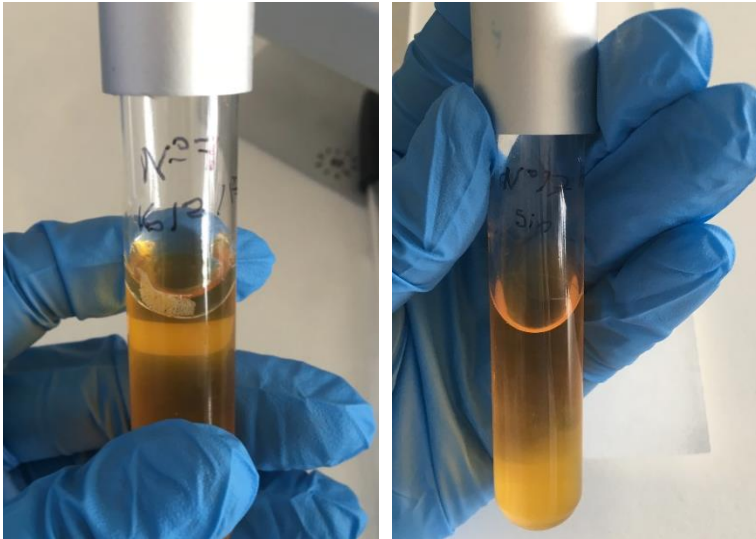


1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA OF (de oxidación-fermentación ou de Hugh-Leifson)

➤ Resultados:

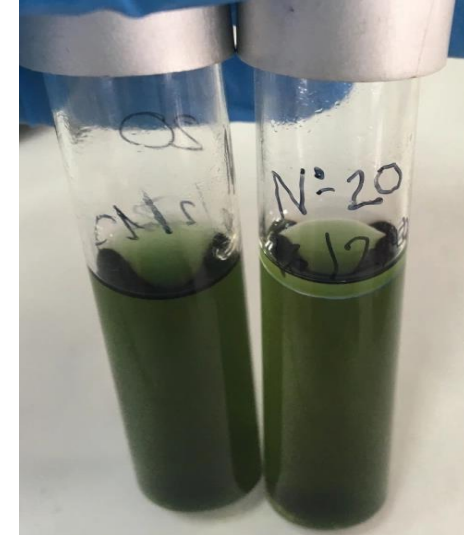
Ás veces é necesario incubar durante máis tempo, pois poderíanse dar falsos negativos no metabolismo oxidativo, xa que os ácidos que se xeran a partir do metabolismo da glucosa pola vía oxidativa son débiles e pode tardar un pouco máis en virar o medio de cor e difundir ata o fondo do tubo.



Tubo con parafina (esquerda) e tubo da dereita (sen parafina) con cambio de cor \Rightarrow metabolismo fermentativo/oxidativo \Rightarrow anaerobio facultativo.

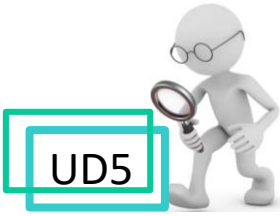


Tubo sen parafina (esquerda), lixeiramente amarelo na superficie, e tubo da dereita (con parafina) sen cambio de cor \Rightarrow oxidativo \Rightarrow aerobio.



Ambos tubos sen cambios \Rightarrow a bacteria non utiliza a glucosa (exemplo: *Moraxella sp.*)

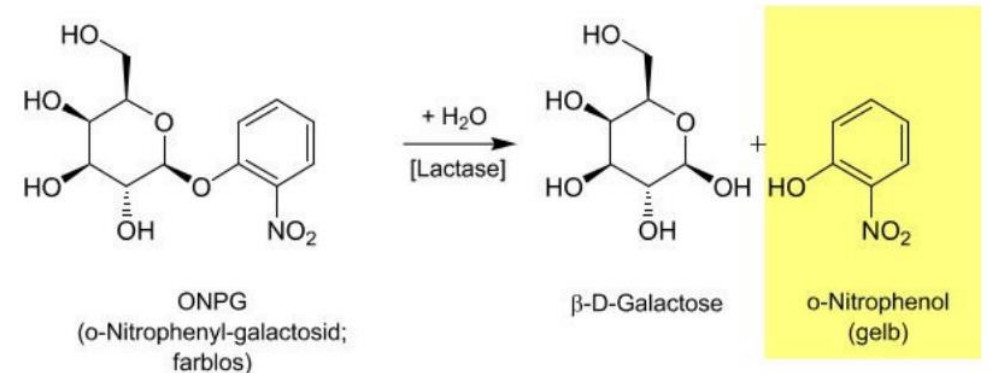
1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA ONPG (orto-nitro-fenil-galactopiranósido)

- Valora se a bacteria en estudo é capaz de fermentar a lactosa, é dicir se sintetiza a enzima β -galactosidasa, que rompe a lactosa en glucosa e galactosa.
- A proba consiste en poñer en contacto unha suspensión do cultivo en estudo co substrato ONPG, un composto químico estruturalmente similar á lactosa e incoloro. Se a bacteria en estudo produce β -galactosidasa hidrolizará o ONPG e xerarase un composto coloreado que vira a cor do medio hacia amarelo.



Hidrólise do ONPG xerando o-nitrofenol, composto coloreado.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA ONPG (orto-nitro-fenil-galactopiranosido)

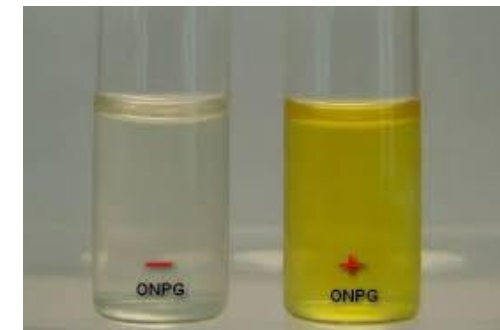
➤ Procedemento:

1. Preparar unha suspensión do cultivo puro.
2. Introducir no tubo da suspensión, ou ben un disco de ONPG ou un par de gotas de solución ONPG.
3. Incubar durante 4 horas a 35 ± 2 °C en aerobiose.

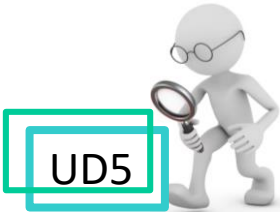
➤ Resultados:

1. **Medio de cor amarela** \Rightarrow bacteria **fermentadora de lactosa** (β -galactosidasa positiva).
2. **Medio incoloro ou amarelo moi pálido** \Rightarrow bacteria **non fermentadora** (non produtora de β -galactosidasa).

A glucosa inhibe a β -galactosidasa, polo tanto non se poden utilizar medios de cultivo que conteñan glucosa, porque dará falsos negativos.



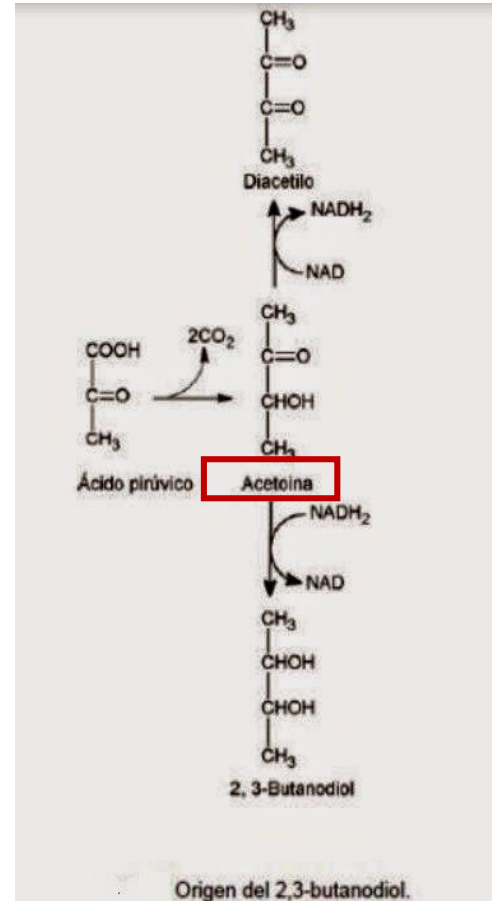
1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA VP (Voges Proskauer)

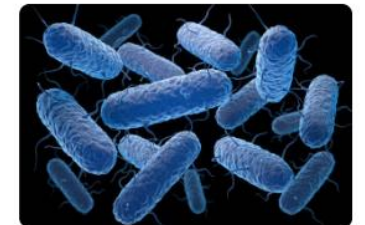
- Valora a capacidade da bacteria en estudo de fermentar a glucosa pola vía butanodiólica.
- Úsase como sustrato o **alpha-naftol** que reacciona coa **acetoína** (produto intermedio da fermentación butanodiólica) dando un produto coloreado (rosa-avermellado).



Exemplos

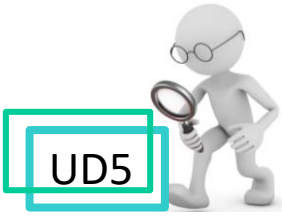


Klebsiella



Enterobacter

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA VP (Voges Proskauer)

➤ Procedemento:

1. Suspende un inóculo en **medio de cultivo MRVP** (Methyl-Red Voges-Proskauer, contén un hidrolizado de caseína e peptona de carne).
2. Incubar por 24-48 horas a 35 ± 2 °C en aerobiose.
3. Transferir 1 mL de cultivo a un tubo de ensaio e, engadir 12 gotas de **α -naftol** ó 5% en etanol e 4 gotas de **KOH** ó 40%.
4. Esperar de 5-10 minutos.

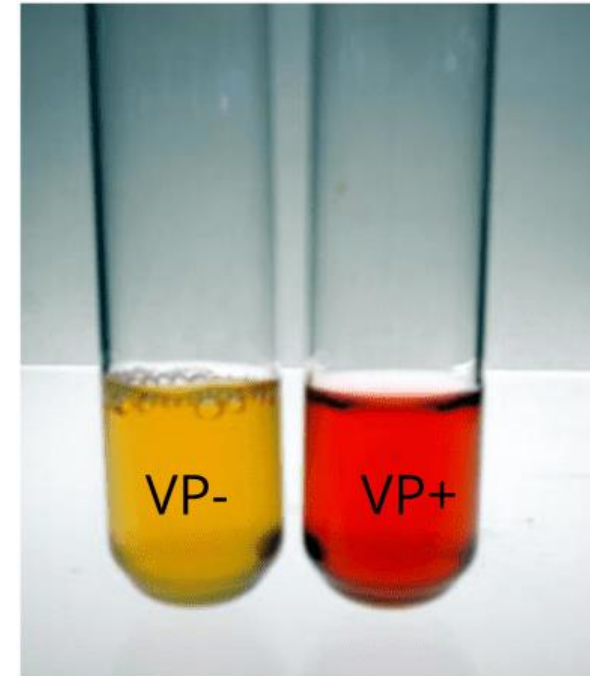
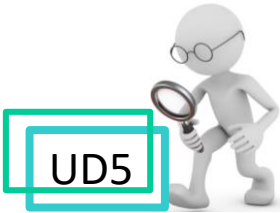
1. PROBAS BIOQUÍMICAS

1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA VP (Voges Proskauer)

➤ Resultados:

1. Fermentación da glucosa pola vía butanodiólica positiva \Rightarrow medio de cor rosada.
2. Fermentación da glucosa pola vía butanodiólica negativa \Rightarrow o medio non cambia de cor.



VP test

VP+ \Rightarrow cambio de cor do medio de cultivo hacia un ton rosado.

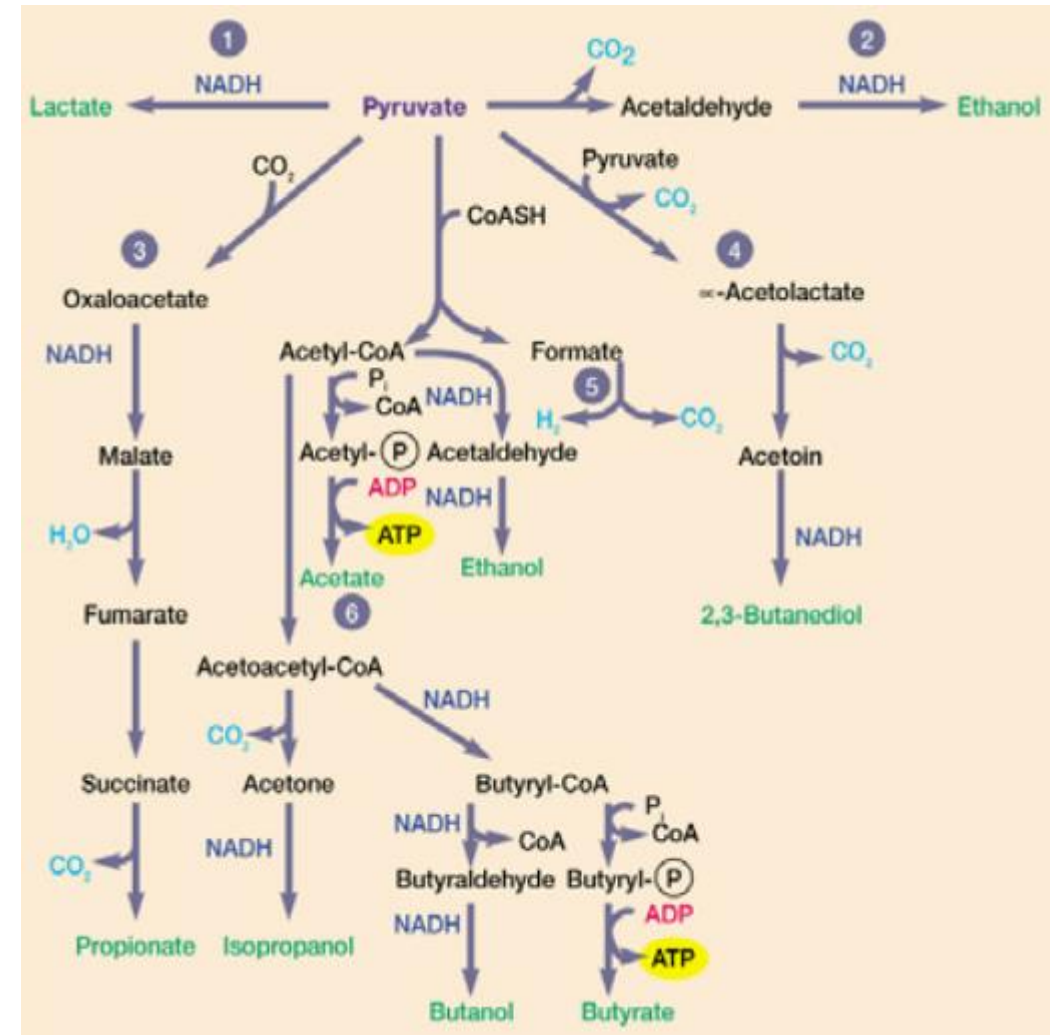
1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

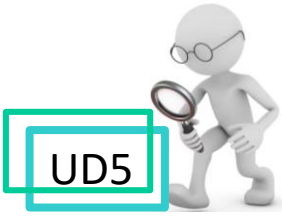
PROBA VERMELLO DE METILO

- Valora a **capacidade** da bacteria en estudo de fermentar a glucosa pola vía ácido-mixta.
- Esta vía de fermentación produce maior cantidade de ácidos que a vía butanodiólica (etanol, ácido láctico, fórmico, succínico e acético, e vai producir unha acidificación do medio que se detecta mediante un indicador de pH, o vermello de metilo.
- O vermello de metilo actúa entre pH 4,2 (vermello) e pH 6,3 (amarelo).



Vías metabólicas fermentativas bacterianas.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



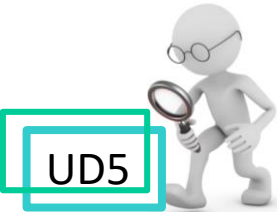
1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA VERMELLO DE METILO

➤ Procedemento:

1. Preparar a solución indicadora de vermello de metilo:
 - Disolver 0,1 g de vermello de metilo en 300 mL de etanol ó 95% e diluíndo logo con auga destilada ata enrasar a 500 mL.
2. Resuspender o inóculo no **medio de cultivo MRVP** e mezclar por rotación.
3. Incubar durante 24-48 horas a 35 ± 2 °C en aerobiose.
4. Transferir 5 mL do cultivo a un tubo e engadirlle 5 gotas de solución indicadora de vermello de metilo.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

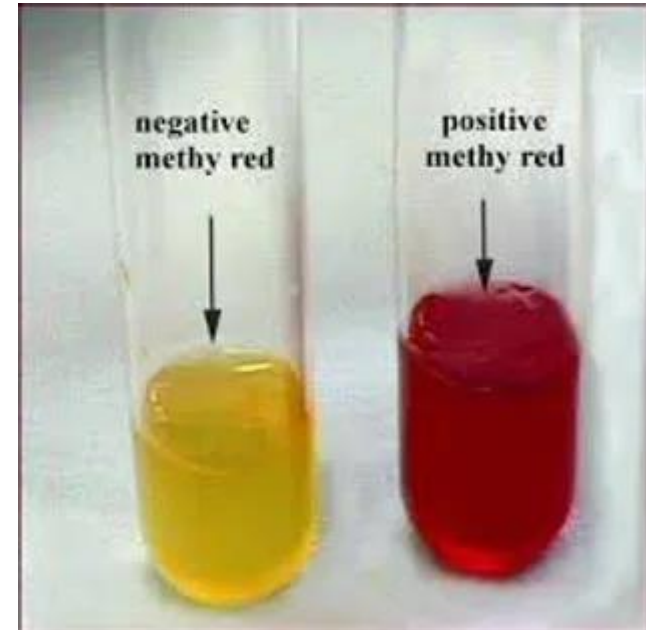


1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA VERMELLO DE METILO

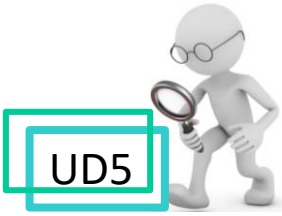
➤ Resultados:

1. Fermentación da glucosa pola vía ácido-mixta positiva \Rightarrow medio de cor avermellado.
2. Fermentación da glucosa pola vía ácido mixta negativa \Rightarrow medio de cor amarelo.



Resultados da proba vermello de metilo.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

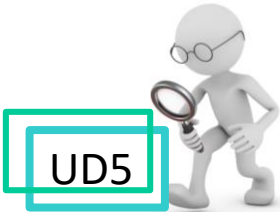
PROBA DA FERMENTACIÓN DE AZUCRES

- Valora a fermentación de calquera carbohidrato coa consecuente acidificación do medio.
- Neste caso ademais da acidificación do medio de cultivo vaise valorar tamén a produción de gas (hidróxeno ou CO₂).

➤ Procedemento:

1. Preparar tantos tubos con medio de fermentación de azucres como carbohidratos queiramos valorar. O indicador de pH neste caso é o violeta de bromocresol.
2. En cada tubo suspender un inóculo, mezclar por rotación e colocar unha campá de Durham (sitúase boca abaixo).
3. Incubar durante 24 horas a 35 ± 2 °C.

1. PRuebas Bioquímicas



1.2 ESTUDIO DAS VÍAS METABÓLICAS.

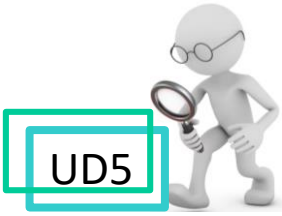
PROBA DA FERMENTACIÓN DE AZUCRES

➤ Resultados:

Medio	Campana de Durham	Lectura
Amarillo	Con gas	La bacteria fermenta el carbohidrato que contenía el tubo, y la fermentación produce gas.
Amarillo	Sin gas (el interior aparece de color violeta)	La bacteria fermenta el carbohidrato que contenía el tubo, y la fermentación no produce gas.
Violeta	Sin gas	La bacteria no fermenta el carbohidrato que contenía el tubo.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS

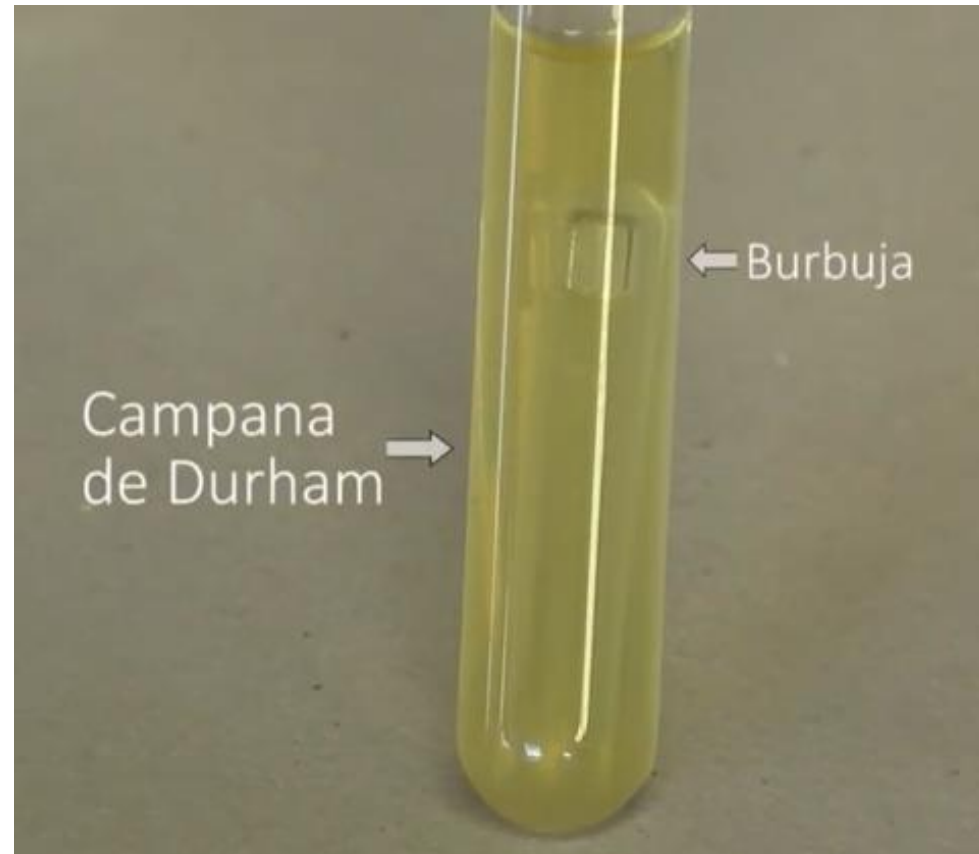


1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

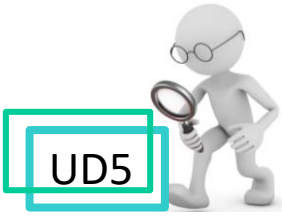
PROBA DA FERMENTACIÓN DE AZUCRES

➤ Resultados:

Detalle da formación de gas: burbulla atrapada na campá de Durham.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA DO FERRO DE KLIGER

- Permite determinar varios parámetros:
 - Capacidade para metabolizar glucosa e lactosa.
 - Produción ou non de gas (hidróxeno ou CO_2) como produto final do metabolismo dos carbohidratos.
 - Produción de ácido sulfhídrico.
- Utilízase para a diferenciación de enterobacterias en base á capacidade de fermentación da glucosa e lactosa, e da produción de ácido sulfhídrico.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

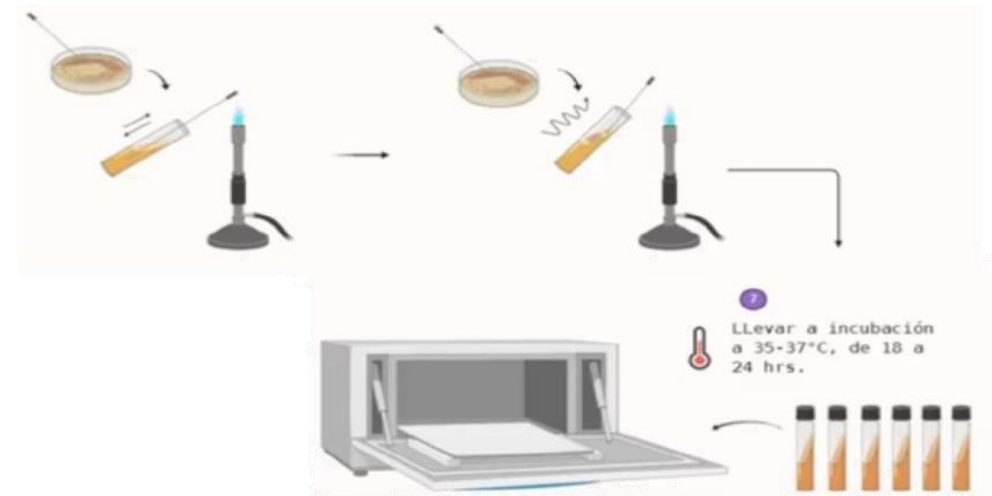
PROBA DO FERRO DE KLIGER

➤ Procedemento:

1. Sementar por picadura e por estría en superficie os tubos de agar Kliger inclinados.
2. Incubar durante 24 horas a 35 ± 2 °C.

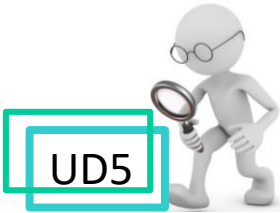
➤ Resultados:

1. O medio Kliger contén glucosa e lactosa como carbohidratos fermentables, vermello de fenol como indicador de pH (vira a amarelo en medio ácido), e tiosulfato de sodio necesario para a produción de ácido sulfhídrico. O ácido sulfhídrico reacciona cunha sal de ferro do medio proporcionando o típico sulfuro de ferro de cor negra.



Sementeira en medio Kliger (tubo inclinado).

1. PRuebas Bioquímicas

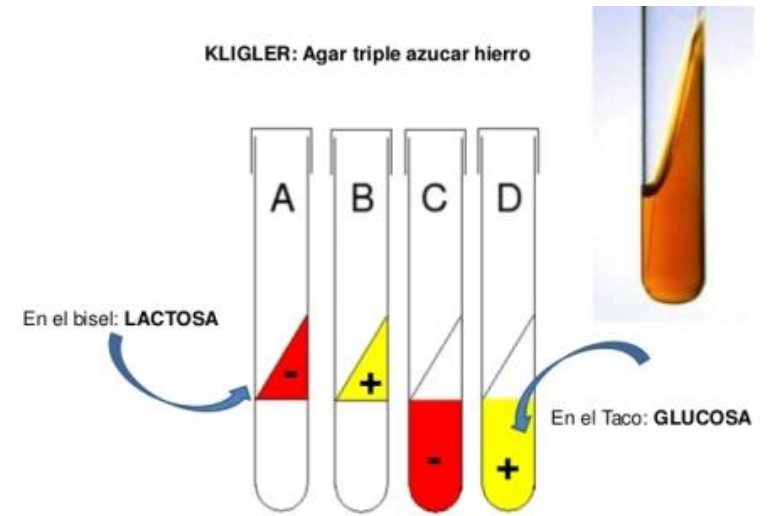


1.2 Estudio de las Vías Metabólicas.

Prueba de Ferro de Kligler

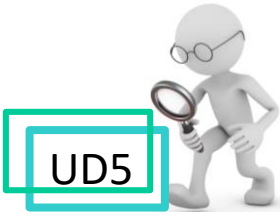
➤ Resultados: lectura

Pico	Fondo	Lectura
Rojo	Amarillo	La bacteria solo fermenta glucosa.
Amarillo	Amarillo	La bacteria fermenta glucosa y lactosa.
Rojo	Rojo	La bacteria es no fermentadora.
Presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo		La bacteria produce gas.
Ennegrecimiento del medio		La bacteria produce ácido sulfhídrico.



A fermentación da glucosa ocorre no fondo do tubo (en anaerobiose) e a da lactosa na superficie (en aerobiose).

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA DO FERRO DE KLIGLER

FUNDAMENTO DA PROBA

- O medio Ferro Kliger ten unha concentración de lactosa 10 veces superior á de glucosa, polo que:
 - Se o m.o só fermenta a glucosa só haberá viraxe da cor do medio a amarelo no fondo do tubo, porque é onde hai condicións anaeróbicas que favorecen a fermentación.
 - Se o m.o fermenta a lactosa haberá viraxe da cor en todo o tubo, porque a concentración deste azucre é moi alta e a produción de ácidos derivada da fermentación, tamén o será. Ademais todo m.o que fermenta lactosa, tamén é capaz de fermentar a glucosa.
 - A produción de ácido sulfhídrico podería enmascarar a fermentación de glucosa, pero isto carece de importancia porque para que se produza ácido sulfhídrico requírese un medio ácido, polo tanto son dous procesos que van ligados.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA DO FERRO DE KLIGLER

➤ Resultados: lectura

- En canto á produción de gases:

- Se se observan grietas, burbullas ou desprendemento do agar das paredes do tubo ⇒ produción de gas positiva. (Ex.: *E. coli*).

- En canto á produción de ácido sulfhídrico:

- Se se observa ennegrecemento do medio ⇒ positivo (Ex.: *Salmonella typhi*).

Microorganismos	Desarrollo	Superficie Inclinada	Base	Gas	H ₂ S
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	Bueno	Amarilla	Amarillo	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bueno	Amarilla	Amarillo	+	-

The image displays two sets of test tubes used for the Kligler Iron Test. The left set shows three tubes: a 'Tubo virgen' (virgin tube) with a red bottom and clear top, a tube with *C. freundii* ATCC 8090 showing a yellow top and dark bottom, and a tube with *Escherichia coli* ATCC 25922 showing a yellow top and dark bottom. The right set shows four tubes: an 'Uninoculated Tube' with a red bottom and clear top, a tube with *E. coli* ATCC 25922 showing a yellow top and dark bottom, a tube with *Morganella morganii* ATCC 8019 showing a yellow top and dark bottom, and a tube with *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 showing a black top and dark bottom.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

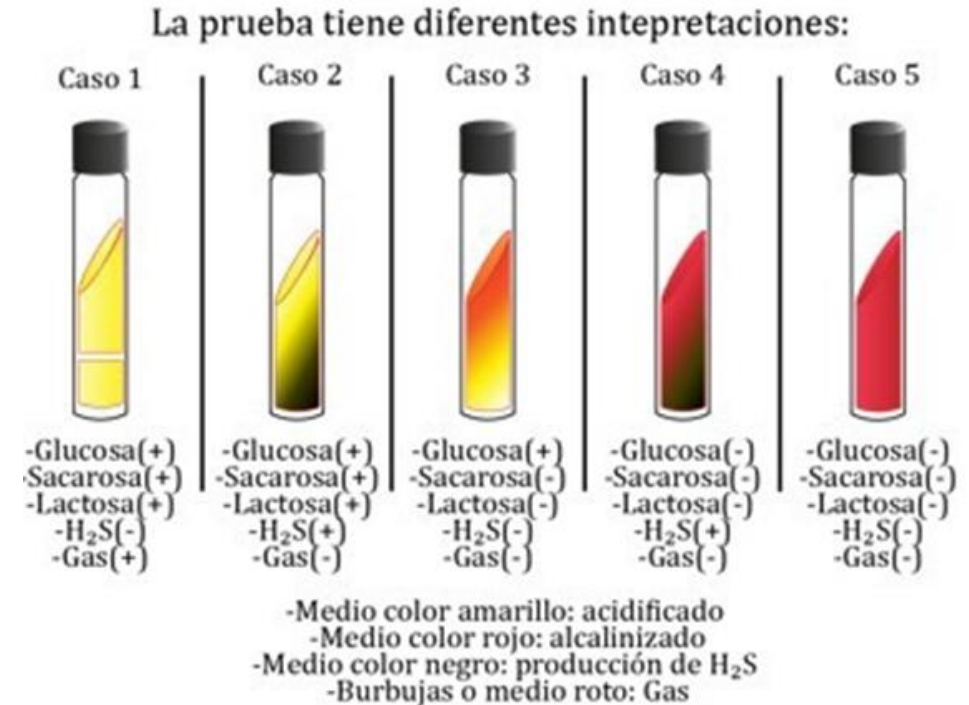
1.2 ESTUDO DAS VÍAS METABÓLICAS.

PROBA DO TSI (agar triple azucre)

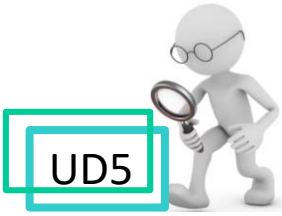
- Proba moi similar á do Ferro Kligler e mesma utilidade (diferenciación de enterobacterias). A diferenza está que neste caso o medio tamén incorpora **sacarosa** como carbohidrato, ademais de glucosa e lactosa.
- Mesmo procedemento que na proba do Ferro Kligler.

➤ **Resultados:** lectura

- Interpretase igual que a proba do Ferro Kligler a excepción de que a lectura positiva de acidificación do medio en superficie, pode deberse á fermentación da lactosa e/ou da sacarosa.
- Permite diferenciar entre algunhas enterobacterias como no caso do xénero *Proteus* que pode fermentar sacarosa pero non lactosa.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



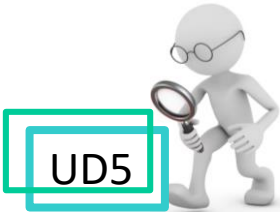
1.3 ESTUDO DA UTILIZACIÓN DE COMPOSTOS.

Trátase de probas para valorar se unha bacteria é capaz de utilizar distintos compostos como única fonte de carbono ou de nitróxeno. As máis habituais son a determinación da utilización do **citrato**, do **malonato** e de **nitratos**.

PROBA DA UTILIZACIÓN DO CITRATO

- Valora a capacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono e compostos amoniacaís como única fonte de nitróxeno, en condicións aeróbicas.
- As reaccións metabólicas que se producen provocan un cambio de pH do medio que é detectado polo azul de bromotimol.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.3 ESTUDO DA UTILIZACIÓN DE COMPOSTOS.

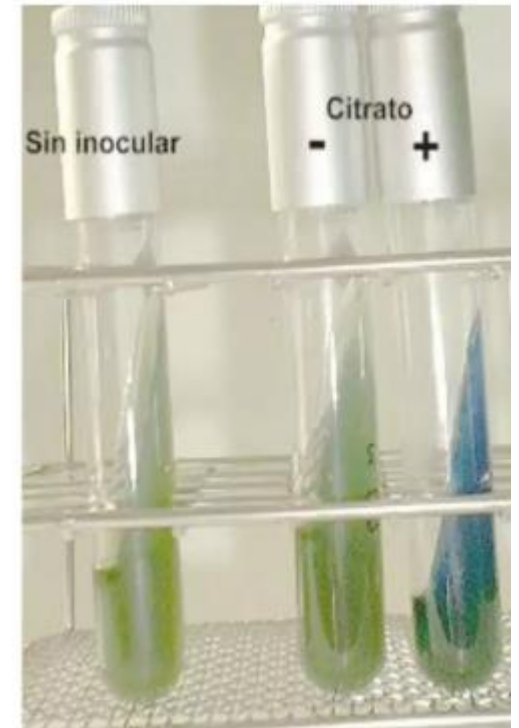
PROBA DA UTILIZACIÓN DO CITRATO

➤ Procedemento:

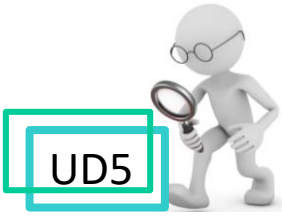
1. Sementar por esgotamento na superficie dun tubo de agar inclinado de citrato de Simons. Este medio contén citrato de sodio como única fonte de carbono e azul de bromotimol como indicador de pH.
2. Incubar a 35 ± 2 °C durante 24 horas en aerobiose.

➤ Resultados: lectura

1. Sen crecemento visible nin cambio de cor \Rightarrow Negativo (o medio permanece de cor verde). (Ex.: *E. coli*).
2. Crecemento bacteriano con cambio de cor do medio de verde a azul intenso \Rightarrow Positivo (Ex. *Klebsiella pneumoniae*).



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.3 ESTUDO DA UTILIZACIÓN DE COMPOSTOS.

PROBA DA UTILIZACIÓN DO MALONATO

- Valora a capacidade de utilizar o malonato de sodio como única fonte de carbono.
- As reaccións metabólicas que se producen provocan un cambio de pH do medio que é detectado polo azul de bromotimol.
- Esta proba nun primeiro momento deseñouse para diferenciar *E. coli* (negativa para a proba) de *Enterobacter* (positiva), pero agora utilízase na diferenciación de especies que pertencen á familia Enterobacteriaceae. A maioría de especies dos xéneros *Enterobacter* e *Klebsiella* utilizan malonato.
- O medio de cultivo utilizado é o caldo malonato.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.3 ESTUDO DA UTILIZACIÓN DE COMPOSTOS.

PROBA DA UTILIZACIÓN DO MALONATO

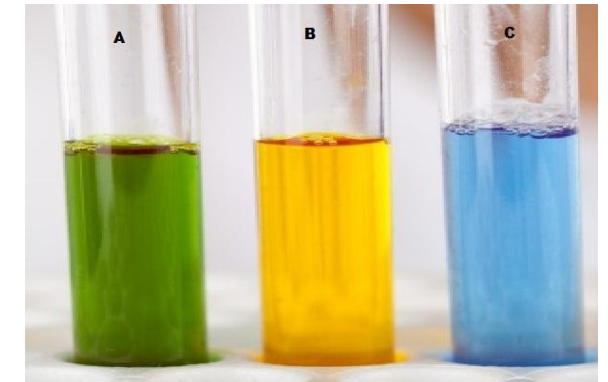
➤ Procedemento:

1. Inocular un tubo de caldo malonato e mezclar por rotación.
2. Incubar durante 24 horas a 35 ± 2 °C.

➤ Resultados: lectura

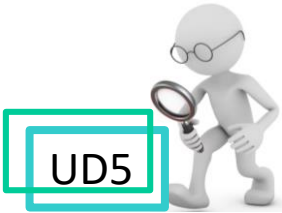
1. Cambio de cor no medio de verde a azul (acidificación do medio) ⇒ Positiva. (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*).
2. Non se produce cambio de cor do medio, ou un cambio moi sutil hacia amarelo ⇒ Negativo. (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, etc).

Estes medios poden conter **glucosa nunha baixa proporción** para estimular o crecemento dos m.o, que do contrario serían moi lentos en responder. Cando o m.o problema é capaz de metabolizar a glucosa pode provocar un lixeiro cambio de cor no medio hacia un amarelo moi sutil, pero para considerar a proba positiva para a utilización do malonato o medio debe cambiar a azul intenso.



Interpretación dos resultados da proba do malonato: tubo A negativo, tubo B negativo, tubo C positivo.

1. PRUBAS BIOQUÍMICAS

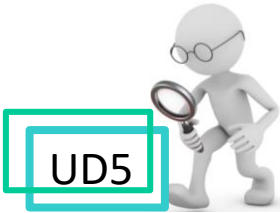


1.3 ESTUDO DA UTILIZACIÓN DE COMPOSTOS.

PROBA DA REDUCCIÓN DOS NITRATOS

- Detecta un tipo de respiración anaerobia que utiliza o nitrato como aceptor final dos electróns. Os nitratos son reducidos a nitritos e algunhas bacterias reducen os nitritos a sustancias gaseosas (N_2 ou N_2O).
- A proba detecta nitritos no cultivo con reactivos que orixinan unha coloración avermellada.
- A redución de nitritos ata gas detéctase mediante a inclusión no tubo de cultivo de campás de Durham, ou mediante unha segunda lectura despois de engadir pó de zinc.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.3 ESTUDO DA UTILIZACIÓN DE COMPOSTOS.

PROBA DA REDUCCIÓN DOS NITRATOS

➤ Procedemento:

1. Inocular un tubo de caldo nitrato e mezclar por rotación.
2. Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas.
3. Engadir 2 gotas da solución A e logo 2 gotas da solución B do reactivo de Griess e mezclar.

A α -naftilamina demostrouse ser carcinóxénica, por eso se recomenda substituír por outras substancias como por exemplo o α -naftol.

REACTIVO DE GRIESS

- **Solución A:** Ácido acético + ácido sulfanílico.
- **Solución B:** α -naftilamina + ácido acético.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

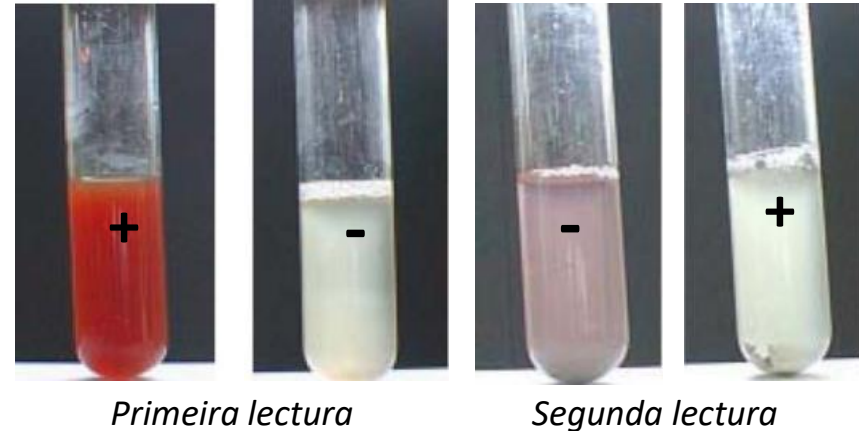
UD5

1.3 ESTUDO DA UTILIZACIÓN DE COMPOSTOS.

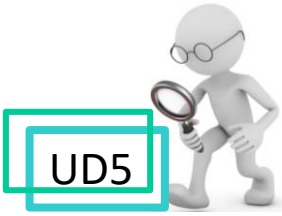
PROBA DA REDUCCIÓN DOS NITRATOS

➤ Resultados: lectura

1. Bacteria capaz de reducir nitratos \Rightarrow cambio de cor do medio de cultivo a vermello \Rightarrow proba Positiva.
2. Sen cambios de cor no medio \Rightarrow non houbo redución dos nitratos a nitritos \rightarrow faise unha segunda comprobación, engadindo pó de zinc (tamén reduce os nitratos), e faise unha segunda lectura.
3. 2ª lectura:
 - Coloración rosada ou vermella: confirma o negativo (quere dicir que quedaban nitratos e que anteriormente non houbo redución a nitritos).
 - Sen cambio de cor: significa que os nitratos foran reducidos ata nitróxeno gaseoso (N_2).



1. PROBAS BIOQUÍMICAS

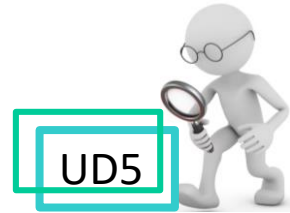


1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DA HIDRÓLISE DO HIPURATO

- Valora a capacidade da bacteria en estudo da síntese da enzima **hipuricasa**.
- A enzima hipuricasa hidroliza o hipurato de sodio a ácido benzoico e glicina.
- Como indicador para revelar se se produce a hidrólise utilízase o sustrato ninhidrina, que cambia de cor en presenza de glicina.
- Esta proba utilízase para a identificación de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis* e *Streptococcus agalactiae*.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

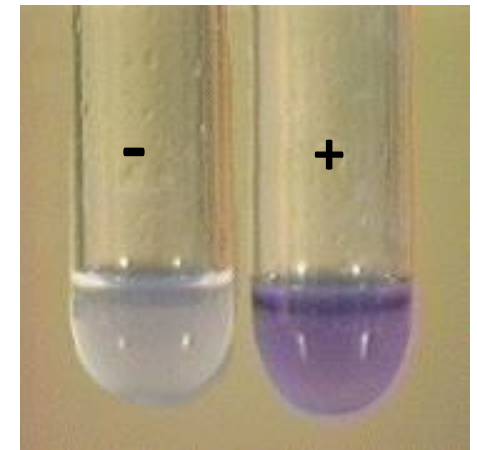
PROBA DA HIDRÓLISE DO HIPURATO

➤ Procedemento:

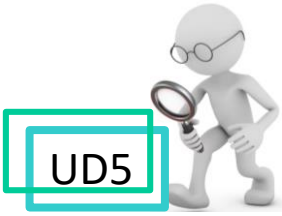
1. **Opción A:** preparar unha suspensión en auga destilada a partir de unha ou dúas colonias e engadir un disco de hipurato.
2. **Opción B:** inocular abundantemente unha solución de hipurato.
3. Incubar durante 2-4 horas a 35 ± 2 °C en aerobiose.
4. Engadir 2 gotas de ninhidrina.
5. Incubar durante 30 minutos a 35 ± 2 °C en aerobiose.

➤ Resultados: lectura

1. Suspensión de cor violeta intenso \Rightarrow bacteria **hipuricosa positiva**.
2. Suspensión sen cambio de cor \Rightarrow bacteria **hipuricosa negativa**.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DA HIDRÓLISE DA ESCULINA

- Valora a capacidade da bacteria para hidrolizar a esculina a esculetina e glucosa.
- Esta proba utilízase para a identificación presuntiva de estreptococos do grupo D.
- O agar contén esculina, que en presenza de ións ferro forma un composto de cor verde oliva ata negro. Tamén contén sales biliares que inhiben o crecemento da microbiota acompañante.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

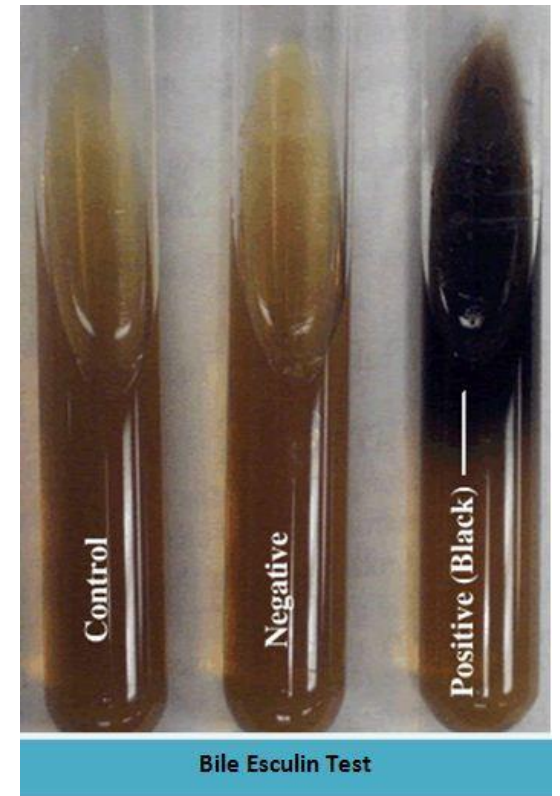
PROBA DA HIDRÓLISE DA ESCULINA

➤ Procedemento:

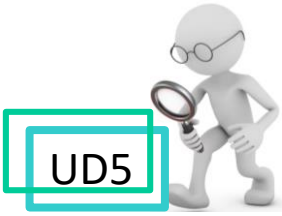
1. Inocular un tubo de agar bilis esculina en slant.
2. Incubar a 35 ± 2 °C durante ata 3 días en aerobiose.

➤ Resultados: lectura

1. Escurecemento do medio ou ennegrecemento \Rightarrow a bacteria hidroliza a esculina \Rightarrow proba positiva.
2. Ausencia de escurecemento do medio \Rightarrow a bacteria non hidroliza a esculina \Rightarrow proba negativa.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS

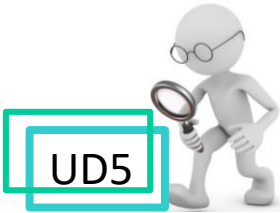


1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DE CAMP

- Valora se a bacteria en estudo é produtora da proteína denominada factor CAMP.
- O factor CAMP é unha proteína difusible e termoestable producida por os estreptococos do grupo B (*S. agalactiae*) e algunhas cepas de *Listeria*, que presenta sinerxia coa β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* sobre os eritrocitos, o que se observa como un fenómeno lítico aumentado na intersección dos dous m.o cando se sementan próximos.
- O acrónimo CAMP provén dos seus descubridores: Christie, Atkins, Munch-Petersen.
- Nas probas utilízase un agar sangue, onde poder evidenciar o efecto hemolítico dunha cepa tipo de *S. aureus*, e o efecto hemolítico potenciado, cando no m.o problema obxeto de estudo hai secreción do factor CAMP.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

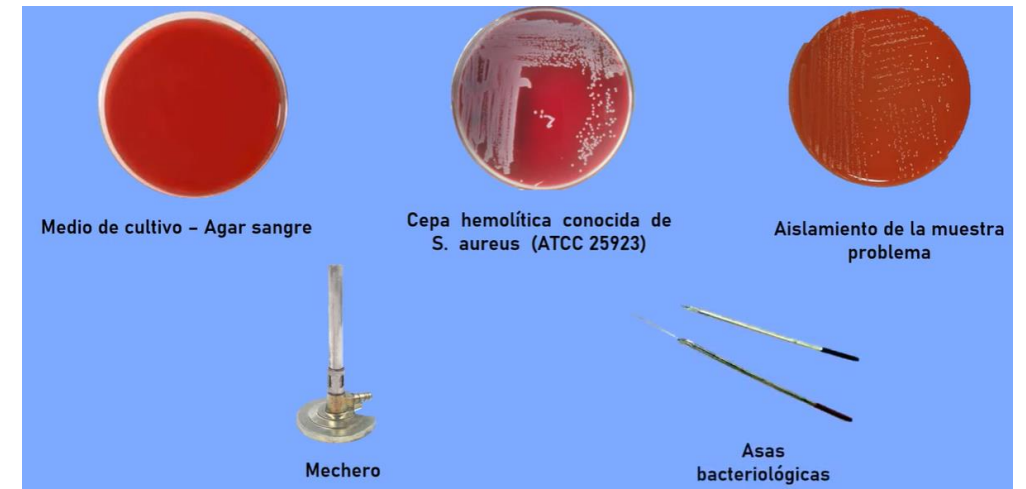


1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DE CAMP

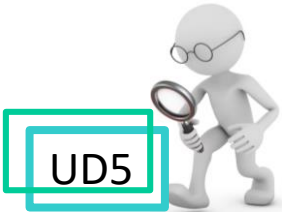
➤ Procedemento:

1. Sementar a cepa ATCC 25923 de *S. aureus* en liña recta sobre o agar sangue.
2. Sementar a bacteria en estudo perpendicularmente á liña de *S. aureus* pero sen que cheguen a tocarse.
3. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas nunha atmósfera do 5% de CO_2 .



Materiais necesarios para a proba de CAMP.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

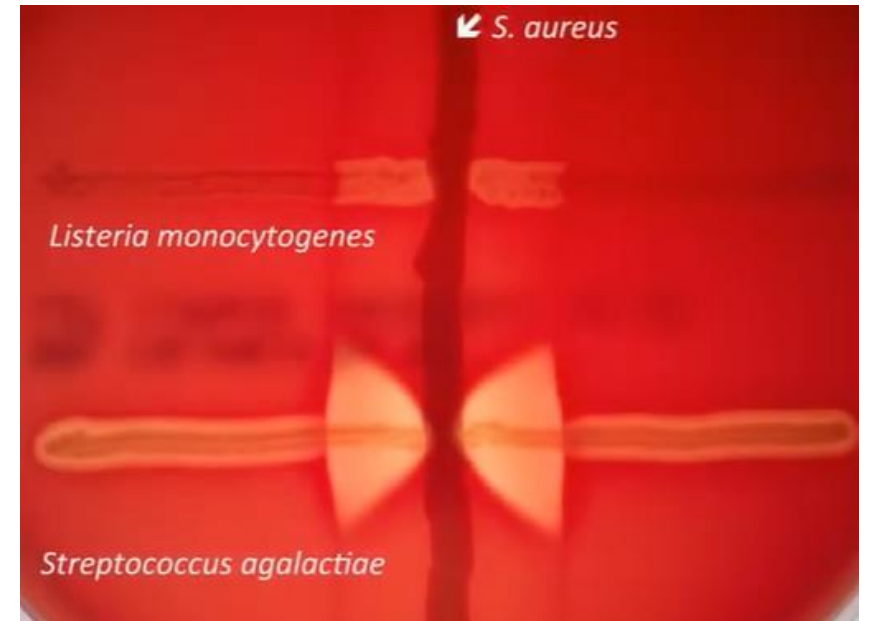


1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DE CAMP

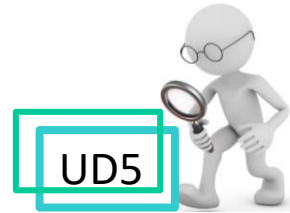
➤ Resultados: lectura

1. Formación dunha punta de frecha de β -hemólise na intersección da liña de cultivo das dúas bacterias \Rightarrow a bacteria en estudo **produce o factor de CAMP** \Rightarrow **proba positiva**.
2. Ausencia de formación de punta de frecha na intersección da liña de cultivo das dúas bacterias \Rightarrow a bacteria **non produce o factor de CAMP** \Rightarrow **proba negativa**.



Proba de CAMP positiva para *S. agalactiae* e para *L. monocytogenes*.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

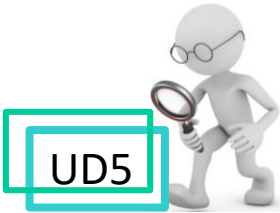


1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DA UREASA

- Valora a capacidade dunha bacteria para producir a enzima **ureasa**.
- A enzima ureasa hidroliza a urea producindo amoniaco (NH_4), produto alcalino, o que vai provocar unha **alcalinización do medio** de cultivo, que detectaremos cun indicador de pH (vermello de fenol).
- Os medios de cultivo utilizados para esta proba poden ser sólidos (**agar urea de Christensen**) ou caldo (**caldo urea de Stuart**). Debemos ter coidado no proceso de esterilización do medio, porque se nos pasamos co tempo ou coa temperatura, a urea podería degradarse xa, e invalidaría os resultados da proba. Unha vez preparado o medio debe manterse refrixerado e protexido da luz, porque a urea pode autohidrolizarse. Preferentemente preparar o medio o mesmo día que se vai utilizar.
- Esta proba utilízase para diferenciar o xénero *Proteus* (positivo para ureasa) doutras enterobacterias ureasa negativas. Outros exemplos de bacterias produtoras de ureasa son: *Helicobacter pylori* e *Brucella* spp.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DA UREASA

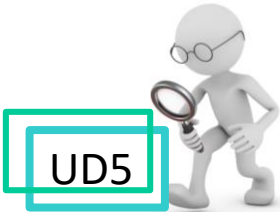
➤ Procedemento:

1. Recoller unha colonia abundante da bacteria problema medrada en medio sólido e estriar en agar urea de Christensen en tubo inclinado ou descargar en caldo urea de Stuart.
2. Incubar a 35 ± 2 °C durante 4-48 horas. Os tubos co tapón frouxo (prodúcese CO_2 durante a degradación da urea).



Aspecto do agar urea Christensen sen inocular.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.4 ESTUDO DA DEGRADACIÓN E SÍNTESE DE COMPOSTOS.

PROBA DA UREASA

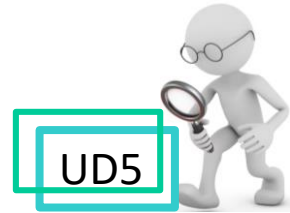
➤ Resultados:

Lectura: hai m.o que presentan unha hidrólise tardía da urea, despois das 24 horas, por eso ás veces se fan lecturas despois de varios días (ata 7 días).

1. Cambio de cor do medio de amarelo pálido a laranxa pálido ou rosa \Rightarrow a bacteria en estudo **produce ureasa** \Rightarrow **proba positiva**. Exemplo: *Proteus mirabilis*.
2. Ausencia de cambio de cor do medio (permanece amarelo pálido) \Rightarrow a bacteria **non produce ureasa** \Rightarrow **proba negativa**. Exemplo: *E. coli*.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

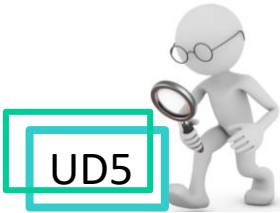
PROBA DO INDOL

- Valora a produción da enzima **triptofanasa**, que degrada o triptófano producindo **indol**, ácido pirúvico e amoniaco.
- Esta proba utilízase para diferenciar entre *E. coli* (indol positiva) doutras enterobacterias como os xéneros *Klebsiella*, *Enterobacter* ou *Serratia*, maioritariamente indol negativos.
- A detección da triptofanasa lévase a cabo por medio dun reactivo comercial, **reactivo de Kovacs**, que leva un aldehído que reacciona co indol xerando un **composto de cor vermella**.
- A proba pode levarse a cabo utilizando un medio rico en triptófano ou tamén existen probas rápidas, onde se empregan tiras impregnadas co reactivo de Kovacs, sobre as que se frota unha colonia do m.o problema.



Reactivo de Kovacs.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

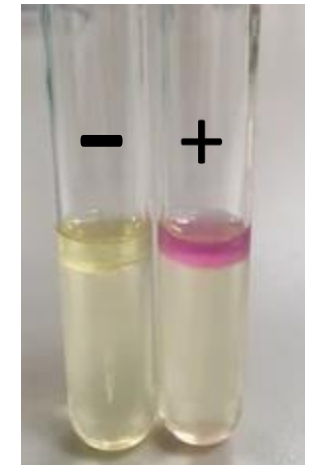
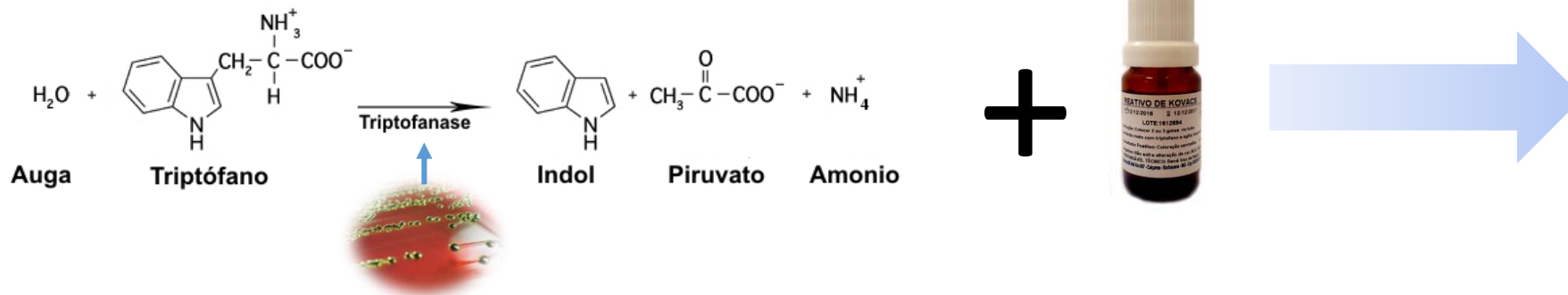


1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

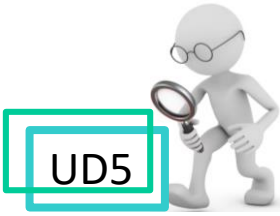
PROBA DO INDOL

➤ Procedemento:

1. Preparar caldo de cultivo líquido con triptófano ó 1% (tamén se pode utilizar caldo de peptona).
2. Inocular o medio cunha ou dúas colonias do m.o en estudo.
3. Incubar a 35 ± 2 °C durante 24-48 horas en aerobiose.
4. Engadir 0,5 ml (5 gotas) do reactivo de Kovacs ó medio de cultivo e ler.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



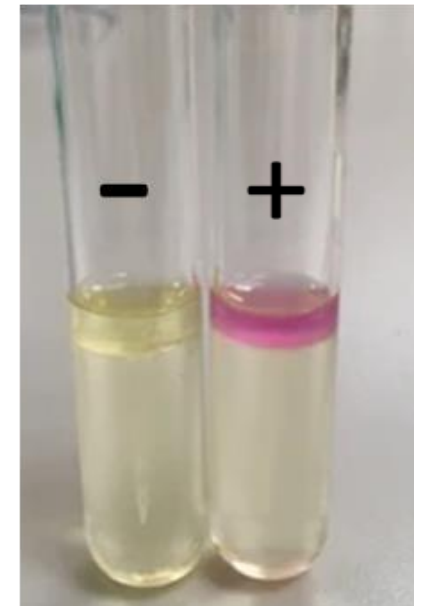
1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

PROBA DO INDOL

➤ Resultados:

Lectura: hai m.o que presentan unha hidrólise tardía da urea, despois das 24 horas, por eso ás veces se fan lecturas despois de varios días (ata 7 días).

1. Aparición dun anel de cor entre rosa e vermello \Rightarrow a bacteria en estudo **produce triptofanasa** \Rightarrow **proba positiva**. Exemplo: *E. coli*.
2. Ausencia de cambio de cor do medio (permanece amarelo pálido) \Rightarrow a bacteria **non produce triptofanasa** \Rightarrow **proba negativa**. Exemplo: *K. pneumoniae*.



Resultados da lectura da proba do indol.

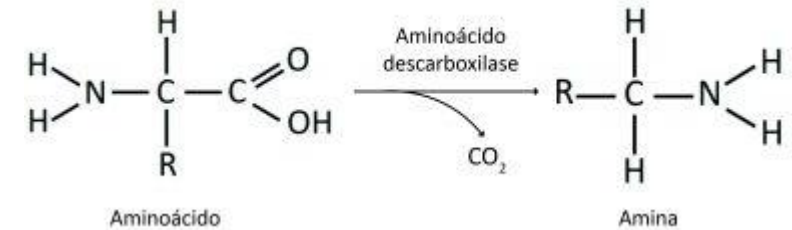
1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

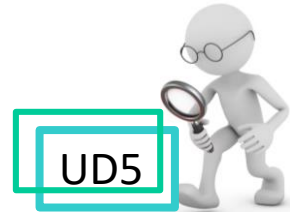
1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

PROBA DAS DESCARBOXILASAS

- Valora a capacidade de producir a enzima **descarboxilasa** en bacterias anaerobias. A enzima actúa sobre o extremo carboxilo do aminoácido liberando unha molécula de CO_2 e formando a correspondente amina.
- Os estudos céntranse en se a bacteria é capaz de levar a cabo reaccións de descarboxilación sobre tres aminoácidos en concreto: **arxinina**, **lisina** e **ornitina** (aas. relacionados co ciclo da urea). A produción destas enzimas é inducida cando se cultiva o m.o co substrato adecuado (glucosa) xerando un ambiente ácido.
- Os medios de cultivo que se utilizan incorporan **dous indicadores de pH**, o **vermello de cresol** que vira de cor en pH ácido e o **púrpura de bromocresol** que vira de cor en pH básico. Isto é necesario porque o medio leva glucosa e a súa fermentación nun primeiro momento, acidificará o medio producindo un cambio de cor cara a amarelo, pero se a bacteria produce a descarboxilación do aa. incorporado no medio entón agora o medio basificarase, e cambiará a cor violeta.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS

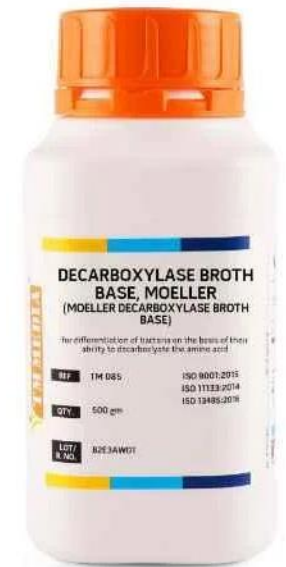


1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

PROBA DAS DESCARBOXILASAS

➤ Procedemento:

1. Preparar catro tubos con **caldo base para descarboxilasas de Moeller** (medio con dous indicadores de pH e de cor violeta). Este medio está dispoñible tamén en formato sólido (agar), neste caso faremos a inoculación do medio por picadura e xa non necesitamos cubrir con parafina ou aceite.
2. Deixar un tubo só con medio e ós outros tres, engadirlle a cada un deles un aa.: arxinina, lisina e ornitina. Marcar os tubos indicando o aa. que conteñen.
3. Inocular os catro medios e cubrilos con vaselina ou aceite de parafina estéril.
4. Incubar a 35 ± 2 °C durante 48 horas en aerobiose.



Caldo base de Moeller.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

PROBA DAS DESCARBOXILASAS

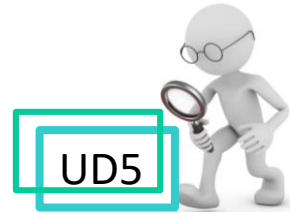
➤ Resultados:

1. Hai un cambio inicial de cor de violeta a amarelo e despois outra vez a violeta \Rightarrow a bacteria en estudo **produce descarboxilasa** \Rightarrow **proba positiva**. Exemplo: *K. pneumoniae* para lisina.
2. Sen cambio de cor ou o medio cambia de cor violeta a cor amarela ou amarela-verdosa, pero non vira de novo a vor violeta \Rightarrow a bacteria **non produce descarboxilasa** \Rightarrow **proba negativa**. Exemplo: *K. pneumoniae* para arxinina e ornitina.



Resultados para *K. pneumoniae*.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

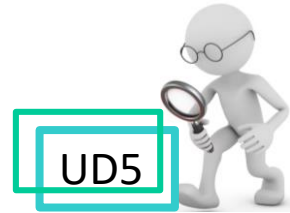


1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

PROBA DA FENILALANINA DESAMINASA

- Valora a capacidade de producir a enzima **fenilalanina desaminasa** nas bacterias en estudo.
- Esta enzima desamina a fenilalanina producindo ácido fenilpirúvico. Este produto podemos detectalo no medio de cultivo porque reacciona co cloruro férrico producindo un composto de cor verde intensa.
- Esta proba utilízase para diferenciar os xéneros *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* (fenilalanina desaminasa positivas) doutras enterobacterias (fenilalanina desaminasas negativas).

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

PROBA DA FENILALANINA DESAMINASA

➤ Procedemento:

1. Preparar medio agar fenilalanina en tubo inclinado.
2. Sementar por estría en superficie o pico de flauta.
3. Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas en aerobiose.
4. Engadir unhas gotas de solución acuosa de cloruro férrico ó 10% e facer a lectura dentro dos 5 minutos seguintes. A reacción ten lugar normalmente no primeiro minuto, pero **hai que estar atento porque a cor é inestable e aclárase con rapidez.**

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

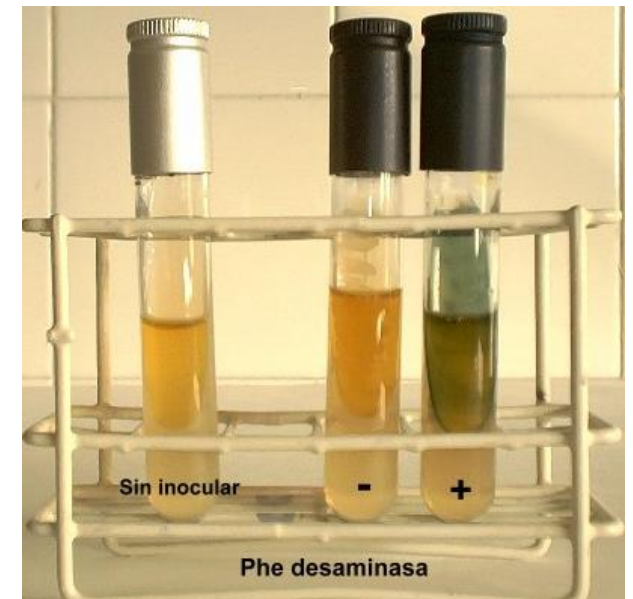
UD5

1.5 ESTUDO DA DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS.

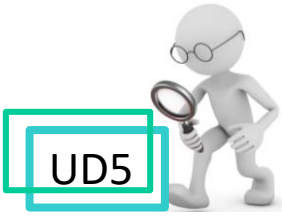
PROBA DA FENILALANINA DESAMINASA

➤ Resultados:

1. Desenvolvemento dunha cor verde pálida a intensa no pico de flauta ou no líquido de condensación \Rightarrow a bacteria en estudo **produce fenilalanina desaminasa** \Rightarrow **proba positiva**. Exemplo: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*.
2. Sen cambio de cor, o medio permanece amarelo debido á cor do reactivo \Rightarrow a bacteria **non produce fenilalanina desaminasa** \Rightarrow **proba negativa**. Exemplo: *K. pneumoniae*, *E. coli*.



1. PRuebas Bioquímicas

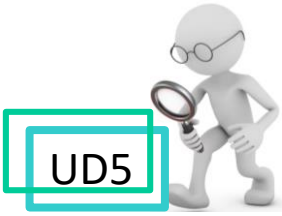


1.6 Detección de Exoenzimas.

Prueba de LAP (leucinoaminopeptidasa)

- Valora a capacidade de producir a enzima **leucina aminopeptidasa** nas bacterias en estudo.
- Esta proba utilízase para diferenciar cocos Gram positivos e catalasa negativos non produtores de β -hemólise, en base a súa capacidade leucoaminopeptidasa. Diferencia entre *Aerococcus* e *Leuconostoc* (leucoaminopeptidasa negativos) de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus* (leucoaminopeptidasa positivos).
- Trátase dunha proba simple e rápida: os m.o que producen a enzima hidrolizan un sustrato impregando nuns discos LAP (leucina- β -naftilamida) liberando β -naftilamina que reacciona co reactivo N,N-dimetilamino cinamaldehído formando un **compuesto de cor rosada ou avermellada**.

1. PRuebas Bioquímicas



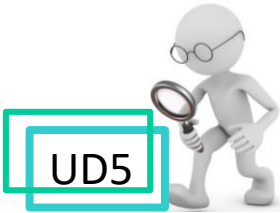
1.6 Detección de Exoenzimas.

Prueba de LAP (Leucinoaminopeptidasa)

➤ Procedemento:

1. A partir dun cultivo puro en agar sangue do m.o en estudo (coco G+, catalasa negativo), facer unha solución densa en 50 μ L de soro fisiolóxico estéril.
2. Agregar un disco LAP.
3. Incubar a 35 ± 2 °C durante 30 minutos en aerobiose.
4. Agregar dúas gotas do reactivo cinamaldehído e deixar a temperatura ambiente outros 5 minutos.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

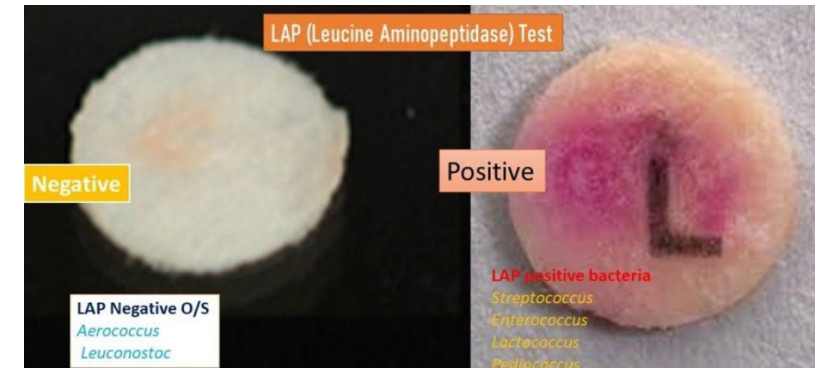


1.6 DETECCIÓN DE EXOENZIMAS.

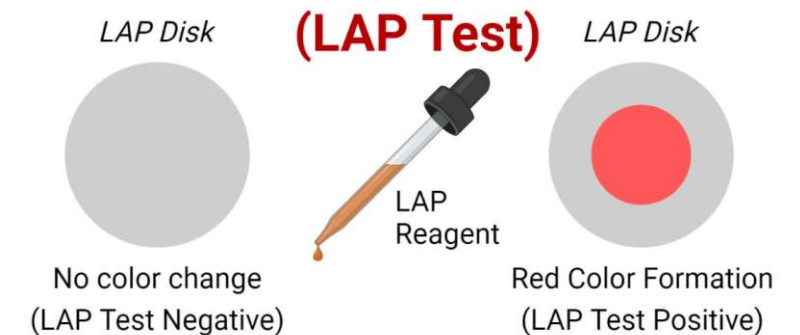
PROBA DE LAP (leucinoaminopeptidasa)

➤ Resultados:

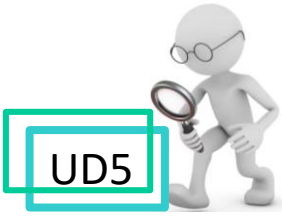
1. Se o disco toma unha cor rosada ou vermella ⇒ a bacteria en estudo **produce leucoaminopeptidasa** ⇒ **proba LAP positiva**. Exemplo: *Enterococcus faecalis*.
2. Se o disco permanece de cor amarelo ou incoloro ⇒ a bacteria **non produce leucoaminopeptidasa** ⇒ **proba LAP negativa**. Exemplo: *Leuconostoc*.



Leucine Aminopeptidase Test



1. PRUBAS BIOQUÍMICAS

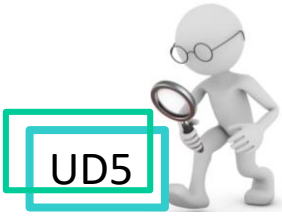


1.6 DETECCIÓN DE EXOENZIMAS.

PROBA DE PYR (pirrolidonil arilamidasa)

- Esta proba detecta a actividade enzimática pirrolidonil arilamidasa.
- Permite diferenciar estreptococos do grupo A, e enterococos doutras enterobacterias.
- Proba rápida utilizada para a identificación sobre todo de *S. pyogenes* e *Enterococcus* spp. (PYR+). Tamén se pode utilizar na identificación de *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus scheleiferi*, que son PYR positivos.
- Utilízanse discos de papel de filtro impregnados no sustrato L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR), que serve para detectar a actividade da pirrolidonil arilamidasa. Unha vez que a enzima hidroliza o sustrato engádese o reactivo ρ -dimetilaminocinamaldehído (revelador de cor) resultando un produto de cor vermella.

1. PRuebas Bioquímicas



1.6 Detección de Exoenzimas.

Prueba de PYR (pirrolidonil arilamidasa)

➤ Procedimiento:

1. A partir dun cultivo puro en agar sangue do m.o en estudo (coco G+, catalasa negativo), facer unha solución densa en 50 μ L de soro fisiolóxico estéril.
2. Agregar un disco PYR.
3. Incubar a 35 ± 2 °C durante 30 minutos en aerobiose. (para *Staphylococcus* débese incubar segundo algúns autores durante 2 horas).
4. Agregar dúas gotas do reactivo cinamaldehído e deixar a temperatura ambiente outros 5 minutos.

1. PRUBAS BIOQUÍMICAS

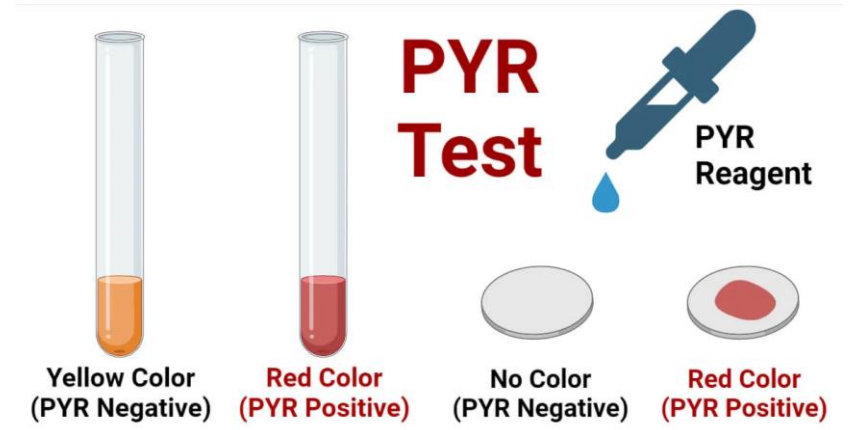
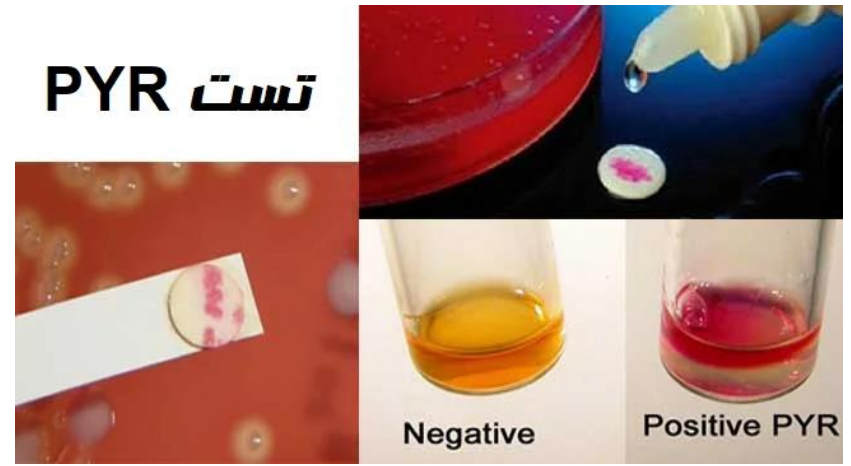
UD5

1.6 DETECCIÓN DE EXOENZIMAS.

PRUBA DE PYR (pirrolidonil arilamidasa)

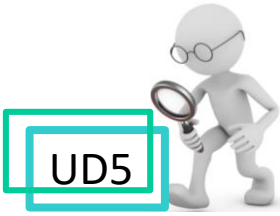
➤ Resultados:

1. Se o disco toma unha cor rosada ou vermella ⇒ a bacteria en estudo **produce pirrolidonil arilamidasa** ⇒ **proba PYR positiva**. Exemplo: *Enterococcus* spp., *S. pyogenes* (estreptococo grupo A).
2. Se o disco permanece de cor amarelo ou incoloro ⇒ a bacteria **non produce pirrolidonil arilamidasa** ⇒ **proba PYR negativa**. Exemplo: *E. coli*.



Resultados proba PYR

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.6 DETECCIÓN DE EXOENZIMAS.

PROBA DA COAGULASA

- Esta proba permite detectar a actividade **coagulasa** presente nalgunhas bacterias.
- A enzima coagulasa pode presentarse como enzima extracelular ou unida á parede celular. É capaz de provocar a coagulación de plasma (transforma o fibrinóxeno en fibrina).
- Esta proba utilízase para diferenciar *S. aureus* (coagulasa +) doutras especies de *Staphylococcus* (coagulasa negativos).
- Hai unha proba rápida en porta que só detecta a coagulasa libre, esta proba é inmediata, pero se queremos detectar tanto a coagulasa libre como a unida á parede debemos facer a proba en tubo e esperar ata 4 horas.



Proba da coagulasa en tubo e en porta.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.6 DETECCIÓN DE EXOENZIMAS.

PROBA DA COAGULASA

➤ Procedemento:

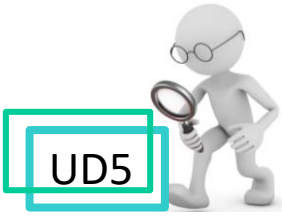
1. Colocamos 5 ml de plasma estéril de coello nun tubo ó que engadiremos 0,5 ml. de mostra en cultivo líquido de 24 horas.
2. Mezclar por rotación, non axitar.
3. Incubar a 35 ± 2 °C durante 4 horas en aerobiose.

➤ Resultados:

1. Se se observa algún coágulo \Rightarrow a bacteria en estudo **produce coagulasa \Rightarrow proba positiva.** Exemplo: *S. aureus*.
2. Se non se observan coágulos \Rightarrow a bacteria **non produce coagulasa \Rightarrow proba negativa.** Exemplo: *S. epidermidis*.



1. PRuebas Bioquímicas

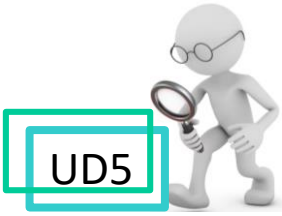


1.6 Detección de Exoenzimas.

Prueba da DNAsa

- Esta proba detecta a actividade DNAsa sobre un medio de cultivo sólido que contén ADN (agar DNAsa).
- Permite diferenciar entre especies de estafilococos, e tamén entre *Serratia* spp. (DNAsa +) de *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (DNAsa negativos).
- Utilízase para facer o cultivo un agar DNAsa que contén ADN altamente polimerizado, o cal resultará degradado pola acción da DNAsa producida polo m.o en estudo.
- Para revelar os resultados engádese ácido clorhídrico 1N as placas de agar tras o periodo de incubación.

1. PRuebas Bioquímicas



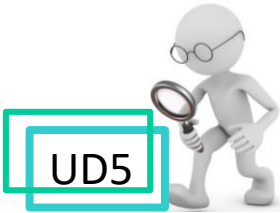
1.6 Detección de Exoenzimas.

Prueba da DNAsa

➤ Procedemento:

1. Inocular unha placa de agar DNAsa co m.o en estudo. Depositando unha ou dúas colonias en forma de botón, nun punto.
2. Incubar durante 24-48 horas en aerobiose a:
 - 35 ± 2 °C para *Staphylococcus* spp. e para *Moraxella* spp.
 - 25 ± 2 °C para *Entobacteriaceae* e *Vibrionaceae*.
 - $25-30 \pm 2$ °C para bacilos G+ non fermentadores.
3. Inundar a placa con ácido clorhídrico 1N e esperar 2 minutos. O ácido clorhídrico reacciona co ADN non alterado para formar un precipitado turbio.

1. PRuebas Bioquímicas



1.6 Detección de Exoenzimas.

Prueba de DNasa

➤ Resultados:

1. Se observa un halo transparente ó redor da zona inoculada ⇒ a bacteria en estudo **produce DNasa** ⇒ **prueba positiva**. Exemplo: *S. aureus*, *Serratia marcescens*.
2. Se non se observa halo, o medio permanece opaco ó redor do punto de inoculación ⇒ a bacteria **non produce DNasa** ⇒ **prueba negativa**. Exemplo: *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*.



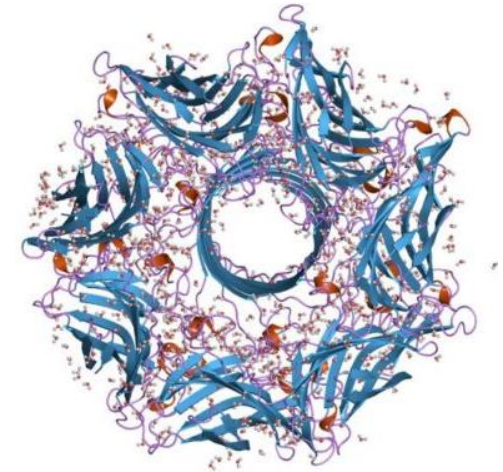
1. PRuebas Bioquímicas

UD5

1.6 Detección de Exoenzimas.

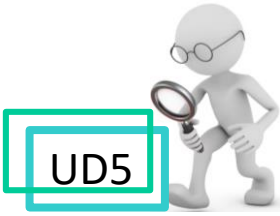
Prueba das Hemolisinas

- Esta proba detecta a produción de **hemolisinas** polas bacterias en estudo.
- As hemolisinas son unhas proteínas sintetizadas por algunhas bacterias, capaces de integrarse na parede celular dos eritrocitos e formar poros, provocando a saída de contido celular e a entrada de agua e a consecuente lisis celular.
- Para poder evidenciar a presenza da produción de hemolisinas, o cultivo farase nun agar con sangue.
- As hemolisinas poden ser de **tipo α** , que producen a lise parcial dos eritrocitos orixinando un halo verdoso ó redor da colonia, produto da oxidación da hemoglobina a metahemoglobina polo peróxido de hidróxeno producido polas bacterias; de **tipo β** que implica a lise total dos eritrocitos e aparece un halo transparente ó redor da colonia, ou **tipo γ** que non produce lise dos eritrocitos.



Estructura molecular de una Hemolisina (Fuente: Jawahar Swaminathan and MSD staff at the European Bioinformatics Institute [Public domain] vía Wikimedia Commons)

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.6 DETECCIÓN DE EXOENZIMAS.

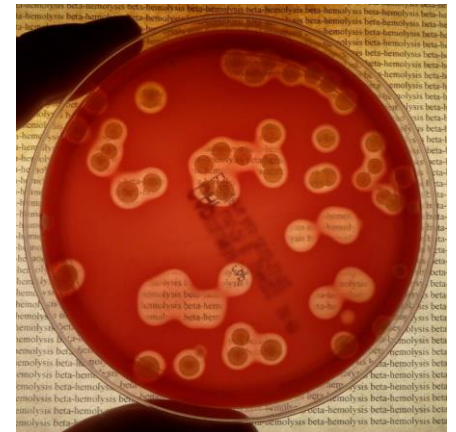
PROBA DAS HEMOLISINAS

➤ Procedemento:

1. Realízase unha sementeira por esgotamento en agar sangue.
2. Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas en aerobiose (aínda que este dato podería variar en función do m.o en estudo).

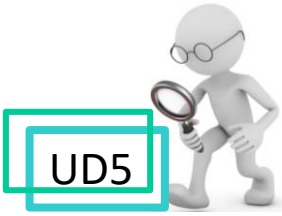
➤ Resultados:

1. Se se observa un **halo verdoso** ó redor das colonias \Rightarrow a bacteria en estudo **produce hemolisina tipo α** \Rightarrow **proba positiva**. Exemplo: *Streptococcus pneumoniae*.
2. Obsérvase un **halo transparente** ó redor da colonia \Rightarrow a bacteria **produce hemolisina tipo β** \Rightarrow **proba positiva**. Ex.: *Streptococcus pyogenes*.
3. Se non se observa halo, o medio permanece sen cambios ó redor do punto de inoculación \Rightarrow a bacteria **non produce hemolisina** \Rightarrow **proba negativa**.



β -hemólise.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

PROBA DE SENSIBILIDADE Á OPTOQUINA

- A optoquina é un antibiótico derivado da quinina.
- Utilízase para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* doutras especies de estreptococos α -hemolíticos, como por exemplo *Streptococcus* grupo viridans.
- A optoquina inhibe o desenvolvemento de *S. pneumoniae* pero non o doutros estreptococos α -hemolíticos

➤ Procedemento:

1. Realízase unha sementeira en céspede con hisopo embebido nun cultivo puro, sobre un agar sangue (5-10% sangue de carneiro).
2. Colócase un disco de optoquina sobre o sementado.
3. Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas en atmósfera cun 5-10% de CO₂.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

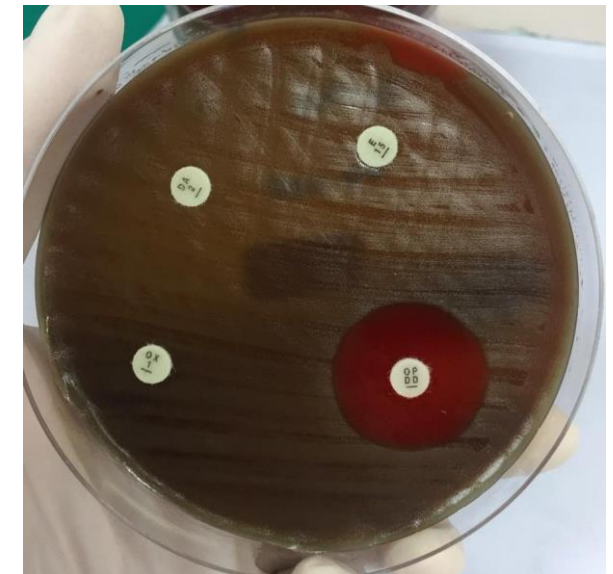
1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

PROBA DE SENSIBILIDADE Á OPTOQUINA

➤ Resultados:

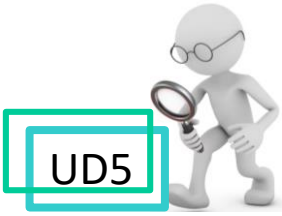
1. Se non se observa un halo transparente ó redor da zona inoculada \Rightarrow a bacteria é resistente á optoquina. Exemplo: *Streptococcus salivarius*.
2. Se se observa halo, cun diámetro \geq a 14 mm \Rightarrow a bacteria é sensible á optoquina \Rightarrow esto supón unha identificación presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*.
3. Se se observa halo, cun diámetro inferior a 14 mm \Rightarrow a proba non é concluínte. Habería que facer probas adicionais.

Algunhas cepas de *S. pneumoniae* non son inbidas pola optoquina.



S. Pneumoniae optoquina sensible.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

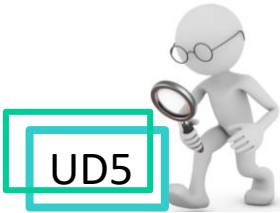
PROBA DE SENSIBILIDADE Á BACITRACINA

- A bacitracina é un antibiótico que inhibe a síntese da parede bacteriana.
- A proba de sensibilidade a bacitracina permite discriminar entre os *Streptococcus* β -hemolíticos do grupo A (sensibles) do resto de *Streptococcus* β -hemolíticos (resistentes).

➤ Procedemento:

1. Realizar unha suspensión do cultivo puro de turbidez igual ó estándar 0,5 McFarland.
2. Realizar unha sementeira en céspede con hisopo embebido nun cultivo puro, sobre un agar sangue (5-10% sangue de carneiro).
3. Colocar un disco de bacitracina sobre o sementado.
4. Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas en atmósfera cun 5-10% de CO₂.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

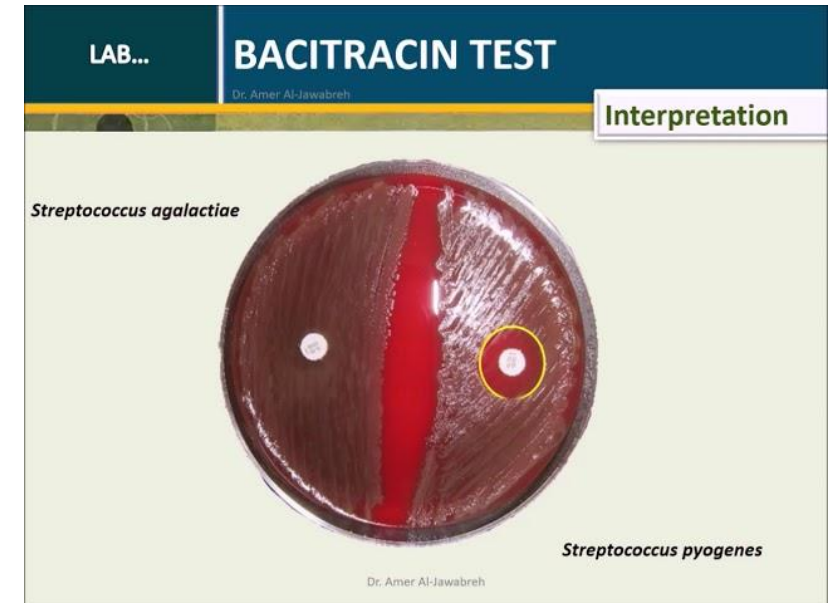


1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

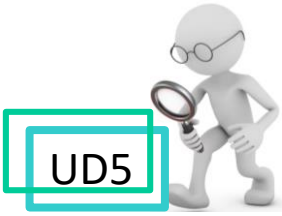
PROBA DE SENSIBILIDADE Á BACITRACINA

➤ Resultados:

1. Se non se observa un halo transparente ó redor da zona inoculada \Rightarrow a **bacteria é resistente á bacitracina**. Exemplo: *Streptococcus agalactiae*.
2. Se se observa halo de inhibición \Rightarrow a **bacteria é sensible á bacitracina** \Rightarrow esto supón unha identificación presuntiva de *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A. Ex.: *S. pyogenes*.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS

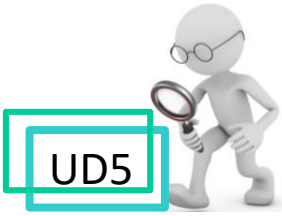


1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

PROBA DA SOLUBILIDADE EN BILIS

- As sales biliares provocan un descenso da tensión superficial e inducen a activación de certas enzimas autolíticas presentes nalgunhas especies bacterianas.
- En concreto interesa a activación dunha enzima autolítica, unha amidasa intracelular, presente en *Streptococcus pneumoniae*, que provoca a lise bacteriana. Isto permite diferenciar *S. pneumoniae* doutros estreptococos α -hemolíticos.
- Para esta proba utilízase un sal biliar: o [desoxicolato de sodio](#).
- A proba pode realizarse sobre cultivo en medio sólido ou en medio líquido.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

PROBA DA SOLUBILIDADE EN BILIS

➤ Procedemento:

1. Proba en placa:

- Pártese dun cultivo fresco, da bacteria en estudo, en agar sangue ou agar chocolate.
- Engadir directamente sobre as colonias sospeitosas na placa de cultivo, unha gota de desoxicolato de sodio ó 10%.
- Incubar en estufa a 35°C ou a temperatura ambiente durante 15 minutos.

2. Proba en tubo:

- Preparar 0,5 ml dunha solución da bacteria con solución salina cunha turbidez equivalente a 0,5 McFarland.
- Repartir a solución en 2 tubos, 0,25 ml en cada un. A un deles engadirlle 0,25 ml de desoxicolato de sodio ó 2% e ó outro 0,25 ml de solución salina.
- Incubar a 35°C de 30 minutos a 2 horas.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

PROBA DA SOLUBILIDADE EN BILIS

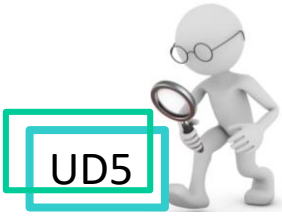
➤ Resultados:

1. **Método en placa:** se pasado o tempo de incubación as colonias desaparecen debido á lise celular ⇒ **proba positiva** ⇒ *Streptococcus pneumoniae*.
2. **Método en tubo:** se pasado o tempo de incubación se observa aclaramento no tubo que contén o desoxicolato de sodio, debido á lise celular ⇒ **proba positiva** ⇒ *Streptococcus pneumoniae*.



Aclaramento no tubo da dereita, o que implica lise celular e polo tanto identificación presuntiva de *S. pneumoniae*.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE

PROBA DE CRECEMENTO EN CALDO HIPERSALINO

- Esta proba básase na capacidade dalgunhas bacterias de medrar en presenza de altas concentracións de cloruro sódico, por encima do 6,5% de NaCl.
- O medio de cultivo que se utiliza é o **agar Manitol salgado**, dispoñible en caldo ou agar, que ademais dunha alta concentración de sal, leva como carbohidrato fermentable o manitol e un indicador de pH, polo tanto será un medio selectivo, debido á concentración de sal, e diferencial en base á capacidade de fermentación do manitol.
- Este medio utilízase para a identificación presuntiva de *Staphylococcus*.

1. PRuebas Bioquímicas

UD5

1.7 Pruebas de Sensibilidad

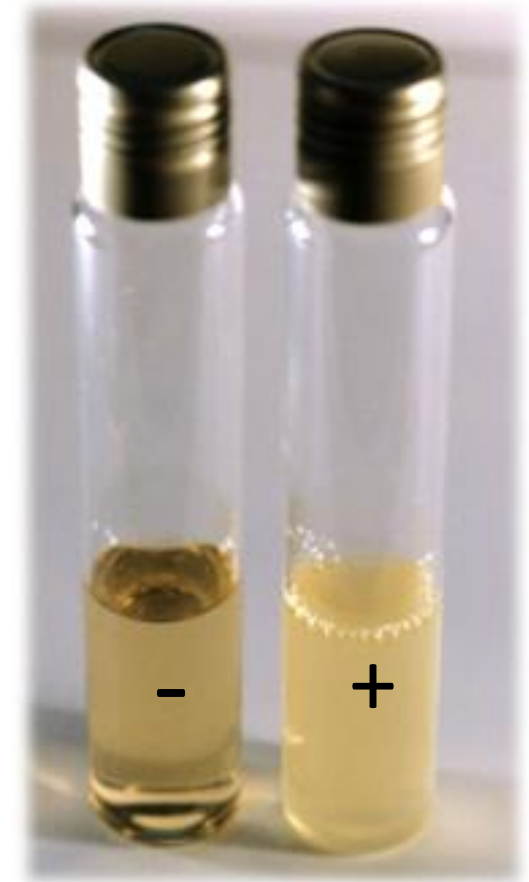
Prueba de Crecimiento en Caldo Hipersalino

➤ Procedimiento:

1. Sementar unha colonia fresca en medio hipersalino agar ou caldo.
2. Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas.

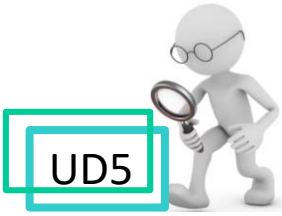
➤ Resultados:

1. **Cultivo en medio sólido:** crecimiento de colonias \Rightarrow **prueba positiva**
 \Rightarrow identificación presuntiva de *Staphylococcus*.
2. **Cultivo en medio líquido:** aparición de turbidez \Rightarrow **prueba positiva**
 \Rightarrow identificación presuntiva de *Staphylococcus*.



A aparición de turbidez indica crecimiento bacteriano.

1. PRBAS BIOQUÍMICAS



1.8 SISTEMAS COMERCIAIS MULTIPROBAS

GALERÍAS MULTIPROBA

- Son sistemas de probas agrupados, que constan de 10 a 50 celdiñas individualizadas, cada unha delas cun sustrato liofilizado diferente. Algunhas poden incluír tamén probas de sensibilidade a certos antimicrobianos.
- Permiten un gran aforro de tempo e de espazo, pero son sistemas caros.
- Existen diferentes sistemas multiproba no mercado, algún dos máis coñecidos e utilizados son:
 - Galerías API (BioMérieux)
 - Galerías Enterotube (distribuídas en España por Liofilchem)
 - MicroID (Remel)
 - Oxi/Ferm Tube (BD)
 - Etc.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS

UD5

1.8 SISTEMAS COMERCIAIS MULTIPROBAS

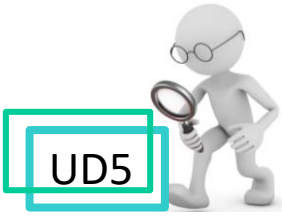
GALERÍAS MULTIPROBA

➤ Procedemento:

1. Inocular cultivo puro fresco (24 horas) en cada un dos pocillos segundo as instrucións do fabricante.
2. Engadir reactivo revelador naqueles pocillos que indique o fabricante.
3. Incubar segundo as instrucións do fabricante.
4. Proceder á lectura de cada proba e anotar a secuencia de díxitos que resultan da lectura de cada tres pocillos, para conformar o código numérico correspondete ó m.o problema.



1. PROBAS BIOQUÍMICAS



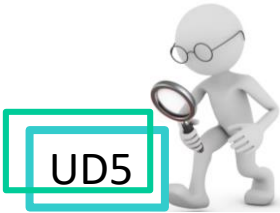
1.8 SISTEMAS COMERCIAIS MULTIPROBAS

GALERÍAS MULTIPROBA

➤ **Resultados:**

- Hai distintos kits de probas comerciais no mercado, pero en xeral o método de interpretación dos resultados é similar:
 - As probas agrúpanse de tres en tres, levando cada unha un número xusto debaixo do pocillo, que se irá anotando naqueles casos en que a reacción dea positivo. Súmanse os números obtidos cada tres probas. Co conxunto de díxitos ordeados, resultado da lectura dos diferentes grupos de tres pocillos, fórmase un código que consultando a base de datos do fabricante nos dará unha identificación do m.o en estudo.

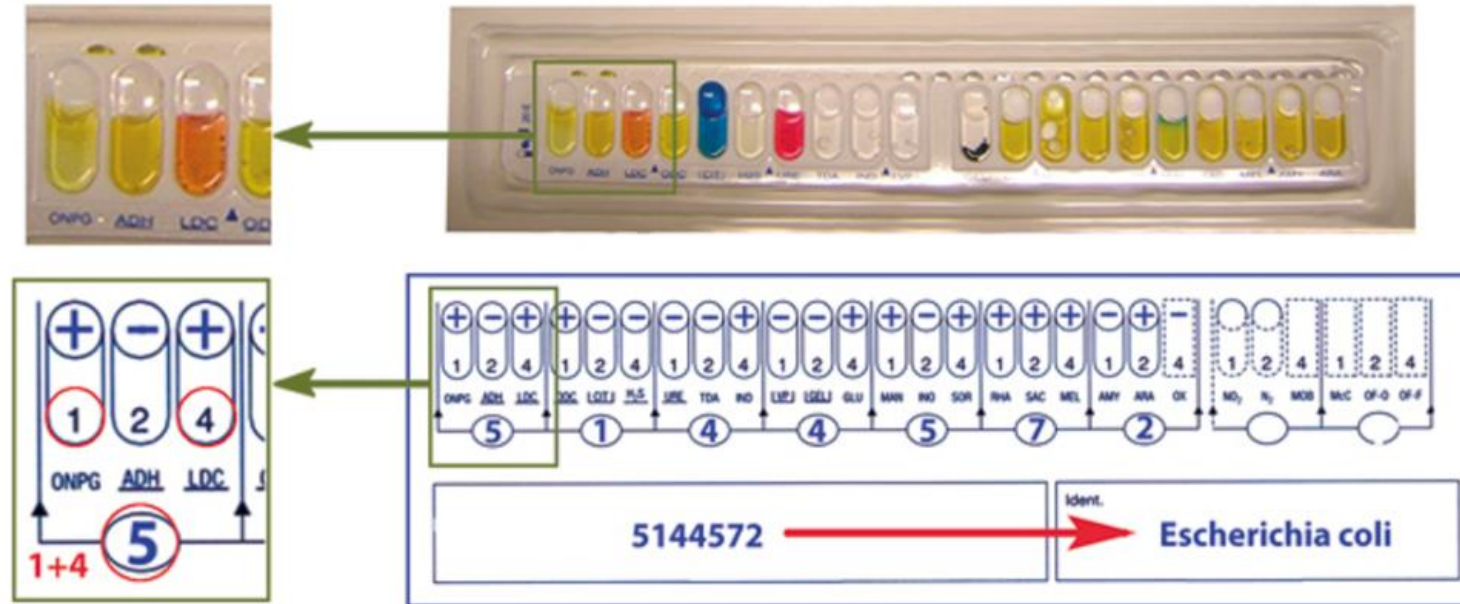
1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.8 SISTEMAS COMERCIAIS MULTIPROBAS

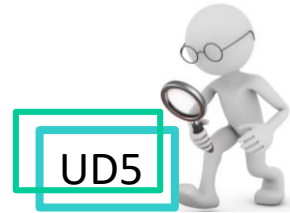
GALERÍAS MULTIPROBA

Exemplo de lectura de galería multiproba.



Galería API de BioMérieux. Inocúlase cada celdiña e anótase o resultado da proba, positivo ou negativo. A continuación súmanse os resultados das probas positivas para cada grupo de tres probas, e o número resultante pasa a formar parte do código numérico que identificará o m.o en estudo, que podemos consultar na base de datos do fabricante.

1. PROBAS BIOQUÍMICAS



1.8 SISTEMAS COMERCIAIS MULTIPROBAS

SISTEMAS COMERCIAIS AUTOMATIZADOS

- Trátase de equipos que utilizan galerías multiproba onde os procesos de inoculación, incubación e lectura están automatizados.
- A identificación bacteriana presenta un alto grao de fiabilidade.
- Moitos destes sistemas incorporan ademais das probas bioquímicas, probas de resistencia a antimicrobianos.
- Algúns destes sistemas disponibles no mercado son:
 - MicroScan®
 - ViTek®
 - ATB®
 - Pasco®
 - Etc.

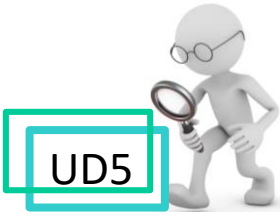


Identificación bioquímica mediante sustratos clásicos

Determinación de resistencia y susceptibilidad de hasta 32 antibióticos

Panel multiproba de MicroScan

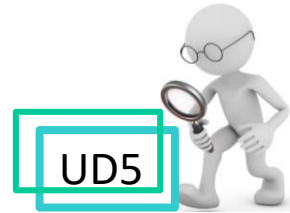
2. MÉTODOS INMUNOLÓXICOS E MOLECULARES



2.1 MÉTODOS INMUNOLÓXICOS

- Ademais de probas bioquímicas para a identificación dos m.o, tamén se poden identificar detectando os antíxenos que expresan na súa superficie ou os anticorpos específicos producidos polo hóspede infectado.
- As técnicas inumolóxicas ou inmunoensaio baséanse na **detección dos inumunocomplexos** que se forman in vitro, como consecuencia da reacción antígeno-anticorpo.
- Unha das mostras biolóxicas máis utilizadas nas técnicas de inumodiagnóstico é o **soro**, xa que é aí onde podemos illar os anticorpos circulantes, desenvolvidos fronte ós antígenos do patóxeno que está provocando a infección.
- Os antígenos bacterianos utilizados para a tipificación e identificación do m.o son: o **antígeno capsular K**, o **antígeno somático O** e o **antígeno flagelar H**.
- Cada m.o expresará uns antígenos de superficie específicos e distintivos, o que determinará o **serotipo** ou **serovar** ó que pertence.

2. MÉTODOS INMUNOLÓXICOS E MOLECULARES



2.1 MÉTODOS INMUNOLÓXICOS

TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN

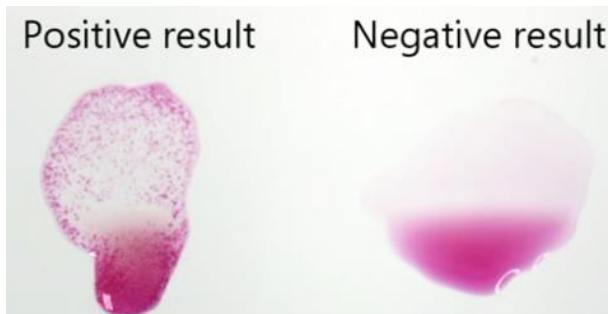
- Básanse na capacidade de unión dos antíxenos ó seu anticorpo complementario formando inmunocomplexos ou agregados que poden visualizarse a simple vista.
- Algúns exemplos deste grupo de técnicas:
 - Proba rápida de aglutinación en placa para o diagnóstico de brucelose (**proba rosa de Bengala**).
 - Proba de aglutinación en látex para detectar anticorpos ASO ou ASLO (anticorpos fronte a estreptolisina O producida por estreptococos do grupo A, como *S. pyogenes*).
 - Proba da hemaglutinación indirecta (HAI) para detectar anticorpos fronte a *Toxoplasma gondii*.
 - Proba da inhibición da hemaglutinación (IHA) para o diagnóstico da rubeola.

2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

UD5

2.1 MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

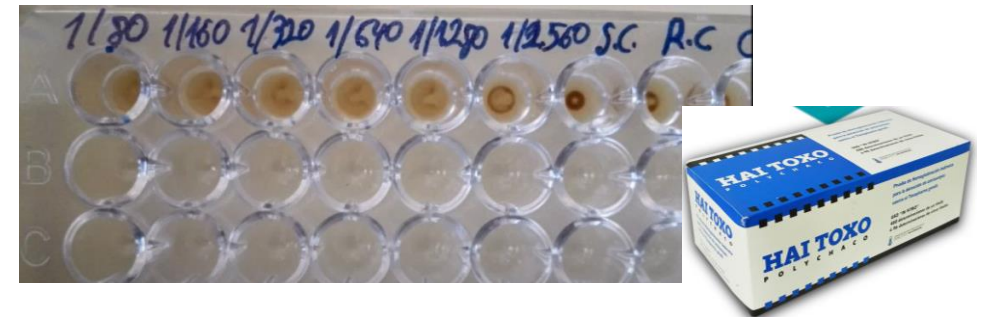
TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN



Proba de aglutinación en porta para a Brucelose. Técnica de rosa de Bengala. Colócase unha gota dunha suspensión de *Brucella*, á que se lle engadiu o colorante rosa de Bengala, nun porta e despois mézclase cunha gota de soro do paciente. Se hai aglutinación \Rightarrow proba positiva.

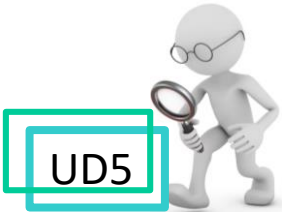


Proba de aglutinación utilizando partículas de látex recubertas de anticorpos específicos para os diferentes antígenos somáticos (O) dos *Streptococcus*. Neste caso o que se detecta é o antígeno dos patóxenos na mostra biolóxica. Presenza de aglutinación \Rightarrow proba positiva.



Proba de hemaglutinación indirecta (HAI) para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii*. Utilízase o soro do paciente en diferentes graos de dilución eponse en contacto con eritrocitos sensibilizados con antígenos somáticos e/ou citoplasmáticos de *T. gondii*. Presenza de aglutinación \Rightarrow proba positiva.

2. MÉTODOS INMUNOLÓXICOS E MOLECULARES



2.1 MÉTODOS INMUNOLÓXICOS

ELISA (inmunoadsorción ligada a enzimas)

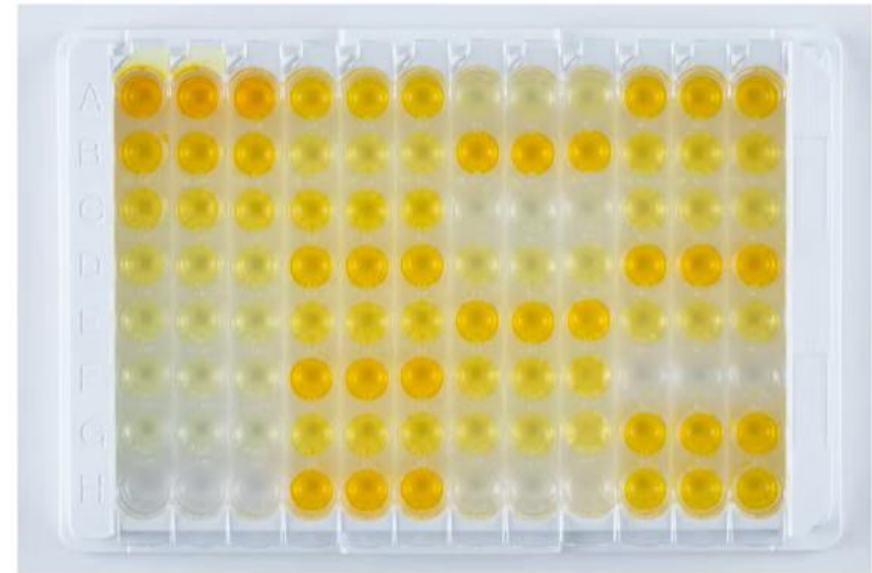
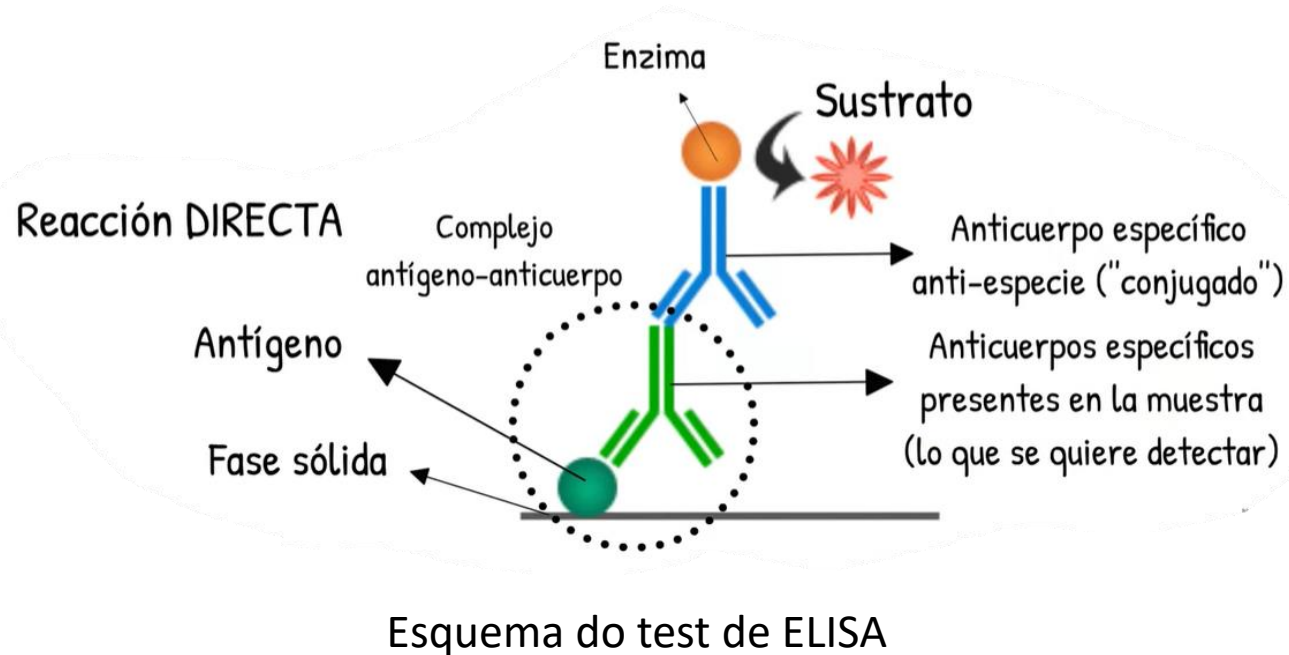
- Esta técnica utiliza antígenos acoplados con una enzima e inmovilizados sobre un soporte.
- A este soporte engádesse o soro problema, e se nesa mostra están presentes os anticorpos específicos fronte ó antígeno inmovilizado no soporte, levarase a cabo unha reacción antígeno-anticorpo.
- Para poder evidenciar a unión entre antígeno e anticorpo, adiciónase ó soporte un sustrato cromoxénico que ó ser metabolizado pola enzima dará como resultado un produto coloreado.
- Os resultados lense cun espectrofotómetro ou un colorímetro.

2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

UD5

2.1 MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

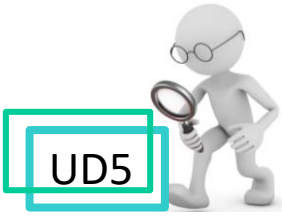
ELISA (inmunoadsorción ligada a enzimas)



Resultados test de ELISA

<https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=56Pb3Dv32mA> (vídeo explicativo test de ELISA)

2. MÉTODOS INMUNOLÓXICOS E MOLECULARES



2.2 MÉTODOS MOLECULARES

MÉTODOS XENOTÍPICOS

- Identifícase o m.o en base ó seu material xenético.
- O material xenético máis utilizado para a identificación bacteriana é o ARNr 16S. Éste contén secuencias altamente conservadas que se poden correlacionar cun grupo filoxenético determinado.
- A técnica consiste en :
 - Illar e purificar o material xenético dun cultivo puro (tamén se pode facer a partir do ADN obtido directamente da mostra).
 - Amplificalo por PCR.
 - Secuencialo.
 - Comparalo coas bases de datos (bancos de xenomas como GenBank) para obter a identificación.

2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

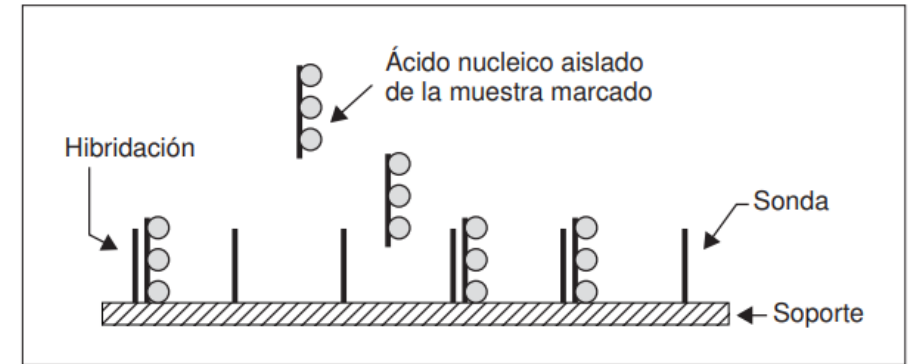
UD5

2.2 MÉTODOS MOLECULARES

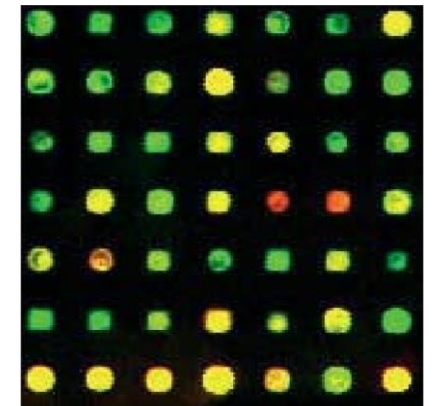
MÉTODOS XENOTÍPICOS

MICROARRAYS (chips de ADN ou ARN)

- Esta técnica permite estudar a expresión de moitos xenes á vez, o que podería ser útil para a identificación de patóxenos nunha infección mixta (polimicrobiana).
- Sobre un soporte (chip) hai adheridas miles de secuencias xénicas, que cando se poñen en contacto co ADN ou ARN da mostra problema, terá lugar unha reacción positiva naqueles casos en que exista complementariedade de bases.
- As reaccións positivas detéctase pola emisión de luz.

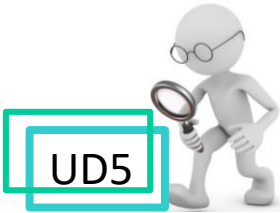


Esquema do fundamento dun chip de ADN ou ARN



Lectura dos xenes presentes na mostra mediante fluorescencia.

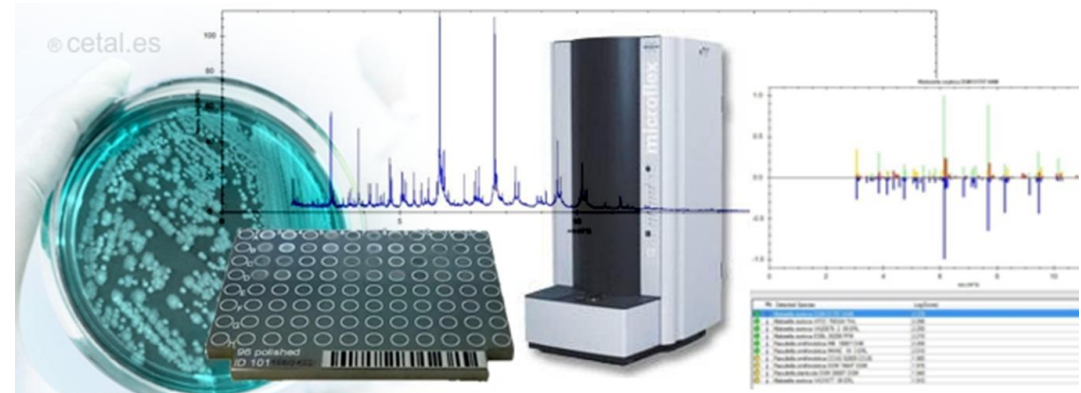
2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES



2.2 MÉTODOS MOLECULARES

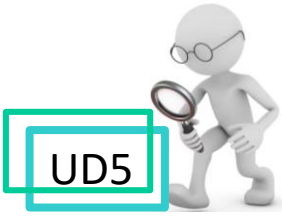
MÉTODOS PROTEÓMICOS: MALDI TOF

- Dentro das múltiples aplicacións da **espectrometría de masas** está a identificación de m.o.
- Trátase dun método fiable e rápido **basado no perfil proteico do m.o.** Utilízanse proteínas altamente conservadas para a identificación.
- Algunhas mostras pódense usar directamente mentres que outras é necesario sometelas a un proceso de extracción para eliminar artefactos. A fase de extracción suele ser necesaria en mostras de hemocultivos positivos, en estudos de fungos filamentosos e dalgunhas micobacterias.



Identificación de m.o mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

2. MÉTODOS INMUNOLÓXICOS E MOLECULARES



2.2 MÉTODOS MOLECULARES

MÉTODOS PROTEÓMICOS: MALDI TOF

➤ Procedemento:

As mostras son analizadas por grupos de tipo de mostra, por exemplo: hemocultivos, exudados, etc.

1. **Asociar cada mostra coa posición do pocillo** na que se deposita na placa, para despois poder identificar cada espectro a qué mostra corresponde.
2. **Cargar as placas.** Se son mostras sólidas, pode facerse depositando $1\mu\text{g}$ aproximadamente cun palillo de madeira e extender ben sobre o pocillo. Para mostras líquidas: depositar con micripipeta $1\mu\text{l}$ de mostra no pocillo.
3. **Cargar o control BTC** (bacterial test standard), que é unha cepa ATCC de *E. coli* con dúas proteínas adicionais, ARNasa e microglobulina, con espectro coñecido. O control suele estar liofilizado, e é necesario reconstituilo, e despois gardar alícuotas a -20°C .
4. **Deixar secar** completamente a placa a T^{a} ambiente.
5. **Engadir a solución matriz** que debe estar na mesma proporción que a mostra (aprox. $1\mu\text{l}$)
6. **Deixar secar** completamente a T^{a} ambiente.
7. **Introducir a placa no equipo.**

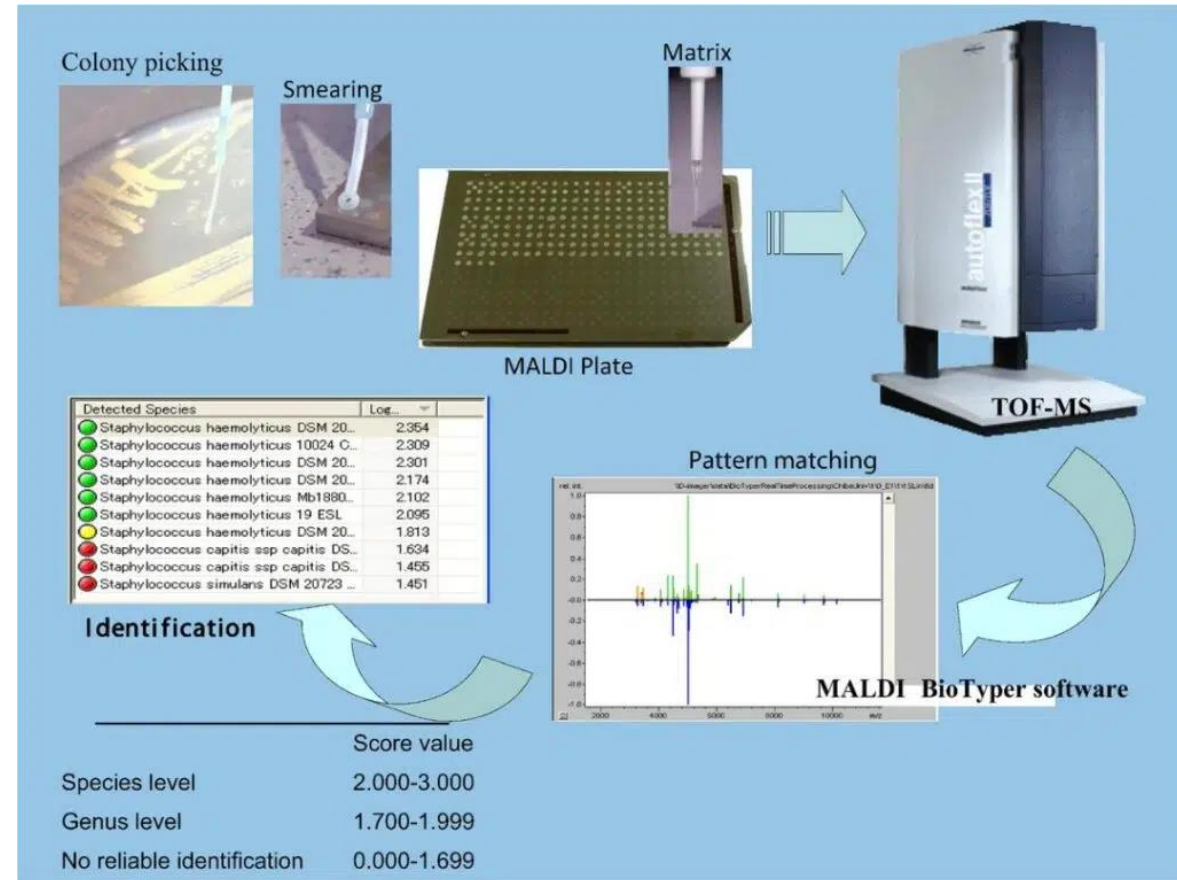
2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

UD5

2.2 MÉTODOS MOLECULARES

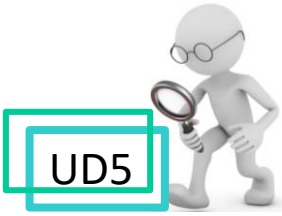
MÉTODOS PROTEÓMICOS: MALDI TOF

➤ Procedemento:



Imaxe esquerda: carga da placa para Maldi Tof. Imaxe da dereita: esquema de traballo.

2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES



2.2 MÉTODOS MOLECULARES

MÉTODOS PROTEÓMICOS: MALDI TOF

➤ Resultados:

- O software do equipo compara os espectros proteicos obtidos dos diferentes pocillos cos espectros da base de datos, e da unha identificación por pocillo (se é posible) cunha puntuación ou *score*, que nos indica o grao de correlación que existe entre os dous espectros.
- Debemos comprobar que a identificación do control é correcta.
- Interpretación do grao de puntuación ou *score*:
 - **Puntuación igual ou superior a 2** \Rightarrow identificación correcta a nivel de xénero e especie.
 - **Puntuación entre 1,5 e 1,9** \Rightarrow identificación correcta a nivel de xénero pero dudosa a nivel de especie.
 - **Puntuación menor de 1,5** \Rightarrow identificación dudosa a nivel de xénero e especie.
 - Non aparece puntuación: o equipo non recoñece o espectro.

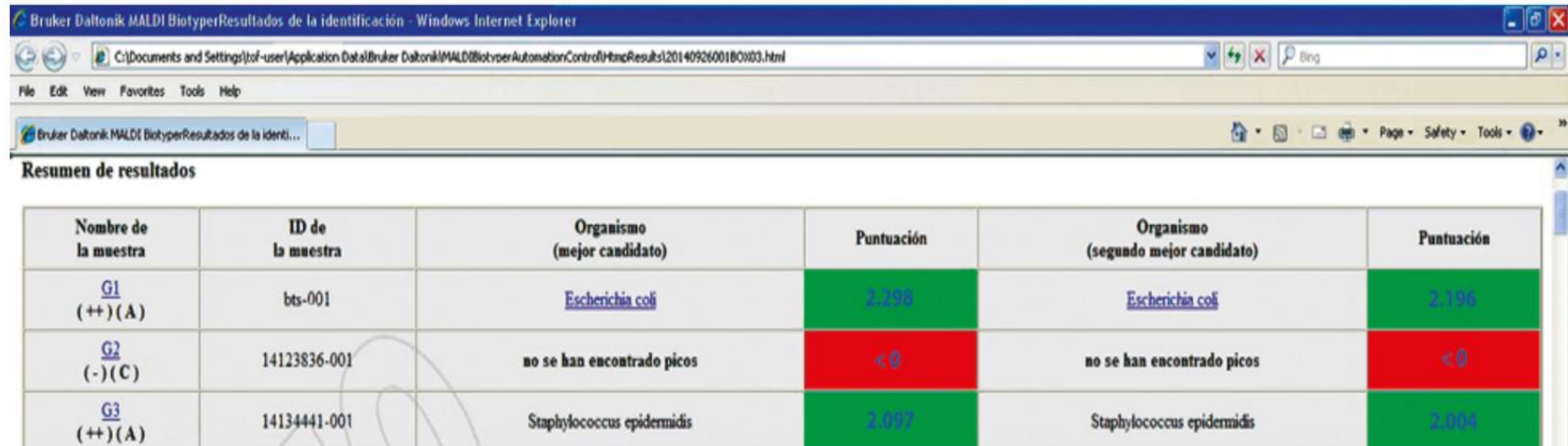
2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

UD5

2.2 MÉTODOS MOLECULARES

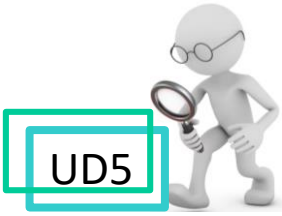
MÉTODOS PROTEÓMICOS: MALDI TOF

➤ Resultados:



Nombre de la muestra	ID de la muestra	Organismo (mejor candidato)	Puntuación	Organismo (segundo mejor candidato)	Puntuación
G1 (++) (A)	bts-001	Escherichia coli	2.298	Escherichia coli	2.196
G2 (-) (C)	14123836-001	no se han encontrado picos	< 0	no se han encontrado picos	< 0
G3 (++) (A)	14134441-001	Staphylococcus epidermidis	2.097	Staphylococcus epidermidis	2.004

2. MÉTODOS INMUNOLÓXICOS E MOLECULARES



2.2 MÉTODOS MOLECULARES

MÉTODOS PROTEÓMICOS: MALDI TOF

➤ Precaucións no uso:

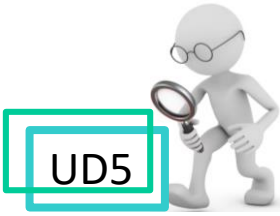
- As mostras sólidas deben quedar moi ben extendidas no correspondente pocillo, conseguindo o máis parecido a unha monocapa.
- A matriz funciona mellor recién preparada, pois co tempo de almacenamento cristaliza e a reacción de absorción-desorción non é correcta.
- O equipo require unha limpeza da fonte de ionización, que se realiza nun intervalo dunha semana a 15 días dependendo do número de mostras procesadas.
- O equipo require unha calibración diaria e outra específica tras a limpeza da fonte de ionización.



....aún faltan os
antibiogramas



3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS



3.1 OS ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos son sustancias que interfieren no crecemento e afectan á supervivencia das bacterias.

3.1.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DOS ANTIBIÓTICOS

Hai cinco mecanismos de acción básicos:

- Inhibición da síntese da parede bacteriana.
- Alteración da integridade da membrana citoplasmática.
- Inhibición da síntese ou das funcións dos ácidos nucleicos.
- Inhibición da síntese proteica.
- Acción sobre as vías metabólicas.

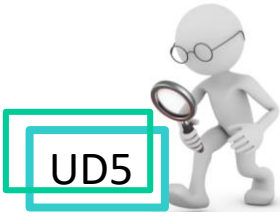
Mecanismos de acción

Mecanismos de resistencia

Transmisión de resistencia

<https://www.youtube.com/watch?v=n5w22tWfYX4>

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

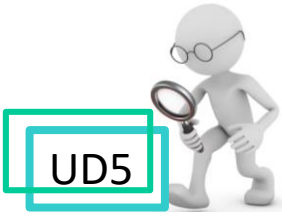


3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DOS ANTIBIÓTICOS

Para que un antibiótico poida exercer a súa acción necesita alcanzar primeiro a súa diana, e para eso:

- O antibiótico non debe ser degradado ou inactivado polo organismo da persoa infectada. Debe chegar ata a zona de infección, ata as bacterias, en concentración suficiente.
- Unha vez en contacto coas bacterias debe ser capaz de interactuar coa súa diana de acción, xa sexa a parede bacteriana, a membrana citoplasmática ou algún compoñente intracelular, neste último caso implicaría que o antibiótico teña que atravesar a membrana plasmática \Rightarrow debe ser lipofílico.
- E por último tería que superar os mecanismos de resistencia das bacterias: produción de enzimas que degraden o antibiótico, sistemas de expulsión do interior celular, bloqueo da entrada a través da membrana, evitar a hidrólise, etc.



3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.2 CLASIFICACIÓN DOS ANTIBIÓTICOS

➤ **Atendendo á zona de actuación**

- **Acción local** (administración tópica).
- **Acción sistémica.**

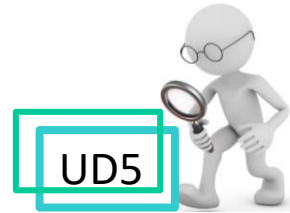
➤ **Atendendo ó efecto sobre as bacterias**

- **Bacteriostáticos:** bloquean o desenvolvemento e a multiplicación.
- **Bactericidas:** provocan a morte das bacterias.

➤ **Atendendo ós grupos bacterianos afectados**

- **Amplo espectro:** actúan sobre un gran número de bacterias distintas.
- **Espectro medio:** actúan sobre un grupo limitado de bacterias.
- **Espectro curto:** actúan sobre un só tipo de bacterias ou sobre un número moi reducido delas.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

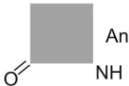
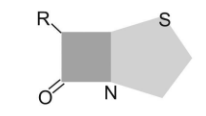
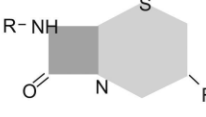
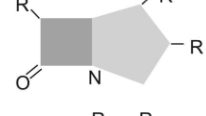
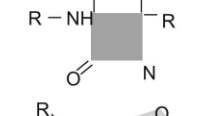
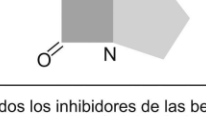


3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.2 CLASIFICACIÓN DOS ANTIBIÓTICOS

GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS SEGUNDO A ESTRUTURA QUÍMICA

- ✓ **BETALACTÁMICOS:** penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico).
- ✓ **MACRÓLIDOS:** eritromicina, claritromicina, azitromicina.
- ✓ **AMINOGLUCÓSIDOS:** estreptomina, gentamicina.
- ✓ **POLIPEPTÍDICOS:** polimixina e vancomicina.
- ✓ **QUINOLONAS:** ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino.
- ✓ **TETRACICLINAS:** tetraciclina, doxiciclina, glicilciclinas.

 Anillo betalactámico + Anillo secundario = Núcleo del betalactámico → GRUPO ANTIBIÓTICO			
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	PENICILINAS
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7- α -cefalosporínico	CEFALOSPORINAS
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	CARBAPENEMAS
	Ninguno	Monobactamo	MONOBACTÁMICOS
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/oxapenamó	ÁCIDO CLAVULÁNICO ^a

^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Antibióticos pertenentes ós betalactámicos.

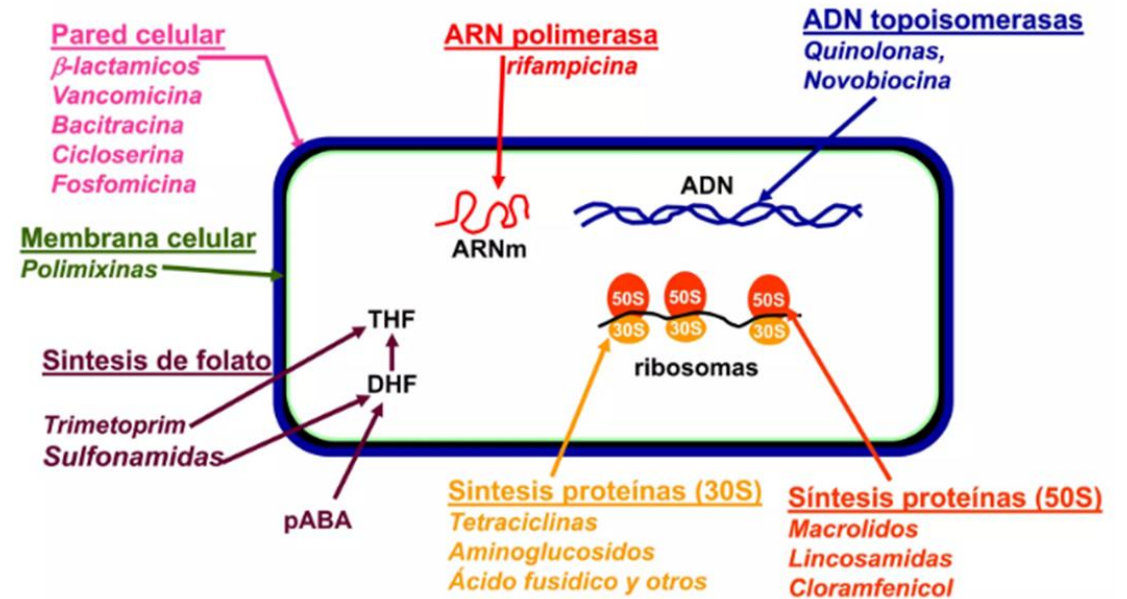
3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

UD5

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

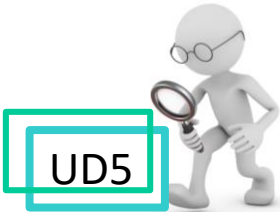
3.1.3 SITIO DE ACCIÓN DOS ANTIBIÓTICOS

- A nivel da parede celular.
- A nivel da permeabilidade da membrana plasmática.
- Inhibindo a síntese de ácidos nucleicos.
- Inhibindo a síntese de proteínas.
- Actuando sobre as vías metabólicas. Antagonistas do metabolismo.



Mecanismo de acción dos diferentes grupos de antibióticos.

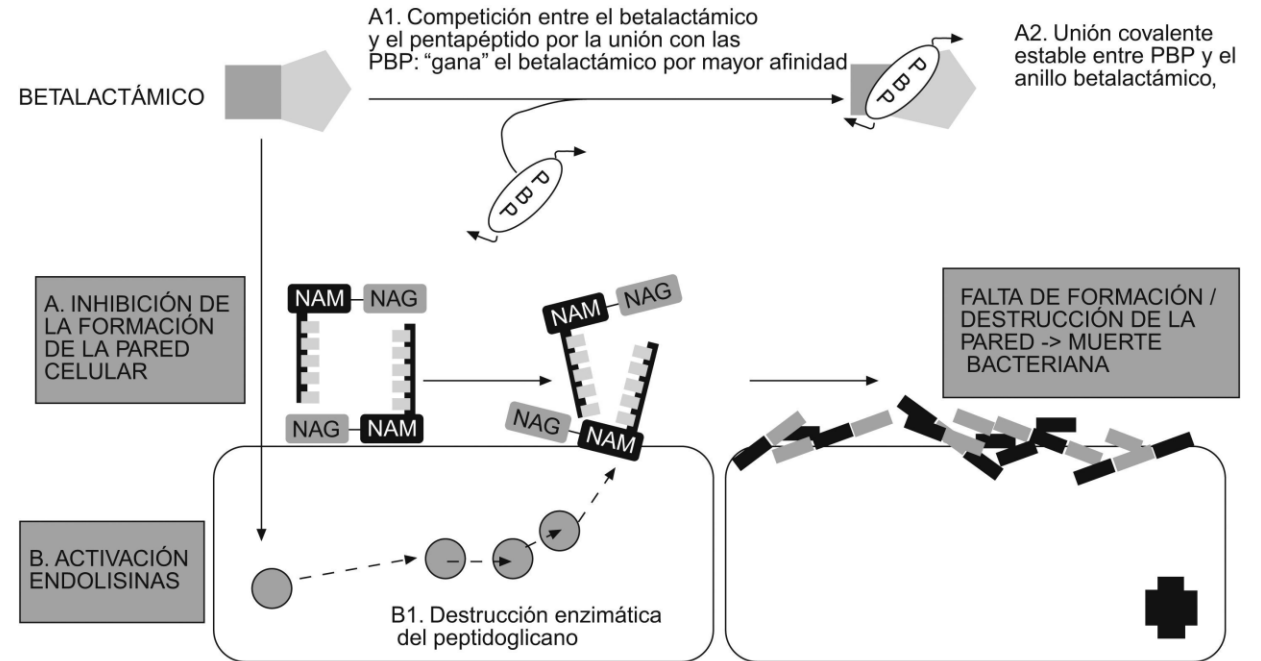
3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS



3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.3 SITIO DE ACCIÓN DOS ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos betalactámicos actúan competindo coa proteína que establece os enlaces entre as cadeas N-acetilglucosamina e o N-acetil-murámico para formar o péptidoglicano, impedindo a formación da parede.



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

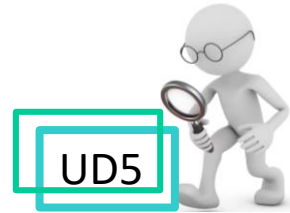
3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.4 ELECCIÓN DUN ANTIBIÓTICO

Para elixir o antibiótico adecuado para tratar cada infección, débense ter en conta os seguintes factores:

- **O antibiótico e o paciente:** o antibiótico debe alcanzar a súa diana farmacolóxica nunha concentración eficaz, sen que esto supoña toxicidade para o paciente.
- **O paciente e a bacteria:** o paciente pode presentar diferentes graos de inmunidade que condicionen a capacidade de infección da bacteria, pero tamén pode presentar factores que favorezan esa infección e que aumenten a virulencia.
- **O antibiótico e a bacteria:** a bacteria deberá ser sensible ó antibiótico utilizado e non presentar mecanismos de resistencia.



Triángulo de Davis

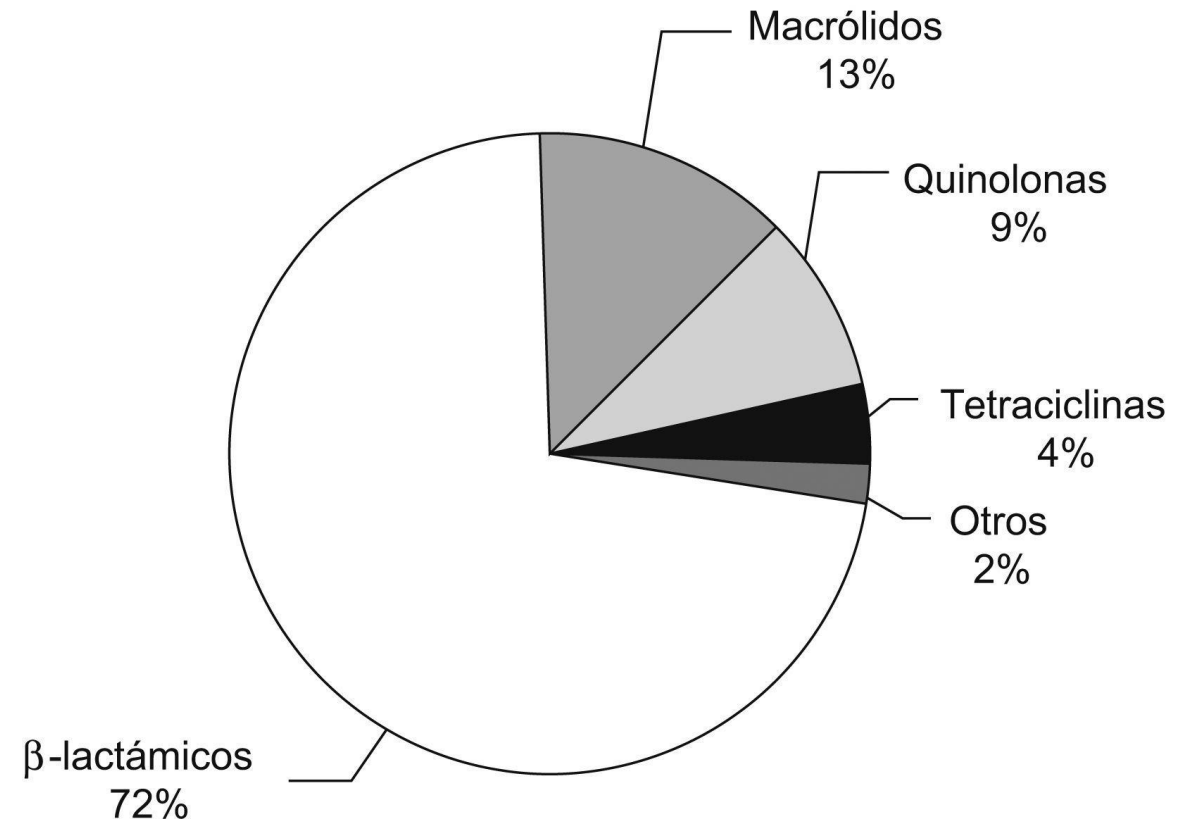
3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

UD5

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

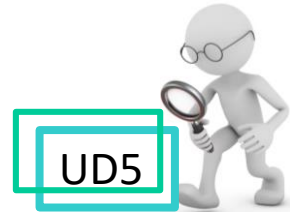
3.1.5 MECANISMO DE RESISTENCIA Á ANTIBIÓTICOS

- O uso indiscriminado dos antibióticos, tanto na saúde humana como animal, levou a aparición de múltiples resistencias das bacterias ós antibióticos.
- Os antibióticos máis utilizados son o grupo dos betalactámicos, por eso é un dos grupos que tamén acumula o maior número de resistencias.



Uso dos antibióticos en relación ó tipo ou grupo.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS



3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DO ANTIBIÓTICO

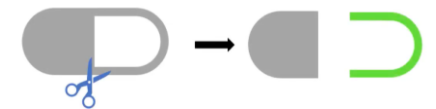
- A bacteria sintetiza enzimas que inactivan o antibiótico.
- As máis importantes son as **betalactamasas** e **carbapenemasas**, inactivan os antibióticos betalactámicos, por hidrólise.
- Os antibióticos betalactámicos inhiben a síntese da **parede celular** e constitúen a familia máis numerosa de antibióticos.
- Entre os antibióticos betalactámicos temos: os **derivados da penicilina**, as **cefalosporinas** e os **carbapenémicos**.

Proteínas (enzimas) que:
• Hidrolizan (rompen) a los antibióticos

• Cefalosporinas

Ejemplo:
Betalactamasas

• Carbapenemasas



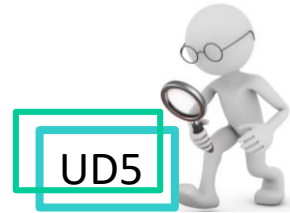
Resistencia a cefalosporinas:
• 1ª y 2ª generación
• 3ª generación (derrepresentación*)

Infecciones causadas por *Klebsiella aerogenes* y *Enterobacter cloacae*

Resistencia a carbapenémicos

Infecciones causadas por bacterias no fermentadoras y enterobacterias

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS



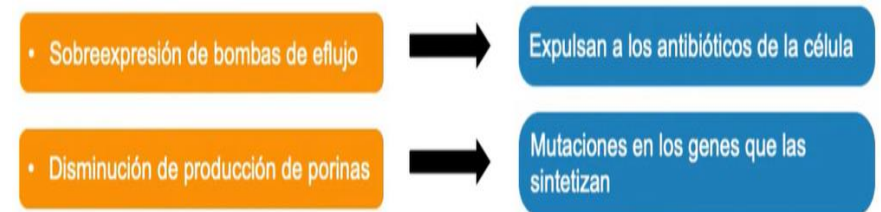
3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

ALTERACIÓN NAS BARREIRAS DE PERMEABILIDADE

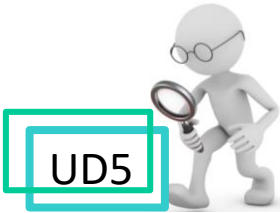
Trátase de mecanismos que limitan ou impiden a entrada do antibiótico na bacteria. Pódese producir por diferentes mecanismos:

- Alterando as porinas de membrana, como consecuencia de mutacións.
- Alterando os sistemas de transporte a través de membrana. Modificando os receptores de entrada á célula.
- Desarrollando mecanismos de expulsión activa.



Cadro resumo de mecanismos de resistencia que afectan á permeabilidade

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

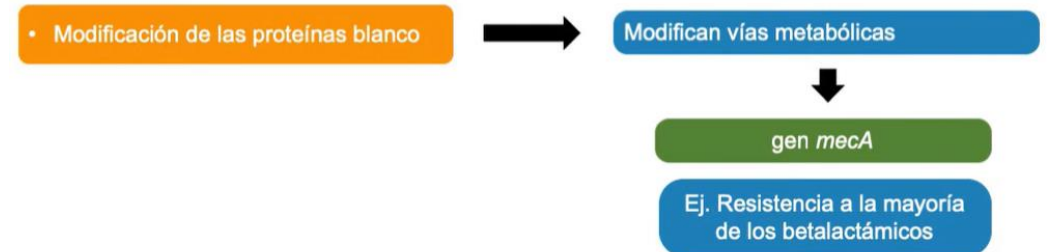


3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

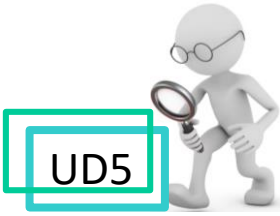
ALTERACIÓN DA DIANA

- Algúns mecanismos baséanse en alterar a diana do antibiótico na bacteria, o que evita que se poida unir e actuar.
- Unha mesma bacteria pode desenvolver varios mecanismos de resistencia e a varios antibióticos distintos.



O xene *mecA* codifica para unha proteína fixadora de penicilina da parede bacteriana, que determina que estes antibióticos non poidan actuar, favorecendo a resistencia a maioría dos antibióticos betalactámicos.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS



3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.6 BACTERIAS MULTIRRESISTENTES

Considérase unha **cepa multirresistente** cando presenta mecanismos de resistencia a tres ou máis familias de antibióticos.

- As bacterias Gram negativas suelen acumular maior grao de resistencia, xa que a súa parede ofrece maior impedimento á entrada dos antibióticos.
- A OMS fai unha clasificación das bacterias multirresistentes en tres grupos de prioridade:
 - **Prioridade 1 (crítica):** *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacterias resistentes a carbapenémicos e productoras de betalactamasas.
 - **Prioridade 2 (alta):** *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., Salmonelas resistentes a fluoroquinolonas e *Neisseria gonorrhoeae*.
 - **Prioridade 3 (media):** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina e *Shigella* spp. resistente a fluoroquinolonas.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

UD5

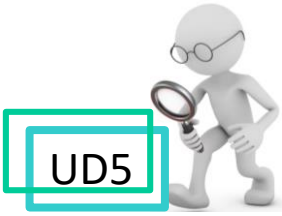
3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.6 BACTERIAS MULTIRRESISTENTES

LISTA DE PATÓGENOS MULTIRRESISTENTES PRIORITARIOS (OMS)

Ademais dos incluídos na lista está a resistencia ós tratamentos convencionais de *Mycobacterium tuberculosis*, que está indo en aumento nos últimos anos.

Prioridad 1: crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos	Cocobacilo gramnegativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos	Bacilo gramnegativo
	Enterobacterias resistentes a carbapenémicos y productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL o BLEE)	Bacilo gramnegativo
Prioridad 2: alta	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina	Cocobacilo grampositivo
	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina	Cocobacilo grampositivo
	<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina	Bacilo gramnegativo
	<i>Campylobacter</i> spp. resistente a fluoroquinolonas	Bacilo gramnegativo
	Salmonelas resistentes a fluoroquinolonas	Bacilo gramnegativo
Prioridad 3: media	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente cefalosporina y resistente a fluoroquinolonas	Diplococo gramnegativo
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> sin sensibilidad a la penicilina	Diplococo grampositivo
	<i>Haemophilus influenzae</i> resistente a ampicilina	Cocobacilo gramnegativo
	<i>Shigella</i> spp. resistente a fluoroquinolonas	Bacilo gramnegativo



3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

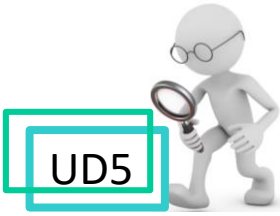
3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

- Trátase dun **método cualitativo**, onde a resposta vai ser:
 - **S**: sensible na dose habitual \Rightarrow o antibiótico é unha boa opción terapéutica.
 - **R**: resistente \Rightarrow o antibiótico non será efectivo no tratamento da infección.
 - **I**: sensible incrementando a exposición \Rightarrow o antibiótico ten certo efecto sobre a bacteria pero utilizando doses superiores ás habituais ou aumentando a frecuencia da administración.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS



3.1 OS ANTIBIÓTICOS

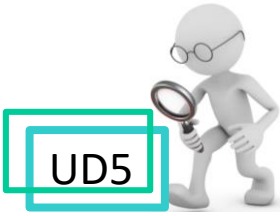
3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

➤ Fundamento:

- Colócanse un ou varios discos de papel de filtro impregnados co antibiótico que se vai testar, nunha concentración coñecida, sobre unha placa de cultivo inoculada co m.o en estudo.
- Ó entrar en contacto co agar húmido o antibiótico difunde radialmente, de maneira que ó aumentar o radio diminúe a concentración de antibiótico, creando un gradiente de concentración.
- Este método **non é válido para m.o anaerobios nin m.o de crecemento lento**, porque necesitan tempos de incubación prolongados. **Tampouco é aplicable** a antibióticos que difunden lentamente como o caso da **Polimixina B**.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS



3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

➤ Procedemento:

1. Preparar inóculo:

- Separar de 3 a 5 colonias iguais da placa para inoculalas en 5 ml de medio líquido.
- Incubar a 35 °C durante 2-6 horas ata conseguir unha turbidez de 0,5 da escala de McFarland (se nos pasamos axustamos a turbidez engadindo soro fisiolóxico estéril).

Despois de conseguir un crecemento que equivala á escala 0,5 McFarland, non esperar máis de 15 minutos para facer a sementeira en céspede, pois os antibióticos actúan sobre elementos implicados na multiplicación e desenvolvemento da bacteria (formación da parede, síntese de ADN e/ou proteínas, etc), e se ésta se atopa en fase estacionaria, non surtirán efecto.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

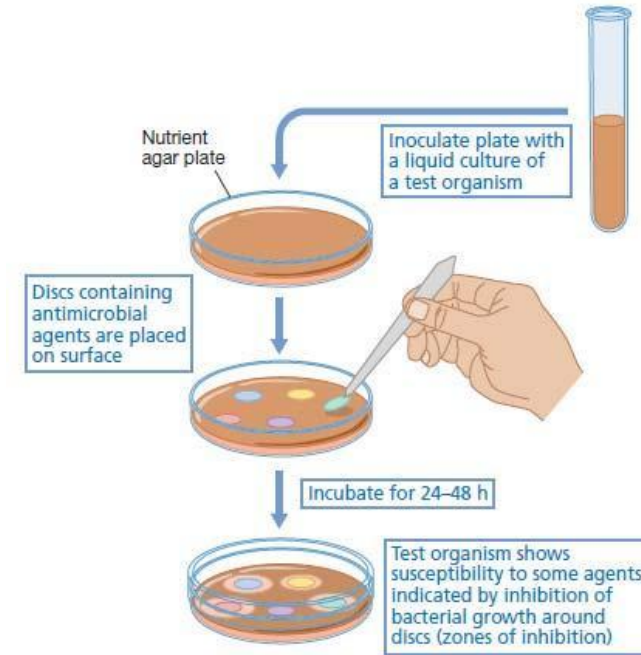
3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

➤ Procedemento:

2. Inoculación das placas:

- O medio utilizado normalmente é o Müller Hinton (cada placa debe ter uns 4 mm de alto, uns 25-30 ml de medio, senón pode afectar á difusión do antibiótico).
- Facer unha sementeira en céspede cun hisopo embebido no medio de cultivo líquido, unha vez acadada a turbidez indicada (non esperar máis de 15 minutos).
- Deixar secar o sementado durante 5 minutos.



3. PRuebas de Sensibilidad a Antibióticos

UD5

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

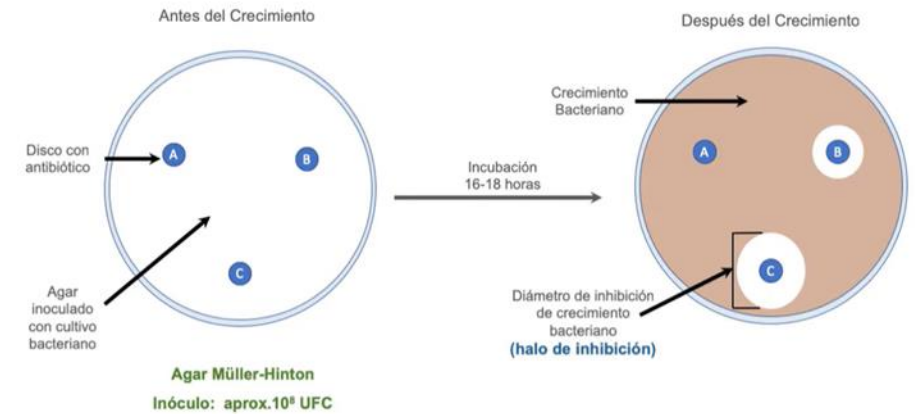
3.1.7 PRuebas de Sensibilidad: Antibiógramas

Método de Difusión en Disco

➤ Procedimiento:

3. Colocación do antibiótico:

- Cunhas pinzas estériles colocar o disco co antibiótico sobre a placa, aplicando unha lixeira presión para que contacte ben co agar.
- Pódense colocar varios discos na mesma placa, respectando as distancias entre discos indicadas polo fabricante.
- Esperar 15 minutos a que o antibiótico difunda no agar.



Esquema do procedemento do método de difusión en disco.

3. PRUEBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

UD5

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.7 PRUEBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

➤ Procedemento:

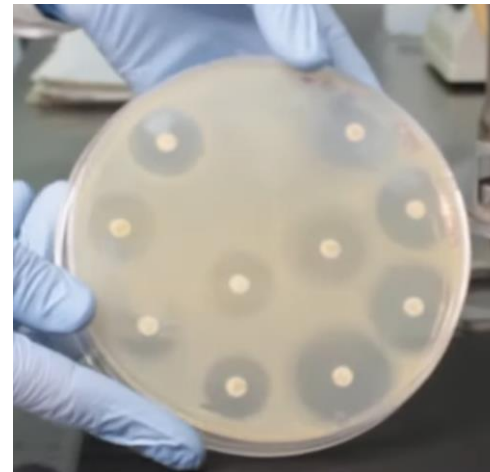
4. Incubación:

- Incubar a 35 °C durante 18-24 horas en posición invertida.

5. Lectura:

- Medir o halo formado ó redor da cada disco.
- Os diámetros poden variar dunha combinación antibiótico-bacteria a outra pero en xeral cun diámetro de halo de 25-30 mm considérase **Sensible**, e un diámetro **inferior a 15 mm considérase Resistente**.

Pruebas de sensibilidad por difusión en agar

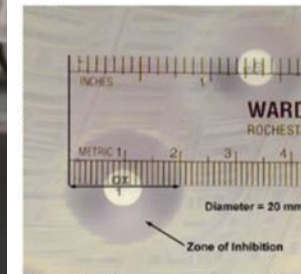


Antibiograma

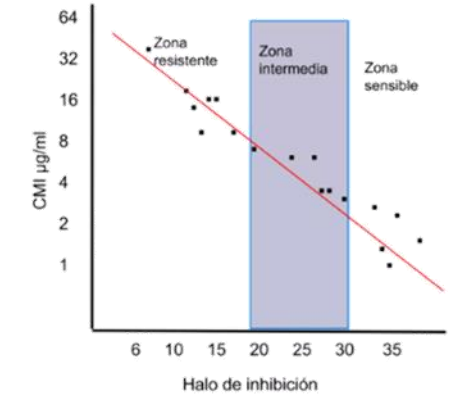
Método de Kirby-Bauer (1960)

Medio Mueller-Hinton

McFarland 0,5



Resultados antibiograma de difusión en disco.



Recta de correlación entre la CMI y el halo de inhibición

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

TIRA DE GRADIENTE DE CMI (test Epsilon ou Etest®)

➤ Fundamento:

- Similar a difusión en disco.
- Trátase dunha tira de plástico ou papel impregnada nun determinado antibiótico establecendo un gradiente de concentración.
- O antibiótico difundirá polo agar de igual maneira que no caso dos discos.
- O medio máis utilizado é tamén o Müller Hinton.

➤ Procedemento:

- Similar a difusión en disco.



UD5



3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

TIRA DE GRADIENTE DE CMI (test Epsilon ou Etest®)

➤ Lectura:

- Se **non se observa halo** ó redor da tira implica que non hai inhibición polo tanto é **Resistente**.
- Se **hai halo**, éste presentarse simétrico a ambos lados da tira e mirarse o punto de corte entre o halo formado e a tira, esa será a **CMI** (concentración mínima inhibitoria) para ese antibiótico con ese m.o.

UD5



Resultados Etest®.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

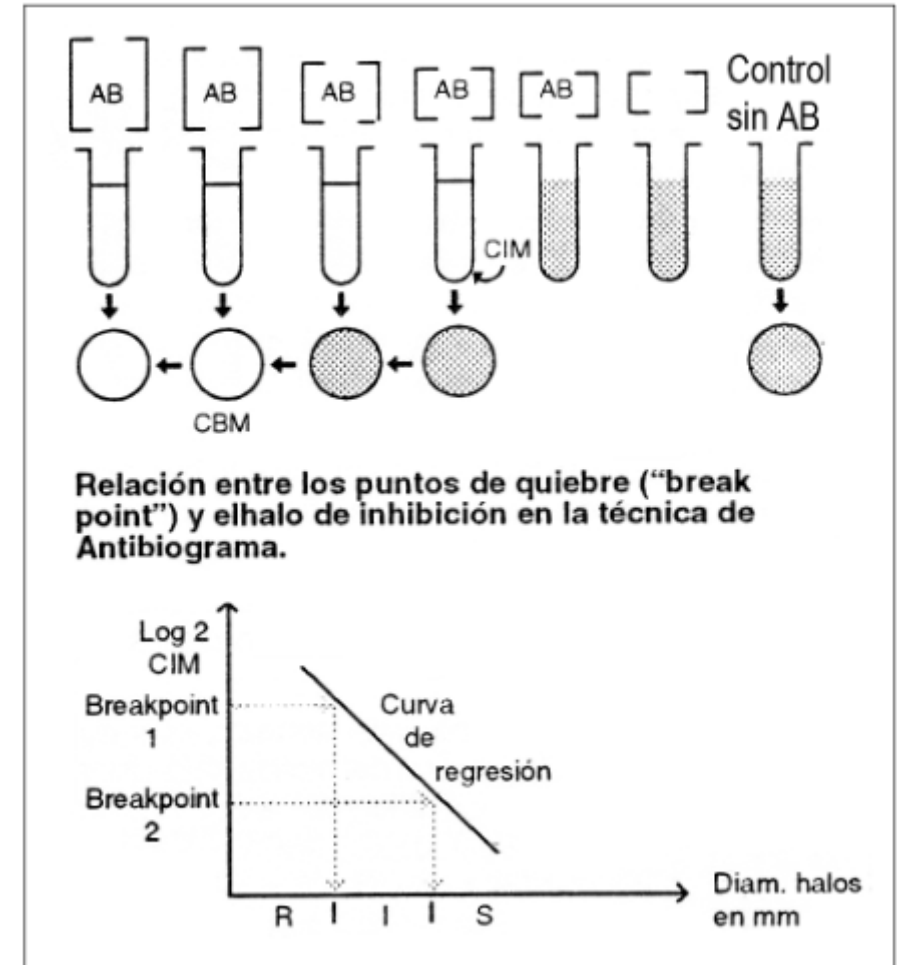
DILUCIÓN EN AGAR

- É o test de referencia (*gold standard*) porque está ben estandarizado e reproducible, pero é moi laborioso.
- Consiste en mezclar o antibiótico co medio de cultivo a diferentes concentracións e, sobre esta serie de placas, faise a sementeira co inóculo do m.o en estudo.
- Incúbbase e anótase en qué concentración mínima se observa inhibición do crecemento \Rightarrow CMI

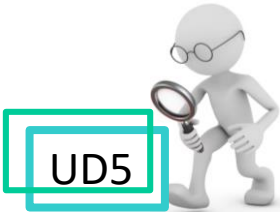
UD5



Figura 1. Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)



3. PRuebas de sensibilidad a antibióticos

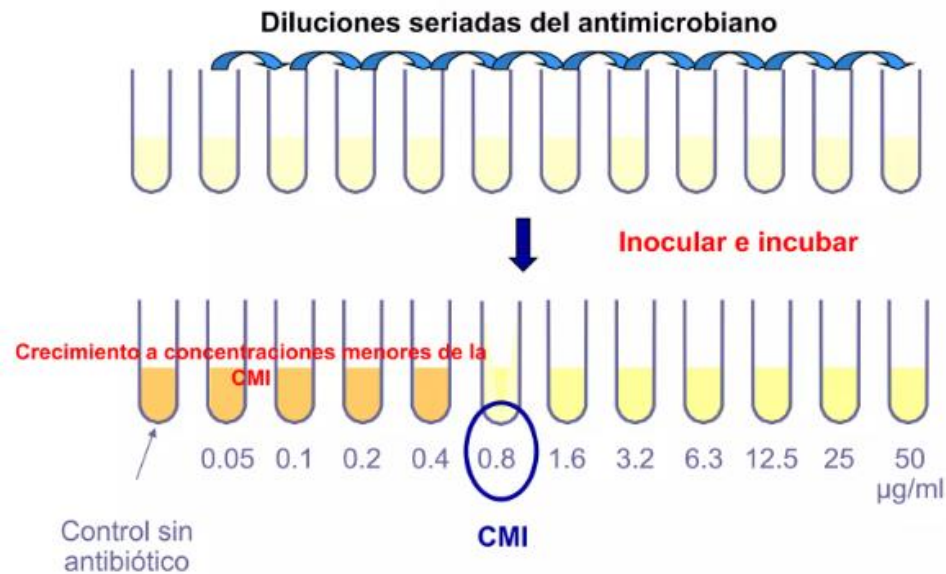


3.1 OS ANTIBIÓTICOS

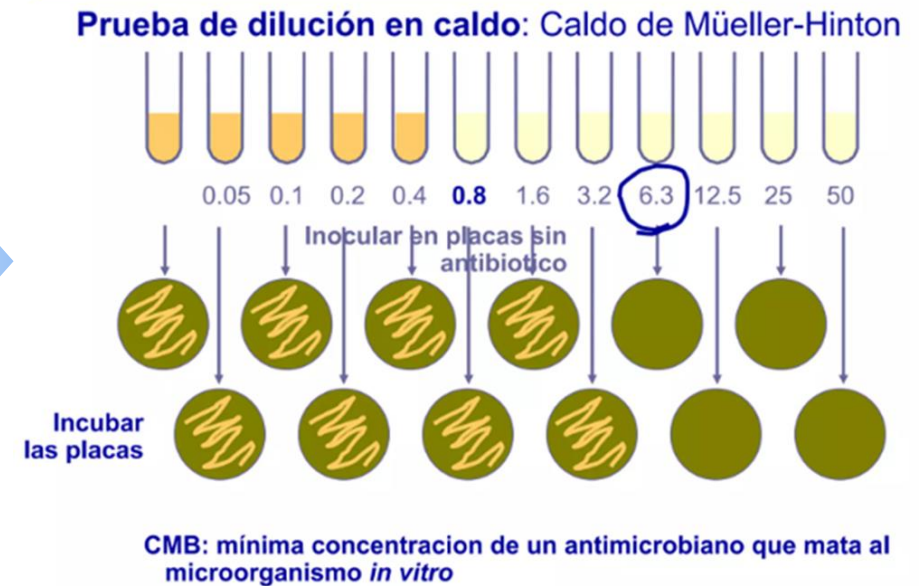
3.1.7 PRuebas de sensibilidad: Antibiogramas

Dilución en caldo

Prueba de dilución en caldo: Caldo de Mueller-Hinton



Pruebas de sensibilidad por dilución



Procedimiento e lectura similar á dilución en agar.

3. PROBAS DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

3.1 OS ANTIBIÓTICOS

3.1.7 PROBAS DE SENSIBILIDADE: ANTIBIOGRAMAS

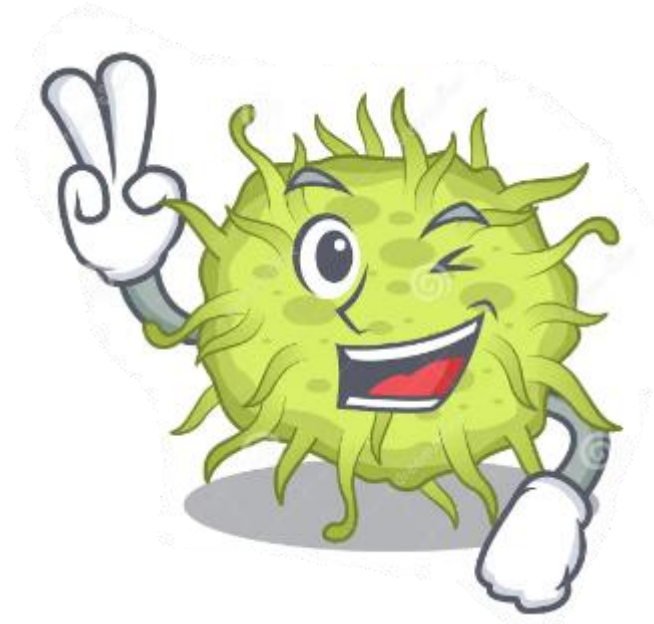
MÉTODOS AUTOMATIZADOS

- A maioria utilizam sistemas de microdilución en pocillos de microplacas.
- O crescimento bacteriano é lido por un autoanalisador que pode utilizar turbidometría ou fluorometría.
- Algunhas empresas comercializan galerías multiproba bioquímicas que tamén incorporan probas de sensibilidade a antibióticos, para sistemas automatizados de inoculación, incubación e lectura.



Equipo Vitek® para antibiograma

FIN DO TEMA



.....A TRABALLAR