

Métodos de Laboratorio en Bacteriología Anaeróbica

Por los Dres.

V. R. DOWELL, Jr.

Sección de Bacteriología — Programa de Laboratorio
y

T. M. HAWKINS

Laboratorio de Consulta y Sección de Desarrollo,
Programa de Laboratorio

Traducción al Castellano por el
Dr. JOSE J. GUTIERREZ ALFARO.

Jefe de los Servicios de Laboratorio del Hospital Privado del Centro Médico de Caracas
y del Hospital Universitario de Caracas

Publicación Nº 1803 del Servicio de Salud Pública. Junio de 1968

Departamento de Salud, Educación y Bienestar de los E.E.U.U.

Servicio de Salud Pública. Administración de los Servicios de Salud e Higiene Mental.
Centro de Enfermedades Transmisibles. Atlanta, Georgia 30333

INDICE DEL CONTENIDO

Palabras Preliminares

- I Introducción
- II Aislamiento de las bacterias anaerobias del material clínico
- III Determinación de las características de cultivo y bioquímicas
- IV Investigación de las toxinas de los clostridios, pruebas de neutralización y de patogenicidad.
- V Tipaje de las toxinas de *Clostridium perfringens*.
- VI Aglutinación de *Corynebacterium acnes*
- VII Claves para la identificación de bacterias anaerobias
 - 1 Diferenciación primaria para determinación hasta nivel del género
 - 2 Llave dicotómica para los clostridios encontrados con mayor frecuencia

- 3 Características de los clostridios encontrados con mayor frecuencia
 - 4 Características morfológicas de un grupo representativo de bacilos Gram negativos
 - 5 Características de un grupo representativo de bacilos Gram negativos no esporulados
 - 6 Características de un grupo representativo de cocos
 - 7 Características morfológicas de los cultivos de actinomyces
 - 8 Características de un grupo representativo de bacilos Gram positivos no esporulados
- VIII Examen de los alimentos y suero sanguíneo para la investigación de C. botulinum**
- LX Examen de alimentos y heces para la investigación de C. perfringens**
Identificación serológica del C. perfringens
- X Conservación y envío de cultivos anaerobios**
- XI Medios de cultivo para el aislamiento de identificación de las bacterias anaeróbicas**
Introducción
Medios para placas
Medios diferenciales
Medios de conservación
- XII Reactivos**
- XIII Procedimiento de coloración**
Coloración de Gram
Coloración de esporas
- XIV Métodos para obtener anaerobiosis**
Uso de la jarra para cultivo anaerobico
Utilización de la jarra de Brewer
Utilización del Gas-Pack con la jarra de Brewer
- XV Referencias**
- XVI Bibliografía**

El uso de marcas registradas es solamente con fines de identificación y no involucra respaldo por el Servicio de Salud Pública o por el Departamento de Salud, Educación y Bienestar.

Palabras Preliminares

Honrado y complacido presentamos a las II Jornadas Venezolanas de Microbiología la versión al castellano del Manual de Técnicas de Laboratorio en Bacteriología Anaeróbica, escrito por los Doctores V. R. Dowell, Jr. y T. M. Hawkins, miembros del personal de eminentes profesionales que han hecho del NATIONAL COMMUNICABLE DISEASE CENTER una entidad de referencia mundial en lo que respecta a enfermedades transmisibles. Allí, un numeroso grupo de hombres y mujeres de las más diversas especialidades, se ocupan en investigar, diagnosticar, enseñar, preparar personal, viajar a remotas regiones a estudiar endemias o epidemias y colaborar con sus conocimientos para que el personal nativo de los países afectados resuelvan sus problemas, o bien, en recibir en su sede gratuitamente, a un numeroso contingente de visitantes que acuden a él en el deseo de beber en la fuente clara de su sabiduría y experiencia.

A una hora del "lunch" o del "coffee break" es significativo observar como al lado del respectivo Jefe se agrupan, por ejemplo una competente bacterióloga de la India con su típico SARI, un eminente virólogo de Belem de Para, un destacado veterinario de Guatemala y un médico oriundo de la tierra de Simón Bolívar. Allí, aún con las dificultades inherentes a no utilizar nuestra lengua nativa, profesores y alumnos nos identificamos en los problemas de la ciencia y los que confronta la humanidad y pensabamos con nostalgia como pueden existir hermanos que no puedan comprenderse. Así es el N. C. D. C. centro universal de ciencia y fraternidad.

Esta versión es el fruto de un entrenamiento durante tres meses en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica del NCDC, y aspiramos que los colegas venezolanos e iberoamericanos lo recibirán seguramente con beneplacito por servir de guía útil (hasta el presente la única existente en la especialidad), para el estudio sistemático de las bacterias anaeróbicas con una metodología ad-hoc realizable con material asequible a la mayoría de los Laboratorios de Bacteriología.

Aspiran los autores con la descripción de sus métodos y técnicas, probadas en miles de oportunidades, uniformar los procedimientos empleados, no sólo en su país sino en escala universal, de manera que los resultados obtenidos por cualquier Investigador en cualquier parte del mundo puedan ser repetidos por quien así lo desee, en condiciones similares. Estiman que esto constituye un fundamento indispensable para la clarificación de las clasificaciones y nomenclaturas de tales bacterias. Los autores saben que falta mucho por hacer, pero del estudio sistemático comparativo que ellos han realizado comparando las cepas de las colecciones con las aisladas de los productos patológicos recibidos, los ha llevado a establecer algunos grupos bien definidos, a concluir que algunas especies descritas como diferentes son iguales y posiblemente fijar cuales son las reacciones claves para la determinación de algunos géneros y especies. La tarea emprendida por los autores se facilitará con el empleo en escala universal de sus procedimientos.

La amplia bibliografía y las referencias incluidas al final del texto, nos exoneran de enumerar a los bacteriólogos que han insistido en la última década en la imperiosa necesidad de practicar rutinariamente cultivos en anaerobiosis, especialmente cuando las muestras provengan de los productos patológicos siguientes: pus abdominal, complicaciones pleuropulmonares e infecciones genitales, cuya incidencia en anaerobiosis alcanza cifras que llegan o pasan al 30%.

Si los clínicos y cirujanos deben tener presente la importancia actual de los anaerobios no esporulados, cuando los progresos de la cirugía ha hecho posible la realización de intervenciones quirúrgicas radicales, cuando los antibióticos, corticoesteroides y drogas inmunosupresoras se utilizan cada día con mayor frecuencia e intensidad, constituyen una serie de causas obligantes para que los Servicios de Bacteriología ofrezcan a los médicos condiciones propias para aislar adecuadamente miembros de la otrora quiescente "Flora endógena de Veillon".

No podríamos terminar estas breves palabras de introducción a la primera edición española del Manual, sin manifestar nuestras más cumplidas gracias al Doctor Pentti Kekko, Jefe del Programa de Laboratorio; al Doctor P. B. Smith, Jefe de la Unidad de Referencia Bacteriana y a los autores de aquél, Doctores V. R. Dowell y T. M. Hawkins.

Desearnos dejar constancia de nuestro reconocimiento al Doctor Dowell, Jefe del Laboratorio de Anaerobios, por sus enseñanzas, por su sincera amistad y por todas las atenciones y facilidades que nos brindó durante la permanencia en su Laboratorio. También consignamos nuestras expresiones de gratitud para todos y cada uno de los miembros del personal del Laboratorio de Anaerobios del N. C. D., quienes en todo momento y oportunidad fueron nuestros leales compañeros.

Si el objetivo de divulgar estas técnicas y procedimientos entre los Bacteriólogos de América es alcanzado, tal logro, será la más grande satisfacción para los autores del Manual y su traductor.

José J. Gutiérrez Alfaro

Atlanta, Abril 1968.

I N T R O D U C C I O N

La importancia clínica de las bacterias anaerobias particularmente la de los clostridios toxigénicos y la de algunos anaerobios no esporulados es bien reconocida, sin embargo nuestro conocimiento general de estas bacterias y su papel en las infecciones humanas y de animales es bastante limitado. Afortunadamente el interés por los anaerobios ha aumentado en estos últimos años y la metodología anaeróbica es actualmente empleada de rutina en la mayoría de los laboratorios clínicos y de salud pública. Este aumento de interés por los anaerobios ha ocasionado una demanda inmediata de microbiólogos y técnicos familiarizados con los procedimientos empleados en bacteriología anaeróbica.

Desde el establecimiento del Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica en el National Communicable Disease Center (Centro Nacional de enfermedades transmisibles), se ha ofrecido un curso en métodos de laboratorio para bacteriología anaeróbica al personal de laboratorio calificado e interesado en este campo. Este manual, complementado con clases, ha sido destinado principalmente para usarlo como guía en los trabajos de laboratorio en los referidos cursos, siendo también útil como manual de consulta en el laboratorio sobre las técnicas anaeróbicas.

Los medios y técnicas descritos son empleados de rutina en el Laboratorio de Anaerobios del N.C.D.C. y las reacciones para los diferentes organismos presentados en los cuadros están basados en datos obtenidos con cultivos estudiados con estos métodos. Para poder comparar los resultados obtenidos por diversos investigadores es necesario estudiar los cultivos en condiciones uniformes, por lo cual se ha hecho un esfuerzo para **standardizar** los medios y técnicas tanto como ha sido posible.

Como este manual se revisa periódicamente, muchas personas han contribuido a su texto y organización. Los autores desean expresar su particular agradecimiento a la Dra. Lillian V. Holdeman, anteriormente encargada del Laboratorio de Anaerobios del N.C.D.C.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBICAS DE MATERIAL CLINICO

A.—Las bacterias anaerobicas pueden ser aisladas y estudiadas con bastante rapidez con la condición de tener en cuenta la rígida aplicación de ciertos principios básicos de la bacteriología anaerobica. Cuatro de las más importantes consideraciones en el cultivo de las bacterias anaerobicas son:

- 1.—Cultivar el material clínico inmediatamente después de su recolección.
- 2.—Utilización de medios frescos.
- 3.—Suministro de las condiciones anaerobicas adecuadas.
- 4.—Subcultivo de las colonias aisladas inmediatamente después de haber sido retiradas de la anaerobiosis.

Es imperativo cultivar el material clínico inmediatamente después de su recolección, porque algunos anaerobios son bastante sensibles al oxígeno y mueren rápidamente en un ambiente aerobico. En lo posible los líquidos aspirados son preferibles a los hisopados. Nunca permita que el material de los hisopados se seque. Si no es posible hacer el cultivo inmediatamente, el material debe ser colocado en un medio que contenga un agente reductor como: cisteína ó thioglicolato, y conservarlos a temperatura ambiente por un lapso no mayor de 2 horas.

B.—Prepare y colorea frotos directos de cada muestra.

Mediante una coloración de Gram podemos conocer la cantidad y tipos de organismos presentes en la muestra. Puede ser útil también examinar preparaciones en fresco y extendidos teñidos para gérmenes ácido resistentes y por colorante de Giemsa. Utilice pipetas capilares para hacer los extendidos de las muestras líquidas o emplee directamente los hisopos.

Examine y anote:

- 1.—Reacción al Gram, tamaño, forma y número relativo de los organismos presentes.
- 2.—La presencia de esporas, su forma y posición en la bacteria.
- 3.—Cualquier otra característica morfológica como: ramificaciones, pseudoramificaciones, formación de cadenas, filamentos, cuerpos esféricos, ó formas granulares minutas.

C.—Inocule medios para el aislamiento primario * tan pronto como reciba las muestras:

Medios líquidos:

Use pipetas capilares para inocular los medios líquidos o semisólidos, sembrando en el fondo del tubo 1 ó 2 gotas del inóculo. Coloque una gota en cada placa y extienda para obtener colonias separadas.

Tejidos u otras muestras sólidas:

Agregue suficiente cantidad de caldo thioglicolato para emulsionar la muestra y tanta arena estéril como sea necesaria.

Triture en un mortero. Trátela como una muestra líquida

Hisopos:

Coloque el hisopo directamente en el medio líquido y utilice otro hisopo para sembrar las placas. Si es necesario una suspensión para inoculación, puede prepararla agitando suficientemente el hisopo en 2 ml. aproximadamente de caldo thioglicolato.

1.—Caliente todos los medios líquidos y semisólidos en baño de maría hirviendo por 10 minutos y enfrielos en agua antes de sembrarlos.

2.—Inocule un tubo de caldo thioglicolato y otro de caldo carne glucosado (para enriquecimiento) y 3 placas de agar sangre. Después de enfriado el caldo thioglicolato agregue 0.5 ml de suero estéril de conejo.

a.—Si se sospecha la presencia de clostridios inocule una placa de amarillo de huevo agar (EYA).

b.—Si se sospecha la existencia de una infección mixta, inocule placas con medios selectivos como: agar sangre con fenil-etil-alcohol (1) y/o agar sangre con paronomicina-vancomicina-menadiona (2). La kanamicina o neomicina pueden sustituir a la paronomicina.

3.—Incube los cultivos a 35-37° C., en la forma siguiente:

a.—Incube los medios: caldo carne glucosado y thioglicolato en jarra anaeróbica por 24 a 48 horas.

b.—Incube una placa de agar sangre en atmósfera de CO₂ (vela) y otra en aerobiosis.

c.—Incube una placa de agar sangre, otra de EYA y las placas de los medios selectivos en jarra anaeróbica por un minimum de 48 horas y de preferencia de 3 a 5 días. Para absorber la humedad de las placas utilice cajas de petri con tapas de aluminio

* Para el aislamiento de *Bacteroides melaninogenicus* añada 5.0 mg. de hemina y 0.5 mg. de menadiona (esterilizada por filtración) a cada litro de medio de aislamiento.

provistas de discos absorbentes. Muchos clostridios tienen tendencia a extenderse (swarming) en placas con exceso de humedad.

D.—Después de 24 horas de incubación examine los cultivos de enriquecimiento, si no hay crecimiento aparente, reincube los medios. Si el crecimiento es aparente:

1.—De los medios caldo carne glucosado y caldo thioglicolato haga sendas preparaciones y colorea con Gram.

2.—Con una pipeta capilar tome una muestra del fondo del tubo de cultivo y haga subcultivos:

a.—Inocule 3 placas de agar sangre por cada caldo thioglicolato o caldo carne glucosado.

(1) Si se sospecha la presencia de clostridios inocule una placa de EYA (3).

(2) Si hay infección mixta inocule placas con medios selectivos.

b.—Incube las placas en anaerobiosis y aerobiosis como se describió en la sección C-3.

3.—Reincube los medios de enriquecimiento si los organismos observados en los trotes directos no han crecido en los cultivos.

E.—Después de la incubación:

1.—Examine las placas aerobicas, anaerobicas y las de CO₂ con lupa o microscopio de disección.

a.—Observe y anote las modificaciones en agar sangre, EYA, así como también tamaño y forma de las colonias.

(1) Haga preparaciones para la comparación de las colonias de diferentes placas y tiñalas por Gram. Anote la forma y localización de las esporas si las hay.

(2) Las colonias en EYA pueden ser utilizadas para investigar las catalasas, haciendo una suspensión de una colonia en unas gotas de suero salino estéril en un porta-objetos y agregándoles una gota de (H₂O₂) al 3%. No utilice colonias de las placas de agar sangre para la prueba de las catalasas.

b.—Determine el número de tipos de colonias diferentes en las placas de anaerobiosis.

(1) Por cada colonia a transferir, caliente previamente un tubo de caldo carne glucosado y un tubo de thioglicolato en agua hirviendo por 10 minutos.

(2) Utilizando un alambre de platino con un asa pequeña o una pipeta Pasteur sellada de 22.5 mm. de largo (9"), pesque

cada colonia diferente e inocule un tubo de caldo carne y un tubo de thioglicolato. Si se sospecha de otros anaerobios además de clostridios añada 0.5 ml de suero estéril de conejo al caldo thioglicolato. El caldo carne glucosado es lo mejor para el cultivo de clostridios y el caldo thioglicolato enriquecido es más adecuado para los anaerobios no esporulados.

c.—Incube los medios de caldo carne glucosado y caldo thioglicolato en anaerobiosis por 24-48 horas.

2.—Asegúrese de tener una colonia de cada tipo morfológico observado en el frote original. Si fuera necesario, resiembre las placas para obtener colonias aisladas.

F.—Examine las placas inoculadas con los medios de enriquecimiento después del periodo de incubación. Haga subcultivo en caldo carne glucosado y thioglicolato, de cualquier tipo de colonia no aislada de las placas directas.

G.—Examine los medios de caldo carne glucosado y thioglicolato inoculados con una colonia. Inocule los medios diferenciales a partir de los cultivos puros de los organismos anaerobios.

III

DETERMINACION DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

A.—La identificación de las bacterias anaerobias aisladas en cultivos puros comprende la determinación de la morfología celular, características de las colonias en agar sangre y su comportamiento en una serie de pruebas bioquímicas.

Además, los clostridios son ensayados para determinar su toxigenesis y cuando es preciso, la toxina es identificada por pruebas de neutralización.

B.—Coloración de Gram de los cultivos de 24 horas para comprobar su pureza, observe el tamaño y la forma de los organismos presentes, si hubiera esporas anote su existencia y localización.

C.—Inocule los medios diferenciales.

1.—Juego básico de medios diferenciales:

caldo carne, caldo base de fermentación, glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, salicina, glicerol, almidón, xilosa, arabinosa, thiogel, leche-hierro, indol-nitrito (para indol), indol-nitrito (para nitritos), medio para H₂S, urea, motilidad, esculina, triple azúcar hierro agar (TSI) agar infusión en bisel y caldo thioglicolato.

A este juego básico de medios de cultivo cuando se estudian bacilos Gram positivos esporulados se añade: caldo carne glucosado y suero de Löeffler.

- 2.—Caliente todos los medios, con excepción de los tubos inclinados y el suero de Löeffler, en agua hirviendo por 10 minutos. Enfríelos en agua corriente.
 - 3.—Utilice una pipeta capilar para inocular los medios líquidos y semi-sólidos depositando una gota del cultivo en el fondo del tubo. Bote una pequeña cantidad del inóculo por arriba de la línea de punción en el momento de introducir la pipeta. Asegúrese de expulsar todo el aire de la pipeta antes de introducirla en el medio. Una pipeta puede ser utilizada para sembrar varios medios diferentes.
 - 4.—Siembre por punción el medio de Löeffler con una o dos gotas del inóculo.
 - 5.—Siembre los tubos inclinados con una gota que se coloca en el vértice del bisel. Cerciórese que la gota se deslice por la superficie del bisel y no por los bordes. Inocule los medios de esculina, colocando una gota en la superficie y haciendo luego la punción en profundidad.
 - 6.—Inocule en último lugar el medio leche hierro.
 - 7.—Coloque un papel indicador de acetato de plomo por encima del bisel del TSI.
 - 8.—Incluya un tubo no inoculado de thlogel en sus pruebas diarias como testigo para la investigación de la liquefacción de la gelatina.
 - 9.—Incube los tubos inclinados en la jarra anaeróbica y los medios diferenciales en aerobiosis a 35-37° C.
- D.—Incuale por agotamiento tres placas de agar sangre con cultivos de 24 horas para obtener colonias separadas. Si se sospecha la presencia de clostridios inocule también una placa de EYA. Incube una placa de agar sangre en aerobiosis, otra placa de agar sangre debe incubarse en atmósfera de CO₂ (vela). Incube otra placa de agar sangre y de EYA en jarra anaerobica. Las placas en anaerobiosis deben ser incubadas por lo menos por 48 horas antes de ser examinadas.
- E.—Lectura de las placas.
- 1.—Examine las placas en aerobiosis para determinar la tolerancia al oxígeno del organismo en estudio.
 - 2.—Examine la placa de EYA para investigar la producción de lecitinasa, lipasa y enzimas proteolíticas.
 - 3.—Examine las placas de agar sangre en anaerobiosis para la producción de hemólisis y característica de las colonias.
- Las características de las colonias de los cultivos puros son muy útiles en la identificación de las bacterias anaerobias si son descritas con precisión. Una buena lupa de mano o un microscopio de disección son de gran valor para la inspección de las colonias. Es útil seguir un procedimiento standard para examen y descripción de las colonias, de manera que las características de los diferentes cultivos puedan ser comparadas y la descripción de una colonia pueda ser interpretada por otros observadores. A continuación enumeramos las características de las colonias que deben ser observadas y algunos de los términos más usuales que ayudan en la descripción de las colonias de las bacterias.

CUADRO N.º. I


Características y descripción de las colonias.

Medio..... Edad del cultivo Temperatura..... C
 Diámetro en mm.....
 Color
 Superficie (brillante, mate, otras)
 Densidad (opaca traslúcida, otras)
 Consistencia (butirosa, viscoide, membranosa, quebradiza, otras).....

FORMA:

puntiforme 

irregular 

circular 

rizoide 

filamentosa 

fusiforme 

ELEVACION:

plana 

pulvinada 

elevada 

umbonada 

convexa 

umbilicada 

BORDES:

continuo 

erosionado 

ondulado 

filamentoso 

lobulado 

rizado 

F.—Lectura de los medios diferenciales.

1.—Las pruebas bioquímicas son incubadas de rutina hasta por 7 días después de su inoculación. Los tubos son inspeccionados diariamente y los resultados anotados el 1ro., 2do., y al final del período de incubación. Todas las pruebas de los organismos exigentes o de crecimiento lento (fastidious), pueden ser incubados hasta por tres semanas. Otras excepciones a la rutina son las siguientes:

a.—Las reacciones para indol y nitritos son realizadas 24 horas después que se ha obtenido un crecimiento suficiente en el medio indol-nitrito. Esto sucede generalmente después de 48 horas de haber sembrado los medios. Además la base de fermentación (control) puede ser probada para el indol después que la lectura final de las pruebas bioquímicas de fermentación han sido realizadas.

b.—Las pruebas para la investigación de las catalasas en medio de agar infusión y la lectura de los medios TSI y esculina se practican generalmente a las 48 horas de su inoculación y los tubos se descartan.

c.—Los medios de thiogel y suero de Loeffler son incubados hasta por 1 mes, antes de reportar la liquefacción negativa.

d.—Ocasionalmente puede ser difícil determinar la motilidad de un organismo en medio semisólido debido a la producción de gas. En este caso la movilidad puede ser comprobada por el examen microscópico de preparaciones en fresco, de cultivos jóvenes (6 a 18 horas) en caldo con bajo contenido en carbohidratos, como caldo carne por ejemplo.

e.—Las pruebas para la producción de toxinas en caldo carne glucosado se hacen generalmente en cultivos de 24 horas. Para excepciones y métodos de prueba, consulte la sección: "Comprobación de la toxigenicidad de los clostridios, pruebas de neutralización de las toxinas y pruebas de patogenicidad".

2.—ANOTACION DE LOS RESULTADOS

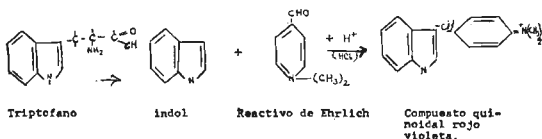
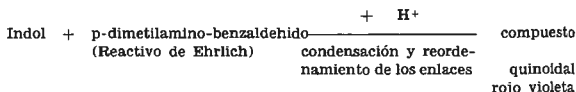
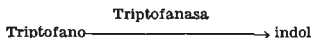
MEDIO	OBJETO	ANOTACION
a.—Caldo carne	proteolisis La digestión generalmente no aparece sino después de varios días	1 + B: Ligeramente negro en los bordes de pocas partículas 2 + B: Negro en la periferia de la mayoría de las partículas 3 + B: La $\frac{1}{2}$ de la carne ennegrecida 4 + B: Toda la carne negra H: Como hollín D: Digerida G: Gas
b.—Caldo base para fermentación	Control de los medios de fermentación	G: Gas RI: Reducción del indicador ¹
c.—Medios de fermentación	Utilización de los carbohidratos	A: Acido —: Negativo (sin cambio) () : Gas RI: Reducción del indicador ¹
d.—Thiogel	Liquefacción de la gelatina Coloque los cultivos y un control en un vaso de precipitado con agua. Llévelos a la refrigeradora. Compruebe la liquefacción tan pronto se solidifique el control.	—: No liquefacción P: Liquefacción parcial C: Liquefacción completa
e.—Leche hierro	Proteolisis Utilice placas de titulación en gotas para comprobar la acidez.	A: Acida C: Coágulo G: Gas D: Digestión N: Negro

MEDIO	OBJETO	ANOTACION	
f.—Indol-nitrito	Producción de indol² Extraiga vertiendo 1 gotero lleno de xilol. Añada 1 gotero lleno de Reactivo de Ehrlich	+ : Rojo con Ehrlich — : No Rojo con Ehrlich	
g.—Indol nitrito	Reducción de los nitratos³ Añada 1 gotero completo de sol.A. y ½ de sol.B. Si no hay color agregue polvo de zinc.	+ : Rojo con A + B — : No Rojo con Zinc (puede ser lento) + NO ₂ : Incoloro con Zinc	
h.—H ₂ S	Producción de H₂S revelable con papel de acetato de plomo,	— : No ennegrece tr: trazas (lig. negro) + : Negro	
i.—Urea	Producción de ureasa Si el indicador de rojo fenol es reducido, añada 1 gota de sol de rojo fenol al 1% el último día de incubación.	+ : Rojo oscuro — : Incoloro RI: Reducción del indicador ¹	
j.—Medio movilidad	Movilidad	+ : Móvil — : Inmóvil	
k.—Esculina	Hidrólisis de la esculina y producción de H ₂ S. La esculina hidrolizada no fluoresce con la luz de Wood.	+ : Pardo rojizo H ₂ S: Negro — : Sin cambio (negativo)	
l.—Triple azúcar hierro agar (TSI)	pH, Gas H₂S	bisel taco papel taco A: ácido G: Gas tr: a 4 + tr: a 4 +	B: Básico N: neutro

MEDIO	OBJETO	ANOTACION
		—: No hay producción de gas
		tr: Escasas burbujas
	Catalasa	1+: Pocas burbujas tardías
m.—tubo inclinado de infusión agar	Agregue 1 ml de H ₂ O ₂ al 3% al crecimiento del bisel. La producción de gas indica la presencia de catalasa.	2+: Número considerable de burbujas tardías
		3+: Muchas burbujas de aparición inmediata
		4+: Burbujas hasta la parte superior del tubo
n.—Thioglicolato	Medio de transporte y características de crecimiento.	G: Gas Describe crecimiento y olor
o.—caldo carne glucosado	Comprobación de toxinas solamente en Clostridios.	
	Liquefacción del suero solamente en clostridios.	
p.—Suero de Löeffler	La digestión no se observa generalmente sino a partir del 5º día.	D: Digestión

1.—Algunos clostridios pueden reducir el indicador. Si esto ocurre prepare una solución diluida de azul de bromotimol (ABT), utilizando 2 a 3 gotas de la solución acuosa al 1% de ABT por 30 ml de agua y consérvela en un frasco gotero de 30 ml. Coloque gotas de la solución diluida en las excavaciones de las placas de titulación. Con una pipeta capilar vierta unas gotas del cultivo en las excavaciones que contienen el indicador, mezcle bien y observe el color producido. Anote la reacción ácida (amarilla) o negativa (azul).

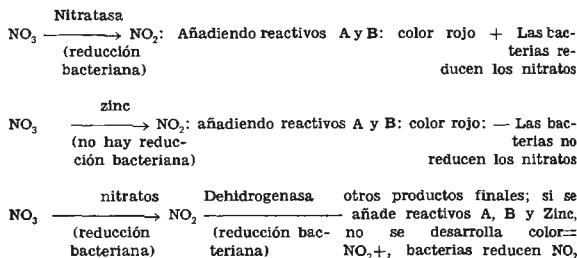
2.—La prueba para la producción de indol es un simple acoplamiento de un grupo aromático (indol) a otro (para dimetil-aminobenzaldehído) que dan un producto coloreado. El indol es generalmente formado por triptofano por la acción de una enzima: la triptofanasa.



3.—Algunas bacterias reducen los nitratos (NO_3) a nitritos (NO_2); otras reducen nitritos hasta otros productos (N_2O , NH_2OH , NH_3).

En la prueba de los nitratos la solución A (ácido sulfanílico) y la solución B (dimetil-alfa-naftilamina) son utilizadas para indicar la presencia de nitritos ($\text{NO}_2 + \text{A} + \text{B} = \text{color rojo}$).

Tres tipos de reacción pueden observarse:



Se adiciona glucosa al medio como dador de hidrógeno.

En los medios que contienen agar, la reducción de los nitratos por el polvo de zinc generalmente se verifica lentamente, algunas veces requiere 15 minutos o más. **Cualquier** desarrollo de color rojo después que se añade el polvo de zinc es suficiente para indicar que el "cultivo" es nitrato negativo; o sea que el zinc redujo el nitrato del medio.

**INVESTIGACION DE LAS TOXINAS DE LOS CLOSTRIDIOS
PRUEBAS DE NEUTRALIZACION DE LAS TOXINAS Y
PRUEBAS DE PATOGENICIDAD**

A.—Pruebas para las toxinas de los clostridios.

- 1.—Todos los cultivos de los **Clostridios** son probados de rutina para la investigación de la producción de toxinas. Aunque las condiciones para la elaboración de toxinas varía con cada especie, las toxinas de los clostridios son generalmente reveladas en cultivos en caldo carne glucosado incubados por 18 horas a 35-37° centígrados.

Si se sospecha la presencia de **C. novyi A**, debe emplearse medio de caldo carne sin dextrosa (4), (5). Los cultivos con probabilidad de ser **C. botulinum** o **C. sporogenes** deben cultivarse en medio de carne-dextrosa-almadón e incubarse a 30°C (vea páginas relativas al examen de alimentos para **C. botulinum** y sus toxinas). (6).

Debe tenerse en cuenta la edad de los cultivos. Algunos clostridios, como por ejemplo: **C. perfringens**, **C. histolyticum** y **C. hemolyticum** son más tóxicos en cultivos jóvenes y otros como por ejemplo:

C. botulinum, **C. novyi** y **C. tetani**, presentan su máximo de toxicidad después de varios días de incubación. (4, 5).

- 2.—Haga las pruebas de toxicidad de rutina en caldo carne dextrosa cultivados por 18 horas a temperatura de 35-37°C.

- a.—Con pipeta transfiera 3.0 ml del sobrenadante del cultivo a un tubo de centrifuga plástico de 12 ml.

- b.—Centrifugelo a 10.000 RPM por 10 minutos. Decante el líquido sobrenadante en un tubo limpio.

- c.—Llene una inyectadora de 1.0 ml. con 8.8 ml del cultivo centrifugado e inocule 2 ratones de 15 a 20 gramos de peso por vía intra-peritoneal con 0.4 ml cada uno.

- d.—Observe los ratones hasta por 3 días. Los cultivos de clostridios tóxicos generalmente matan al ratón dentro de las 24 horas siguientes a la inoculación.

- e.—La posibilidad de necesitar pruebas futuras de toxinogenia empleando medios especiales, condiciones de cultivo o procedimientos de inoculación, dependerá del resultado total de los cultivos, pruebas bioquímicas y las de toxicidad de rutina.

B.—Identificación de toxinas específicas de los clostridios.

- 1.—Cuando se ha comprobado que el líquido de cultivo de un **clostridio** es tóxico para el ratón es a menudo útil en la identificación del organismo realizar pruebas de protección en el animal utilizando sueros inmuno-específicos. La neutralización de un líquido tóxico es generalmente realizada mezclando 1.2 ml de cultivo líquido centrifugado con 0.3 ml de antitoxina específica, dejando permanecer la muestra por 30 minutos a 37°C y luego inoculando 2 ratones, cada uno con 0,5 ml del material por vía I. P.
- 2.—Los antisueros para **Clostridios** que se consiguen en el comercio son los siguientes:

C. perfringens tipos A, B, C, D y E.

C. novyi tipos A y B.

C. chauvoei

C. tetani

C. botulinum tipos A, B, C, D, E y F.

C.—Pruebas de patogenicidad.

- 1.—La determinación de las propiedades patógenas de una bacteria anaeróbica es bastante útil en la evaluación del papel que un organismo pueda jugar en un proceso patológico. El tipo de animal de laboratorio empleado y las condiciones requeridas para la demostración de la patogenicidad son muy variables y dependen de la especie a ensayar.
- 2.—Los cultivos de los **Clostridios** son probados de rutina para su patogenicidad inoculando un cobayo por vía I. M. en el muslo con 0.5 ml de una mezcla que contenga partes iguales de un cultivo en caldo carne dextrosa de 18 horas y solución de cloruro de calcio al 10%.
- 3.—La acción patógena de los cultivos de los **Clostridios** en los cobayos después de una inyección es muy variada y puede ocasionar:

1.—edema hemorrágico o gelatinoso, 2.—bolsa de gas en el tejido infectado, 3.—necrosis, 4.—digestión del tejido muscular, 5.—muerte rápida por intoxicación con pocos cambios patológicos visibles, 6.—parálisis y/o espasmos musculares tóxicos (4, 5). Los cambios patológicos generalmente aparecen dentro de un período de 4 a 5 días, sin embargo, los cobayos deben ser mantenidos en observación por un período de dos semanas antes que los cultivos sean reportados como no patógenos.

V

TIPAJE DE LA TOXINA DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

A.—La mayoría de las infecciones humanas o intoxicaciones por *C. perfringens* son debidas a cepas del tipo A. Las cepas de los tipos A, B, C, D y E son responsables de una variedad de enfermedades en los animales. Las cepas del tipo A producen una toxina alfa letal y todos los otros tipos producen al menos una toxina letal mayor además de la toxina alfa. La diferenciación de los tipos está en la revelación y neutralización de las toxinas en los centrifugados de los cultivos en medios líquidos. Las pruebas de toxicidad y seroneutralización para tipificación son realizadas en ratones.

Los tipos de *C. perfringens* se caracterizan por la producción de una o más de las toxinas letales siguientes

Tipo	A	B	C	D	E
Tipo	α	$\alpha \beta \epsilon$	$\alpha \beta$	$\alpha \epsilon$	$\alpha \epsilon$

Las toxinas epsilon-iota son activadas por la tripsina. (7).

Las toxinas alfa y beta son inactivadas por la tripsina.

B.—Preparación del centrifugado de cultivos líquidos (CCL).

- 1.—Utilice cultivos de caldo carne almidón de 6 a 16 horas (no más viejos).
- 2.—Centrifuge los cultivos líquidos en tubos de centrifuga de polietileno a 10.000 RPM (preferiblemente a baja temperatura) por 10 minutos.
- 3.—Vierta el CCL en tubos de 15 x 125 mm.
- 4.—Para la tripsinización mezcle una parte de solución de tripsina al 1% y 9 partes de CCL en tubos de 15 x 125 mm e incube la mezcla por 30 minutos en baño maría a 37°C.

C.—Determinación de la toxicidad

- 1.—Inocule ratones con 0.5 ml cada uno por vía I. P. con CCL no tratado.
- 2.—Inocule 2 ratones con 0.5 ml cada uno por vía I. P. con CCL tripsinizado.
- 3.—Observe los ratones por 48 horas. Las cepas del tipo A generalmente matan al ratón dentro de las 18 horas después de la inoculación.

D.—Pruebas de sero-neutralización.

- 1.—Cuando trabaje con gérmenes tóxicos aislados de material humano el procedimiento de rutina para la neutralización consiste en probar con el antisuero tipo A y un control con suero normal de conejo (SNC). Esta prueba incluye los tubos 1, 2, 5 y 6 de la tabla N° II. Si los ratones inoculados con ambas muestras tripsinizadas y no tripsinizadas neutralizadas con antisuero A no mueren, el cultivo es reportado como no perteneciente al grupo A.

Si ocurre la muerte, el CCL es probado con antisueros de los tipos restantes de *C. perfringens*.

- 2.—En un tubo de 12 x 75 mm mezcle 1.2 de CCL o CCL tripsinizado con 0.3 ml del tipo específico de antisuero de *C. perfringens* (tipos A, B, C, D o E) o suero normal de conejo (SNC) como se muestra en el cuadro N° II.
- 3.—Incube la muestra CCL-antisuero por 30 minutos en baño de agua a 37°C e inocule 2 ratones por vía IP con cada muestra.

C U A D R O I I

PRUEBAS DE NEUTRALIZACION DE TOXINAS DEL *C. PERFRINGENS* EN
RATONES UTILIZANDO SOBRENADANTES DE CULTIVOS CENTRIFUGADOS

Tubos	Mezcla inyectada	Letalidad para el ratón con <i>C. perfringens</i> tipo				
		A	B	C	D	E
1	CCL NO TRATADO + SUERO NORMAL DE CONEJO	+	+	+	+	+
2	CCL NO TRATADO + ANTI A (anti alpha)	-	+	+	*-	±
3	CCL NO TRATADO + ANTI C (anti alpha + anti beta)	-	*-	-	*-	±
4	CCL NO TRATADO + ANTI B (anti alpha antiβ + antiε)	-	-	-	-	±
5	CCL Tripsinizado + SUERO NORMAL DE CONEJO	±	+	**-	+	+
6	CCL Tripsinizado + ANTI (anti alpha)	-	+	*-	+	+
7	CCL Tripsinizado + ANTI D (anti alpha + anti-epsilon)	-	*-	**-	-	+
8	CCL Tripsinizado + ANTI B antiα + antiβ + antiε)	-	-	-	-	+
9	CCL Tripsinizado + ANTI E (anti alpha + anti iota)	-	+	*-	+	-
	Toxina identificada	a	β+ε	β	ε	ι

* Generalmente negativa, la toxina epsilon se encuentra en forma de protixina

** Generalmente negativa, la toxina beta es destruida por la tripsina.

VI

AGLUTINACION DEL CORYNEBACTERIUM ACNES

A.—El antígeno para la prueba se prepara con cultivos de 48 horas en tubos inclinados de corazón-infusión-dextrosa-agar.

1.—Suspenda el crecimiento de cada tubo inclinado en 1.0 ml de solución salina al 0.85% formolizada al 0.4%.

2.—Con una pipeta capilar que tenga enrollada en su punta una fina capa de algodón no absorbente, filtre la suspensión al través del algodón mientras llena la pipeta. Coloque la suspensión filtrada en tubos con tapa de rosca de 13 x 100 mm.

B.—Un antígeno de *Corynebacterium acnes* y el antígeno a probar deben ser controlados con dos antisueros de *Corynebacterium acnes* (Nº 554 y Nº. 605 NCDC) y con suero normal de conejo en cada investigación que se haga.

C.—Prueba de aglutinación en lámina.

1.—Con lápiz graso, marque la lámina de modo que quede dividida en tres partes iguales.

2.—Coloque una (I) gota de cada suero diferente cerca del borde distal de un área. Agrégue una (I) gota de antígeno en cada área y cerca del borde próximo al operador. Mezcle los reactivos inclinando la lámina.

3.—Anote los resultados así:

Negativo: No hay aglutinación

1 + : 25 % de organismos aglutinados

2 + : 50 % " " "

3 + : 75 % " " "

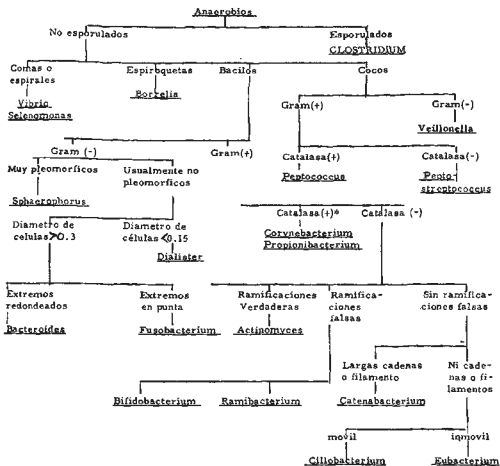
4 + : 100 % " " "

NOTA: La mayoría de las cepas de *C. acnes* son aglutinadas fuertemente por uno o ambos antisueros específicos. Además otros *Corynebacterium* (*Propionibacterium*) anaerobios íntimamente relacionados también pueden ser aglutinados.

LLAVES PARA LA IDENTIFICACION
DE BACTERIAS ANAEROBICAS

DIAGRAMA 1

DIFERENCIACION PRIMARIA DE BACTERIAS
ANAEROBICAS HASTA NIVEL DEL GENERO



* Algunas cepas con catalasa negativa

CUADRO III
LLAVE DICOTOMICA PARA LA IDENTIFICACION DE LOS CLOSTRIDIOS
ENCONTRADOS CON MAYOR FRECUENCIA

Glucosa	Manitol	Lactosa	Indol	Sacarosa	Movilidad	Crecimiento aerobico	Almidón	Glicerol	Leche	Reducción de Nitratos	Esporas	Gelatina	Indol	Ureasa	Toxicidad	Hemólisis	ESPECIES
A	A	A	+														sphenoides
			-														tertium
							+										butyricum
																	innocuum
											T						difficile
											ST						sphenoides
																	carnis
				A	+	+											paraputrificum
						-	A										fallax
																	chauvoet
																	pereringens
																	+ septicum
																	- aerofaetium
									D								sordellii
																	bifermentans
																	botulinum ABF
																	sporogenes
																	novyi
									A	+							capitovale
																	haemolyticum
											T						botulinum BCDE
											ST						tetanomorphum
																	histolyticum
																	tetani
																	lentoputrescens
																	subterminale
																	cochlearium

**CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DE CLOSTRIDIOS
ENCONTRADOS CON MAYOR FRECUENCIA.**

ESPECIES	Hemólisis			Ureaa Catalasa Cr. Aeróbico	Gelatina				Azúcaro	Indóles						Esporas	Fecundidad Patogenicidad								
	Stemática	Lectinasa	Lipasa		Gelatina	Leche	Carnic	Sucro		Glucosa	Mantol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina			Glicerol	Almidón	% TGI	PMAc Med.	Nitrato Indol	Movilidad		
aerofotidum ^o	-	-	-	-	D	AC (B)	BD	D	A	-	A	-	A	A	-			+ - +	OST	sl					
bifermentans	+	+	-	-	D	D	B	(D)	-	A	-	-	-	A	v	A ⁻	-	3/2	+	-	+	+	OST	-	-
botulinum ABF	+	sm	+	-	D	BD	BD	D	A	-	-	v	A	v	v			4/4	+	-	-	+	OST	+	
botulinum BCDE	+	sm	+	-	D	A	-	-	A	-	-	v	v	v	v			7/-	-	-	-	+	OST	+	
butyricum	-	-	-	-	-	AGC	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A			-	-	+	OST	-	-	
capitovale	-	+	-	-	D ⁺	A (C)	B	-	A	-	-	-	-	-	-	-		4/4	+	-	+	+	OT	-	+
carnis ^o	-	+	-	-	-	A	-	-	A	-	A	A	A	A	-	v		1/-	-	-	-	+	OST	?	+
cochlearium ^o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+	OST	-	-		
difficile	-	-	-	-	+	-	-	-	A	A	-	-	-	A	-			2/-	tr	-	-	+	OST	v	+
fallax ^o	v	-	-	-	-	A (G)	P	-	A	-	A	A	A	A	-	A		-	-	+	OST	sl	v		
chauvoei	+	-	-	-	D ⁺	A (G)	G	-	A	-	A	A ⁻	A	(A)	-	-		2/-	-	+	-	+	OST	+	+
haemolyticum	+	+	-	-	D	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-			7/-	-	+	+	OST	+	+	
histolyticum	+	-	-	-	D	C (B)	ED	D	-	-	-	-	-	-	-			2/-	tr	-	-	+	OST	sl	+
innocuum	+	-	-	-	-	A	-	-	A	A	-	v	A	A	-			3/-	v	-	-	-	OT	-	-
lentoputrescens ^o	+	-	-	-	D	C (DB)	D		-	-	-	-	-	-				-	+	+	RT	-	-		

C U A D R O V

**CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO
DE BACILOS ANAEROBICOS NO ESPORULADOS**

ESPECIES	GRAM	MORFOLOGIA	
		CELULAR	COLONIAL
<i>C. acnes</i>	+	Bacilos pleomórficos, pequeños, granos en rosario, formas en porra (thioglicolato, AS)	Gotas de rocío, blancas convexas, borde continuo, opacas, lustrosas
<i>B. fragilis</i>	-	Bacilos regulares con extremos romos, pueden ser pleomórficos (AS), usualmente vacuolados (thioglicolato).	Moteadas, circulares, borde continuo, lustrosas.
<i>B. variabilis</i>	-	Bacilos pequeños con extremos romos (AS) vacuolados (thioglicolato).	Circulares, borde continuo, lustrosas, opacas con periferia translúcida.
<i>B. terebrans</i>	-	Bacilos pequeños con extremos romos (AS), delgados con extremos romos, usualmente filamentosos, algunos en cadena (thioglicolato).	Circulares, borde continuo, translúcidas, elevadas hasta ligeramente convexas.
<i>B. melaninogenicus</i>	-	Formas cocoides (AS) bacilos pleomórficos, vacuolados, degenerados (thioglicolato).	Colonias negras en AS después de 4 a 5 días de incubación.
<i>S. necrophorus</i>	-	Bacilos pleomórficos con extremos romos, esférulas y cuerpos circulares (AS y thioglicolato).	Umbonadas, opacas con periferia translúcida, circulares.
<i>F. fusiforme</i>	-	Bacilos delgados con extremos puntiagudos, algunos o la mayoría con formas filamentosas (AS y thioglicolato)	Circulares, borde continuo, lustrosas, ligeramente convexas, translúcidas, a menudo con tinte verdoso, moteadas.
<i>F. girans</i>	-	Husos pequeños o medianos, generalmente en pares (AS thioglicolato).	Poco convexas, ligeramente irregulares, moteadas, opacas.

CUADRO VI

CARACTERÍSTICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO DE BACILOS
ANAERÓBICOS GRAM NEGATIVOS NO ESPORULADOS

ESPECIES	Relación O ₂	Catalasa	Producción de Leche	Gelatina	Nitritos	Indol	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Fructosa	Xilosa	Arabinosa	Almidón	Esculina (Hidrolisis)	OTROS	
<i>Bacteroides corvipes</i>	AN	-	V	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Colonias hundidas formando hoyos en agar sangre.	
<i>Bacteroides fragilis</i>	AN	V	+	ACG ^A	-	-	A	-	A ²	A ²	A ²	-	-	A	A	-	A ²	+	Mayoría de cepas encapsuladas	
<i>Bacteroides incomptus</i>	AN	-	V	ACG ^A	-	-	A	-	A	A	A	- ^A	-	A	A	A	A	+	Mayoría de cepas encapsuladas	
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	AN	-	+	D	+	+	A	-	V	V	V	-	V	V	-	-	V	V	Colonias negras en agar sangre. Requieren hemina. Mayoría requieren Vit. K.	
<i>Bacteroides oralis</i>	AN	- ⁺	V	ACG	-	-	A	-	A	A	A	- ^A	-	A	-	-	A ⁺	+	+	
<i>Bacteroides terebrans</i>	AN	-	-	A	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A	-	-	-	-	+	
<i>Bacteroides variabilis</i>	AN	V	+	ACG	-	+	A	-	A ²	A ²	A ²	-	-	A	V	V	A ⁺	+	+	Generalmente encapsuladas

AN: Anaerobico
F: facultativo
D: digestión

N: microaerofílico
V: variable

A: Amarillo con azul de bromotimol (Acido)
a: verde con azul de bromotimol (ácido débil)
Soprescritos: reacciones ocasionales

C: coagulada d: digestión ligera
G: gas

CUADRO VI (continuación)

ESPECIES	Relación O ₂	Catalasas	Prod. de gas	Leche	Gelatina	Nitritos	Indol	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Fructosa	Xilosa	Arabinosa	Almidón	Esculina (Hidrolisis)	OTROS	
<u>Bacteroides</u> Species (NCDC grupo F1)	AN	-	V	o A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Exigentes	
<u>Bacteroides</u> Species (NCDC grupo F2)	AN	-tr	-tr	A	+ +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Exigentes	
<u>Bacteroides</u> Species (NCDC grupo F3)	AN	-	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Exigente, colonias muy planas y exten- sivas	
<u>Fusobacterium</u> <u>fusiforme</u>	AN	-tr	V	-	-	-	+	A o s	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	
<u>Fusobacterium</u> <u>grans</u>	AN	-tr	V	AC ^A	- ^d	-	-	A	-	A ⁻	A	A	A ⁻	-	A	A	A	-	-	+	Moviles
<u>Sphaerophorus</u> <u>neurophorus</u>	AN	-	V	o A	-	-	+	A	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	Muy pleomórficos

AN: anaerobico

M: microaerofílico

A: amarillo con azul de bromotil (Acido)

C: Coagulada d: digestión

F: facultativo

V: variable

a: verde con azul de bromotimol (ácido débil)

G: gas

D: digestión

Superscritos; reacciones ocasionales.

CUADRO VII

**CARACTERÍSTICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO
DE COCOS ANAEROBICOS**

ESPECIES	Relación O ₂	Catalasas	Prod. de gas	Leche	Gelatin	Nitrito	Inulín	Citocosa	Mantol	Leucosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Fructosa	Xilosa	Arabinosa	Ac. A. Amidón	Hid.	Esculina (hidrólisis)	OTROS	
<u>Pentococcus</u> (NCDC grupo 1)	AN	+	V	-	-	-	V	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + masas irregulares.	
<u>Pentococcus</u> (NCDC grupo 2)	AN	+	-	δ A	-	+	-	A	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	-	-	Cocos Gram + masas irregulares.	
<u>Peptostreptococcus</u> (NCDC grupo 1)	AN	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + pares, cadenas	
<u>Peptostreptococcus</u> (NCDC grupo 2)	AN	-	V	-δ δ A	-	d +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + pares cadenas (alg. pleomórficos)	
<u>Peptostreptococcus</u> (NCDC grupo 3)	AN	-	V	V	-	V	-	A	-	V	A	-	A	-	A	-	-	-	A	-	+	Cocos Gram + es pares, cadenas, (Algunos pleomórficos)
<u>Serratia</u> Species	AN	-	V	-δ A	-	d	-	+	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + grandes masas tridimensionales.	
<u>Veillonella</u> <u>alcaligena</u>	AN	+	V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pequeños Cocos Gram - pares, cadenas cortas y masas irregulares.	
<u>Veillonella</u> <u>parvula</u>	AN	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram - pequeños, pares, cadenas pequeñas y masas irregulares.	

AN- anaerobico Mx microaerofílico As amarillo con azul de bromotimol (Acido) C= coagulado d- digestión ligera
 F- facultativo V- variable + verde con azul de bromotimol (Acido débil) D= digestión G= gas
 Superocritas reacciones ocasionales

CUADRO VIII

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS CULTIVOS DE ACTINOMYCES

ESPECIES	Crecimiento en caldo thioglicolato	Morfología microscópica de cultivos en caldo thioglicolato	Morfología de las colonias en caldo cerebro infusión agar, después de 24-48 hrs a 37°C (colonias jóvenes)	Morfología de las colonias en cerebro corazón infusión agar después de 7-10 días de incubación a 37° C (colonias maduras)
<u>Actinomyces boydii</u>	Difuso	Usualmente difteróide.	Planas, granulosa, completas (rara vez colonias de araña)	Lisa, completa, (rara vez rugosa)
<u>Actinomyces israelii</u>	Granuloso, caldo claro, (rara vez difuso)	filamentoso, ramificado (raras veces difteróide)	"Colonias araña" raras veces planas, granulosa, enteras)	"como nueces, (raras veces lisas)
<u>Actinomyces naeblandii</u>	Difuso o granular	"Difteróides" o filamentosos	"colonias araña" o lisas enteras.	rugosas o lisas
<u>Actinomyces odontolevus</u>	difuso	"difteróides"	Planas, granulares, enteras.	lisas
<u>Actinomyces propionicus</u>	Igual al <u>A. israelii</u>	Igual al <u>A. israelii</u>	Igual al <u>A. israelii</u>	Igual al <u>A. israelii</u>
<u>Actinomyces rickiae</u>	difuso	"Difteróide" o filamentosos, ramificado o bifurcado.	Plana, granulosa, entera.	Lisa con periferia con festones o flecos.

Las reacciones para las especies de Actinomyces están basadas principalmente en datos de la Unidad de Micología Sección de Micología, - NCDC - Cortesía de la Dra. Lucille George.

CUADRO IX

CARACTERÍSTICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO DE BACILOS ANAEROBICOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS

ESPECIES	Reacción Oz	Catalasa	Prod. de Gas	Leche	Gelatina	Nitrógeno	Indol	Glucosa	Mantol	Lectosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Xilosa	Arabinosa	AC	Hil	Almidón	Elasina (Hidrolisis)	OTROS
<i>Actinomyces bovis</i>	M δ AN	-	-	A	d	+	-	A	-	A	V	V	+	+	(tardío) V	-	A	+	+		Aislados solamente de material animal
<i>Actinomyces israelii</i>	M or AN	-	-	δ	d	+	-	A	V	A	Δ	A	A	-	A	A	V	-	+		
<i>Actinomyces nasslundii</i>	F	-	-	A δ ACD	-	V	-	A	-	+	A	A	V	V	-	-	+	-	V		Crece más rápidamente que otros <i>Actinomyces</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	M δ AN	-	-	+	-	+	-	A	-	V	V	V	-	+	V	V	A	+	+		Colonias rojas en agar sangre (3 a 5 días)
<i>Actinomyces propionicus</i>	M δ AN	-	-	+	-	+	-	A	A	A	A	A	-	-	-	-	+	-	-		
<i>Actinomyces griffithii</i>	AN	-	V	δ AC ACD	-	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	+	V		
<i>Bifidobacterium species</i>	AN	-	V	AC	-	-	-	A	V	A	A	A	V	-	A	V	V	V	V		Pleomórficas, ramificaciones, extremos bifurcados
<i>Bifidobacterium cornutum</i>	AN	+	V	δ A	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-		Pleomórficas, ramificadas, puntas bifurcadas

AN: anaerobico

M: microaerofílico

A: Amarillo con azul de bromotimol (Acido)

C: coagulado

d: digestión ligera

F: facultativo

V: variable

a: verde con azul de bromotimol (acido débil)

D: digestión

G: gas

Suprescritos: reacciones ocasionales.

VIII

EXAMEN DE LOS ALIMENTOS PARA INVESTIGACION DE *C. BOTULINUM* Y DEMOSTRACION DE LAS TOXINAS BOTULINICAS EN ALIMENTOS Y SUERO SANGUINEO.

A.—Seis tipos toxigénicos de *C. botulinum* han sido reconocidos en base a las seis toxinas antigenicamente distintas, producidas por diferentes cepas del mismo organismo. Los casos de botulismo humano son generalmente producidos por los tipos A, B, E y F.

Los tipos C y D son generalmente los causantes de brotes de botulismo en pájaros y otros animales (4, 5, 6). El medio más efectivo para el diagnóstico de botulismo en el laboratorio es la identificación de la toxina específica en el suero sanguíneo del paciente (15). Un diagnóstico de laboratorio indirecto puede ser realizado por la demostración de la presencia de toxinas en los extractos de alimentos incriminados como causa de la intoxicación. También es útil aislar el agente causal de muestras de alimentos y confirmar el tipo por pruebas de neutralización en el ratón.

Para descubrir la toxina de *C. botulinum* en muestras de alimentos, tales como carne, pescado, etc. es necesario extraer la toxina con un diluyente adecuado. Porciones líquidas de alimentos enlatados, extractos o cultivos en medio líquido son centrifugados antes de la prueba. Los productos así clarificados, son inoculados al ratón y si se revela la presencia de alguna toxina, ésta es específicamente identificada por neutralización con antitoxina tipo específico. La toxicidad de las toxinas de *C. botulinum* tipo E y de cepas no proteolíticas de *C. botulinum* B y F pueden ser considerablemente aumentadas por la adición de tripsina, (16, 17). Por esta razón la demostración de la toxina y la neutralización en el ratón deben ser realizadas con material tripsinizado así como no tripsinizado. Las muestras de suero no requieren ser tripsinizadas para activar las toxinas. (15).

B.—Preparación del extracto de alimento.

- 1.—Anote toda información que identifique la muestra de alimento.
- 2.—Si se trata de alimentos enlatados, limpie bien la tapa con alcohol al 70%. Antes de abrirla y con el fin de evitar los aerosoles, coloque la lata en una bolsa de plástico adecuada al tamaño del envase.
- 3.—Anote las condiciones del alimento (gaseoso, oscuro, pútrido, etc.).
- 4.—Triture el alimento en un mortero frío, estéril (prepesado).
 - a.—Coloque el alimento en el mortero, péselo y anote la cantidad de alimento utilizado. Si se dispone de suficiente material, 50 gramos es una cantidad adecuada para la investigación.
 - b.—Aguague 1 ó 2 gramos de arena estéril.

c.—Añada una pequeña cantidad (5 ml) del diluyente de gelatina previamente enfriado y triture con mazo estéril para obtener una suspensión homogénea. En algunos casos, cuando el alimento está extremadamente seco, puede ser necesario agregar diluyente-gelatina adicional de manera de poder triturar la muestra.

d.—Después de la trituración, agregue diluyente suficiente para alcanzar un volumen de diluyente igual a los gramos de alimento empleado (V/P).

5.—Haga un frote y tíñalo con Gram. Anote: tamaño de los bacilos, número aproximado y tipo de organismos existentes, presencia y localización de esporas.

C.—Cultivo de una muestra de alimento.

1.—Tratamiento por el alcohol.

a.—Utilizando una pipeta de seguridad (Pro-Pipette) o una pipeta, capilar con la punta rota, vierta aproximadamente 0,5 ml de la suspensión de alimento en un tubo estéril de 13 x 100 mm. con tapa de rosca.

b.—Agregue un volumen igual de alcohol absoluto e incube a temperatura ambiente por una hora, mezclando con intervalos de 15 minutos aproximadamente. El tratamiento por el alcohol mata las bacterias pero las esporas permanecen viables. (6).

2.—Caliente 5 tubos de caldo carne-dextrosa-almidón en agua hirviendo por 10 minutos. Transfiera 3 tubos a un baño de agua a 70°C. y enfríe los 2 tubos restantes en agua corriente.

3.—Inocule uno de los dos tubos enfriados de caldo-carne-dextrosa-almidón con suspensión de alimento no tratado y el segundo con la suspensión tratada por el alcohol. Con una pipeta capilar inocule el fondo del tubo con 0.5 a 1.0 ml. Evite la introducción de burbujas de aire en el medio durante la siembra.

4.—Después de equilibrar la temperatura, inocule los 3 tubos de caldo-carne-dextrosa-almidón en baño de agua a 70° C. Anote el tiempo de inmersión; a los 10 minutos traslade un tubo a agua fría, los 2 restantes llévelos a baño de agua a 80° C por 10 minutos, antes de enfriar. Después de 10 minutos a 80° C, enfríe un tubo y coloque el tubo restante en agua hirviendo por 10 minutos adicionales antes de enfriar.

5.—Incube el medio de caldo-carne-dextrosa-almidón en una jarra anaerótica a 30° C. Algunos tipos de *C. botulinum* producen poca o ninguna toxina por encima de 30° C. (17). La producción máxima de toxina ocurre generalmente después de 3 a 5 días de incubación (6).

6.—Aislamiento e identificación.

Para obtener cultivos puros de *C. botulinum*, subcultive del medio carne-dextrosa-almidón a placas de agar sangre y EYA.

Siempre de manera de obtener colonias aisladas. Incube las placas en jarras anaerobias a 35-37° C. Por 48 horas. Transfiera las colonias aisladas a tubos de caldo-carne-dextrosa-almidón e incúbelas a 30° C. Establezca la identidad de los cultivos puros empleando los procedimientos convencionales de cultivo, bioquímicos y el tipaje de la toxina por medio de pruebas de neutralización en el ratón.

D.—Tipaje de la toxina de *C. botulinum* en alimentos o cultivos.

1.—Clarificación.

a.—Suspensión de alimentos. Exprima en el mortero las partículas de alimento y vierta la suspensión en un tubo plástico adecuado a la centrifugación.

b.—Cultivos.

Vierta la porción líquida de los tubos de caldo -carne-dextrosa-almidón incubados a 30° C. a un tubo plástico de centrifuga.

c.—Centrifugue la suspensión de los alimentos o cultivos líquidos a 10.000 RPM. por 10 minutos (preferiblemente en centrifuga refrigerada). En la centrifugación también puede emplearse una velocidad menor por tiempo mayor.

d.—Vierta el sobrenadante en tubos de 15 x 125 mm. para reacciones. En algunos casos es necesario clarificar con una segunda centrifugación.

2.—Tripsinización.

Mezcle 4.5 ml. de extracto de alimento o cultivo líquido con 0.5 ml. de solución de tripsina al 1% e incúbela a 37° C. por 45 minutos.

3.—Inoculación al ratón.

a.—Rotule 11 tubos (15 x 85 mm) y prepare las mezclas según la tabla número X.

C U A D R O X

INVESTIGACION DE LAS TOXINAS DE *C. botulinum* EN EXTRACTOS DE ALIMENTOS O CULTIVOS EN MEDIO LIQUIDO

Tubo N°.	extractos o cultivo liquido	Suero o antitoxina	Tratamiento
1	1.2 ml puro	0.3 ml SNC*	37°C por 30'
2	1.2 ml puro	0.3 ml SNC después de calentado y enfriado	Tapar el tubo con algodón. Hervir en agua por 10 minutos
3	1.2 ml puro	0.3 ml anti-A	37°C por 30'
4	1.2 ml puro	0.3 ml anti-B	37°C por 30'
5	1.2 ml puro	0.3 ml anti-E	37°C por 30'
6	1.2 ml puro	0.3 ml anti-F	37°C por 30'
7	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml SNC	37°C por 30'
8	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml SNC después de calentado y enfriado	Tapar el tubo con algodón. Hervir en agua por 10 minutos
9	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml anti-B	37°C por 30'
10	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml anti-E	37°C por 30'
11	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml anti-F	37°C por 30'

* SNC: suero normal de conejo.

b.—Inocule 2 ratones por vía intraperitoneal con cada muestra a probar. Puede utilizar una inyectadora de 1 ml para inocular 2 ratones.

c.—Observe los ratones al menos por 4 días. Las muertes por botulismo ocurren entre las 6 y 24 horas después de la inoculación; sin embargo ocasionalmente pueden observarse muertes tardías. Los signos del botulismo en el ratón a menudo aparecen dentro de las 4 horas después de la inoculación e incluyen: piel erizada, respiración laboriosa y debilidad de los miembros⁽¹⁶⁾.

d.—Si la toxina botulínica está presente en los alimentos, o en su cultivo en suficiente cantidad para ser reveladas bajo las condiciones de prueba, el ratón que reciba la muestra no tratada debe morir y el que haya sido inoculado con el material calentado debe sobrevivir. Como la toxina debe ser neutralizada por la antitoxina específica el tipo responsable será revelado por el tipo de antitoxina mezclado con la muestra. Si el ratón no está protegido por las antitoxinas usadas, la toxina puede ser del tipo C-D o una potente antitoxina de los tipos probados. Para descartar los tipos C y D, repita la prueba utilizando extracto no tripsinizado y las antitoxinas adecuadas, al mismo tiempo que controles calentados y no calentados. Para probar una antitoxina potente, el extracto debe ser diluido en el diluyente especial de gelatina y repetida la prueba de neutralización. Si se trabaja con muestras provenientes de animales, los tipos C y D de antitoxina deben ser incluidos en la prueba de neutralización de rutina.

e.—Reconstituya la antitoxina diagnóstica de *C. botulinum* como lo recomienda el fabricante. Las instrucciones para reconstruir las antitoxinas diagnósticas preparadas por el NCDC están impresas en las etiquetas de los respectivos frascos.

En las pruebas de neutralización descritas, la antitoxina es diluida de manera que 1 unidad internacional esté contenida en 0.1 ml; por consiguiente cada ratón recibirá una unidad internacional de antitoxina. Una unidad de antitoxina neutraliza 10.000 dosis LD₅₀ por vía IP (intraperitoneal) en los casos de las toxinas de los tipos A, B, C, D y F ó 1.000 dosis ratón IP LD₅₀ en el tipo de toxina E.

E.—Tipaje de la toxina del *C. botulinum* en suero sanguíneo.

1.—Las muestras de sangre deben ser obtenidas tan pronto se conozca la iniciación de los síntomas y a intervalos durante el estado agudo y de convalecencia de la enfermedad. La cantidad de suero inyectado a los ratones no debe exceder de 1 0 ml, pues cantidades excesivas de suero humano pueden ocasionarle la muerte (15).

2.—La comprobación de la toxina y las pruebas de la neutralización son practicadas como se indica en el cuadro de la sección D con las siguientes excepciones:

a.—Se utiliza suero del paciente en lugar de extracto de alimento o cultivo líquido.

b.—Solamente los tubos 1, 3, 4, 5 y 6 son utilizados, puesto que el calentamiento coagularía el suero y la tripsinización no es necesaria para activar la toxina.

3.—Para ahorrar el suero del enfermo, es aconsejable algunas veces preparar mezclas polivalentes de antitoxinas y utilizar estas para pruebas de selección preliminar, antes de emplear las antitoxinas específicas.

**EXAMEN DE ALIMENTOS Y DE HECES PARA LA INVESTIGACION
DE *C. perfringens***

A.—Para demostrar que el *C. perfringens* es el agente causal en un brote de intoxicación alimentaria, tanto los alimentos sospechosos como las heces de los enfermos deben ser examinados cuando sea posible. La determinación cuantitativa del número de colonias del *C. perfringens* debe ser hecha en la muestra de alimento (18). Al menos 3 colonias de *C. perfringens* aisladas de los alimentos y 3 colonias aisladas de las heces por cada paciente, deben ser examinadas serológicamente para establecer el serotipo causante. En los grandes brotes, deben hacerse aislamiento de cada uno de los alimentos incriminados cuando esto es factible y 3 o más aislamientos de cada uno de diez pacientes diferentes.

B.—Numeración de *C. perfringens* en muestra de alimentos.

1.—Pese 50 gramos de alimento en un mortero. Prepare una dilución inicial al 1/10 del alimento, triture y diluya la muestra en 450 ml de agua tamponada en la forma siguiente:*

a.—Añada 1-2 gramos de arena estéril al contenido del mortero.

b.—Agregue una porción (15-20 ml) de la dilución de agua tamponada y triture en el mortero hasta obtener una suspensión homogénea.

c.—Transfiera la muestra triturada a un frasco de boca ancha utilizando la solución tamponada remanente para lavar cualquier alimento adherido al mortero y viértalo en el frasco bocón.

d.—Mezcle el contenido del frasco invirtiéndolo 50 veces.

e.—Prepare un frote de la suspensión del alimento para la coloración del Gram.

2.—Prepare diluciones 10 veces mayores (10^{-2} a 10^{-9}) por traspaso seriado de 1 ml de la muestra diluida a 9 ml de la solución tamponada.

3.—Siembre por duplicado placas de sulfito-polimixina-sulfadiazina agar (SPS) (18) las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , en la forma siguiente:

a.—mida con una pipeta 1 ml de la dilución, previamente bien mezclada y viértala en una caja de Petri.

* La muestra de alimentos también puede ser homogenizada y diluida en 450 ml de solución tamponada utilizando una mezcladora eléctrica a baja velocidad (8.000 RPM) por 2 minutos

- b.—Añada 15 ml del medio fundido, mezcle bien y deje solidificar el agar.
- c.—Cuando el agar se solidifique recúbralo con una capa adicional de 4-5 mm de SPS agar.
- 4.—Incube las placas por 24 horas en jarra anaeróbica a 35-37° C.
- 5.—Después de 24 horas de incubación, abra la jarra anaeróbica y cuente las colonias negras en todas las placas que tengan entre 30 y 300 colonias negras. Utilice para su numeración el contador de colonias (Quebec) colocando un pedazo de papel (tisú) sobre la placa de vidrio del contador de manera de facilitar su numeración.
- 6.—Confirmación del *C. perfringens*.
- a.—Trasplante al menos 10 colonias negras representativas de cada cultivo a tubos de caldo carne dextrosa (o thioglicolato).
- b.—Incube el medio caldo carne dextrosa por 4 horas a 46° C ó una noche a 35-37° C.
- (1) Haga coloraciones de Gram de cada tubo de caldo carne dextrosa, para buscar bacilos Gram positivos con extremos romos y ausencia de esporas (generalmente).
- (2) Haga preparaciones en fresco para investigar movilidad.
- (3) Trasplante de cada tubo de caldo carne 2 tubos de indol-nitrito y un tubo de medio para movilidad. Incube a 35-37° C.
- c.—Lea la movilidad a las 24 y 48 horas. Después de 48 horas de incubación, investigue indol y la reducción de los nitratos a nitritos.
- Nota: Cantidades representativas del medio indol-nitrito pueden ser probadas a las 18-24 horas y solamente los tubos negativos deben ser reincubados.
- El *Clostridium perfringens* es inmóvil, raras veces produce esporas demostrables en caldo carne o thioglicolato. Reduce los nitratos a nitritos y es indol negativo.
- 7.—Calcule el número de *Clostridium perfringens* viables por gramo de muestras de Alimentos. Promedio total de la numeración en las placas X Relación *C. perfringens* a colonias negras X dilución = Contaje total por gramo de alimentos.
- Nota: Si el contaje total de las placas con 30-300 colonias negras es obtenida en dos diluciones, calcule el número total por cada dilución y promedie.
- 8.—Conserve al menos tres colonias diferentes de los *C. perfringens* aislados en medio de caldo carne para ser utilizados en el tipaje serológico.

C.—Aislamiento del *C. perfringens* de las heces.

- 1.—Inocule dos tubos de 25 ml. de caldo thioglicolato con aproximadamente 1 gramo de heces ó 5 ml de suspensión fecal.
 - a.—Caliente un tubo en agua a 80° C. por 15 minutos y luego enfrielo en agua corriente.
 - b.—Incube ambos tubos por cuatro horas a 46° C ó 18-24 a 35-37° C.
- 2.—Después de la incubación siembre de cada tubo de caldo thioglicolato placas de agar sangre y amarillo de huevo agar. Tome para la siembra con una pipeta capilar del fondo del tubo. Coloque una gota en cada placa y siembre en estrias por agotamiento para obtener colonias aisladas. Incube las placas por 24 horas en jarra anaerobica a 35-37°C.
- 3.—Retire de la estufa la jarra que contiene las placas. Deje la jarra a temperatura ambiente 2 horas (o en la refrigeradora a 4° C por 30 minutos) para obtener el desarrollo completo de la acción hemolítica.
- 4.—Destape la jarra anaerobica y tome al menos una colonia de cada tipo similar a *C. perfringens* y transfírela a tubos de medio caldo carne dextrosa (o thioglicolato) recientemente calentados y después enfriados. Incube los tubos por 4 horas a 46° C. o una noche a 35-37° C.
- 5.—Confirme los *C. perfringens* aislados morfológica y bioquímicamente como se señala en el punto B-6.
- 6.—Para tipaje serológico conserve como mínimo tres aislamientos diferentes de *C. perfringens* por cada muestra de heces examinada.

D.—Identificación serologica de *C. perfringens*.

- 1.—Con una pipeta capilar inocule en el fondo de un tubo con medio para antígeno de *C. perfringens* 0.5 ml de un cultivo de 18-24 horas en caldo carne dextrosa. Evite la introducción de partículas de carne. Inocule el medio-antígeno por 18 horas a 35-37°C.
- 2.—Después de 18 horas de incubación examine los cultivos en medio-antígeno.
 - a.—Prepare una extensión y tíñala por Gram. Compruebe la pureza del cultivo.
 - b.—Centrifugue el cultivo en tubos de centrifuga plásticos por 10 minutos a 10.000 RPM y descarte el líquido sobrenadante.
 - c.—Agregue solución salina al 0.85% formolada al 0.5% (0.5 a 1.0 ml) al sedimento para preparar una solución suficientemente turbia para aglutinación en lámina.

Nota: Puede ser necesario filtrar el antígeno al través de un

algodón no absorbente enrollado en la punta de una pipeta capilar, de manera de obtener una suspensión homogénea.

3.—Aglutinación en lámina.

a.—Con un lápiz graso marque la lámina en 5 ó 6 partes iguales.

b.—Coloque en cada una de las áreas marcadas, hacia el borde distante al operador una gota de los antisueros de *C. perfringens* (tipos 1-13 de Hobbs). (19). Incluya en la serie una gota de suero normal de conejo como control.

c.—Coloque una gota del antígeno a probar cerca del borde próximo al operador de cada área respectiva y mezcle antisuero y antígeno por movimientos de inclinación de la lámina.

d.—Anote cualquiera reacción que ocurra dentro de los 30 segundos siguientes así:

Negativo:	Sin aglutinación
1+ :	25 % de aglutinación
2+ :	50 % de aglutinación
3+ :	75 % de aglutinación
4+ :	100 % de aglutinación

El Laboratorio de Anaerobios del NCDC actualmente posee 74 antisueros específicos para *C. perfringens*; además de los 13 serotipos de Hobbs empleados de rutina en las investigaciones de *C. perfringens* en brotes de intoxicaciones alimentarias. Solamente los antisueros preparados con las cepas de Hobbs pueden ser obtenidos actualmente en el comercio.

X

CONSERVACION Y ENVIO DE LOS CULTIVOS DE ANAEROBIOS

Los anaerobios no esporulados son mantenidos en el NCDC congelando rápidamente a -70°C . la suspensión en sangre del crecimiento obtenido en tubos inclinados de agar sangre infusión y el almacenamiento inmediato de la referida suspensión a -42°C . Las especies de clostridios son cultivadas en medio de mantenimiento cerebro y los cultivos guardados a $-20^{\circ}\text{C} - 42^{\circ}\text{C}$. La liofilización de las bacterias anaerobias es también un procedimiento satisfactorio de conservación.

A.—Almacenamiento de los anaerobios no esporulados.

1.—Transfiera cultivos en crecimiento activo en caldo carne ó thio-glicolato a tubos inclinados de agar sangre e incube estos tubos a $35-37^{\circ}\text{C}$ en una jarra anaerobica por 48 horas o hasta que haya crecimiento confluyente.

- 2.—Con una pipeta capilar añada aproximadamente 0.35 ml. de sangre desfibrinada de conejo a cada tubo, suspenda el crecimiento en la sangre y transfiera la suspensión a un tubo de vidrio estéril de 6 x 50 mm Pyrex con tapa de algodón (Corning N° 9820 es satisfactorio). Corte el exceso de algodón y flamee el extremo del tubo.
- 3.—Enfríe rápidamente la suspensión sumergiendo el tubo que la contiene en una mezcla de alcohol al 95% y hielo seco. Luego de congelada almacenese en un congelador adecuado a — 42°C.
- 4.—Para recultivar los organismos congelados, tórnese el tubo a nivel del menisco de la sangre y rótese suavemente hasta que una pequeña porción se descongele. Aspire la porción descongelada con una pipeta capilar e inocule un medio recientemente calentado y enfriado de caldo carne dextrosa o thioglicolato. Repóngalo **inmediatamente** en el congelador para futura utilización. Incube el medio de aislamiento recién sembrado en jarra anaeróbica.

B.—Almacenamiento de anaerobios esporulados.

- 1.—Con pipetas capilares, transfiera cultivos de crecimiento activo en caldo carne dextrosa a medios de conservación de cerebro e incúbelos a 35-37°C.
- 2.—Diariamente haga exámenes por coloración de Gram para comprobación de la formación de esporas. Los cultivos son guardados en el congelador a -20° C. ó a -42° C tan pronto se desarrollen las esporas o después de cinco días de incubación si no se las observa.
- 3.—Para recultivar los organismos congelados descongele el medio de conservación, transfiera unas pocas gotas al fondo de un tubo de caldo carne dextrosa recientemente calentado y enfriado. Incube este medio en jarra anaeróbica.

C.—Envío de los cultivos anaerobios.

Los cultivos anaerobios pueden ser enviados para su investigación a un Laboratorio de Referencia en tubos de medio líquido o semi sólidos.

Las placas o medios inclinados no son satisfactorios.

Los cultivos deben ser purificados antes de su envío.

La mejor forma de enviar los cultivos es utilizando un medio libre de carbohidratos que contengan 0,3 a 1% de agar tal como el medio de movilidad. El medio debe haber sido recientemente preparado, reparado en tubos tapa rosca, en forma tal de obtener una columna de 5 a 7.5 cm. de altura (2 a 3"). También puede usarse medios de caldo carne simple si se trata de cultivos de clostridios y caldo thioglicolato si se trata de bacterias no esporuladas. Antes de su envío, cultivos en crecimiento activo en medios semisólidos o líquidos en tubos con tapa rosca, serán recubiertos en una altura de $\frac{3}{4}$ a 1 pulgada (2 a 2.5 cm.) con parafina fundida o agar al 5%. Las tapas deben ser apretadas y selladas con cinta adhesiva a prueba de agua.

XI

MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS ANAEROBICAS

El método de preparación de los medios de cultivo es uno de los factores más importantes en el cultivo de los organismos anaerobicos exigentes. Las precauciones siguientes deben ser rigurosamente observadas:

- 1.—Evite el calentamiento excesivo. Los **medios de cultivo** no deben ser esterilizados en el autoclave por más de 15 minutos.
- 2.—Prepare los medios de cultivo a partir de frascos de medios deshidratados recientemente abiertos.
- 3.—Almacene los medios de cultivo en tubos tapa de rosca, en la oscuridad y a temperatura ambiente. Los tubos para reacciones bioquímicas con tapones de algodón deben ser guardados en la refrigeradora para evitar su evaporación.
- 4.—Los medios que contengan sustancias reductoras deben ser descartados después de 14 días de almacenamiento.

MEDIOS PARA UTILIZAR EN PLACAS

1.—Agar sangre

a.—Base.

- (1) Añada 0.5 gramos de extracto de levadura a 100 ml de agar base (infusión corazón, tripticasa soya agar, base para agar sangre, etc.)
- (2) Ajuste el (pH) a 7.3 a 7.5
- (3) Esterilice en autoclave a 121° C por 15 minutos.
- (4) Enfríe a 48° C.

b.—Añada 1 ml de solución estéril de vitamina K-hemina por cada 100 ml de medio (vea página 155).

c.—Agregue 5.0 ml de sangre desfibrinada estéril de conejo o carnero por cada 100 ml de medio. Mezcle bien y vierta en placas.

2.—Amarillo de huevo agar (EYA) medio de Mc Clung y Toabe modificado. (3).

a.—Base.

(1) Tripticasa (BBL)	20 gm
Na ₂ PHO ₄	2.5 gm
NaCl	1.0 gm
MgSO ₄ Solución al 5%	0.1 ml
Glucosa	1.0 gm
Agar	12.5 gm
Agua destilada	500 ml

- (2) Ajuste el pH a 7.3 — 7.4.
- (3) Esterilice en autoclave a 121° C. por 15 minutos.
- (4) Enfrie a 60° C.

b.—Añada una yema de huevo, mezcle, y vierta en placas.

Las cáscaras de los huevos son decontaminadas previamente a la apertura y separación de la yema sumergiéndolos previamente en un beaker con alcohol a 95% por 1 hora.

3.—Fenil etil alcohol agar sangre (1)

Agregue 5 ml de sangre desfibrinada estéril de conejo o carnero a 100 ml de agar base fenil etil alcohol, la cual ha sido esterilizada en autoclave y enfriada a 48° C. en baño de agua.

Mezcle y vierta en placas.

4.—Agar sangre con paronomicina-vancomicina-menadiona (2)

a.—Prepare la base para agar sangre como se describió en 1.a.

b.—Después de esterilizar el medio en autoclave y enfriarlo a la temperatura adecuada, por cada 100 ml de base, añada asepticamente lo siguiente:

- (1) 1 ml de la solución de vitamina K-hemina (vea página 155).
- (2) 10 mg de paronomicina (Parke Davis & Co.)
- (3) 0.75 mg de vancomicina (Eli Lilly & Co.)
- (4) 5 ml de sangre desfibrinada estéril de conejo o carnero.

c.—Mezcle y vierta en placas.

Nota: Ambos antibióticos: Kanamicina (Laboratorios Bristol) y Neomicina (Eli Lilly & Co.) en concentración final de 100 mcg/ml pueden sustituir a la paronomicina.

MEDIOS DIFERENCIALES

1.—Thioglicolato:

Utilice cantidades de 8 ml. en tubos de 15 x 125 mm. con tapa de rosca

2.—Medio base para la fermentación (M. B. F.):

Se usa caldo thioglicolato sin glucosa e indicador. Por cada 1.000 ml. de medio, agregar:

Extracto de levadura	2 gm.
Azul de Bromotímol en solución acuosa al 1%	1 ml.

Reparta en cantidad de 8 ml. en tubos de 15 x 125 mm. con tubos de fermentación incluidos.

3.—Glucosa:

Añada 6 gramos de glucosa a 1.000 ml de M.B.F. antes de repartir y esterilizar. Utilice 8.5 ml. en tubos de 15 x 125 mm. con tubos de fermentación incluidos.

4, 5, 6, 7, 9 y 11; 12.

Manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerol, xilosa, arabinosa;

A 8 ml. de M. B. F. esterilizado en autoclave

agregue asépticamente ⁽²⁾

0 5 ml. de solución al 10% del sustrato esterilizado por filtración en filtro Seitz.

8.—Salicina:

A 8 ml. del M. B. F. esterilizado en autoclave

agregue asépticamente

1 ml. de salicina al 5% esterilizada por filtración en filtro Seitz;

10.—Almidón:

A 8 ml. del M. B. F. esterilizado en autoclave

agregue asépticamente

1 ml. de la solución al 2% de almidón soluble esterilizada por filtración en filtro Seitz.

13.—Indol-Nitrito (BBL)

Reparta 8.0 ml en tubos de 15 x 125 mm.

14.—Indol Nitrito (BBL):

Reparta 8 ml. en tubos de 15 x 125 mm.

15.—Medio Caldo Carne

Carne picada (libre de grasa)	500 gm.
Agua destilada	1000 ml.
1 N NaOH	25 ml.

Utilice carne magra de res o de caballo. Elimine la grasa y el tejido conectivo antes de molerla. Mezcle la carne con agua y la solución de NaHO y calientela hasta la ebullición moviendo la suspensión. Enfríe en la refrigeradora por una noche y quite la nata de grasa remanente. Filtre la mezcla a través de 2 capas de gaza y extienda las partículas de carne para secarlas parcialmente.

Añada suficiente agua para restaurar el volumen original de 1000 ml. agreguele:

Tripticasa o peptona	30 gm.
Extracto de levadura	5 gm.
Fosfato de Potasio	5 gm.

Ajustese el pH a 7.8 con 1 N. NaOH.

Con un cucharón pequeño reparta las partículas de carne en tubos tapa de rosca de 15 x 125 mm. y añada el filtrado enriquecido. Utilice aproximadamente 1 parte de partículas de carne por 3 a 4 partes de líquido (v/v) por tubo. Añada algunas limaduras de hierro a cada tubo los cuales deben estar llenos hasta la mitad (8 ml. de líquido) Esterilice a 121° C. por 15 minutos.

16.—**Caldo carne Glucosa:** Agregue 3 gm. de glucosa por litro de filtrado de caldo carne picada antes de repartirlo.

Caldo carne dextrosa-almidón: Añada 2 gm. de almidón soluble por cada 1000 ml. de filtrado de carne-picada-glucosa antes de repartirla.

Caldo carne almidón: Agregue 2 gm. almidón soluble por cada 1.000 ml. de filtrado de caldo carne antes de repartirlo.

17.—**Leche-hierro:** Coloque unas cuantas limaduras de hierro en el fondo de un tubo de 15 x 125 mm. añada 8 ml. de leche **completa no homogenizada** a cada tubo. Esterilice en autoclave a 121° por 15 minutos.

18.—**Suero de Loeffler:** Rehidrate suero sanguíneo según Loeffler (Difco) según las instrucciones del fabricante. Reparta 8 ml. en tubos tapa de rosca de 15 x 125 mm. Esterilice como lo indique el fabricante.

19.—**Medio para la producción de H₂S:**

Tripticasa (BBL)	1.00 gm.
Extracto de levadura	0.50 gm.
Agar	0.20 gm.
Acetato de plomo	0.02 gm.
Glucosa	0.50 gm.
H ₂ O destilada	1000.00 ml.

Ajuste el pH a 7.2-7.3. Reparta 8 ml. en cada tubo de rosca de 15 x 125 mm. Esterilice a 121° por 15 minutos.

20.—**Thiogel (BBL):** Reparta 9 ml. en tubos de 15 x 125 mm.

21.—**Urea:** Añada suficiente agua destilada a 31 gm. de caldo urea (Difco) para hacer un total de 100 ml. Filtre al través de filtro Seitz. Agregue 1 ml. por cada 8 ml. de base de fermentación esterilizada en autoclave. (2).

12.—**Medio de Movilidad**

Medio movilidad (Difco)	16 gm.
Caldo nutritivo	4 gm.
Na Cl	1 gm.
Agua destilada	1000 ml.

Reparta 8 ml. por tubo de 15 x 125 mm. Esterilice en autoclave a 121° por 15 minutos.

23.—Triple azúcar-hierro-agar en tubos en bisel. (Difco).

24.—Tubos de esculina en bisel

Esculina	1.0	gm.
Citrato de hierro	0.5	gm.
Infusión corazón agar	40.0	gm.
Agua destilada	1000.0	ml.

Ajuste el pH a 7.0 Reparta 5 ml. en tubos de 15 x 125 mm.

Esterilice en autoclave a 121°C. por 15 minutos, enfrielos de manera que formen bisel.

25.—Infusión agar en bisel: Utilice corazón infusión agar (Difco) tripticasa (BBL) más 1.5% de agar, etc. Reparta en tubos de 15 x 125 mm. Esterilice en autoclave y deje enfriarlos de manera que formen bisel.

26.—Agar-infusión-dextrosa en bisel: Añada 1 gm. de dextrosa a 100 ml. de agar infusión, Esterilice en autoclave y deje enfriar en posición inclinada.

27.—Medio para formación de antígenos del *Cl. perfringens*:²⁰

Caldo nutritivo	1.6	gm.
Glucosa	0.2	gm.
Solución al 10% de Cisteína HCL	0.5	ml.
Solución tampón de fosfato*	2.4	ml.
Agua destilada	100.0	ml.

Ajuste el pH a 7.4. Reparta en cantidades de 5 ml. en tubos de 13 x 100 mm. tapa de rosca. Esterilice en autoclave a 121° C por 15 minutos.

*Solución tampón de fosfato: Disuelva 14 gramos de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 1 gm. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 60 ml. de agua destilada.

MEDIOS DE CONSERVACION

1.—Medio de conservación con cerebro:

Añada una pequeña cantidad de agua al cerebro de carnero o bovino y licúelo en una licuadora mecánica.

Prepare una solución de peptona, utilizando 20 gm. de peptona en 100 ml. de agua destilada. Ajuste el pH a 7.2-7.4. Vierta en tubos tapa rosca de 13 x 100 mm. utilizando 1 parte de cerebro más 2 partes de agua peptonada. Los tubos deben llenarse hasta la mitad. Esterilice en autoclave a 121°C. por 15 minutos.

2.—Medio de Gibbons y MacDonald (modificado)²¹.

a: Base.

(1) Triptícasea (BBL)	15.0	gm.
Extracto de levadura	3.0	gm.
Glucosa	5.0	gm.
NaCl	5.0	gm.
K ₂ HPO ₄	2.5	gm.
Thioglicolato de sodio.	0.5	gm.
Hemina (cristalina)	5.0	miligramos
Agar	15.0	gm.
Agua destilada	100.0	ml.

(2) Ajuste el pH a 7.6.

(3) Esterilice en autoclave a 121° C por 15 minutos.

(4) Añada 10 ml. de solución estéril al 10% de NaHCO₃ (esterilizado por filtración).

(5) Agregue 0.1 ml de la solución madre de menadiona (pág. 155).

b.—Vierta asepticamente 11 ml. en cada tubo de 16 x 150 mm. con tapa de rosca, déjelos que coagulen en forma tal que formen un taco largo (aproximadamente 6.5 cm.) y un bisel corto.

3.—Medio de Mantenimiento para Actinomyces: (22) Actinomyces broth BBL).

a.—Parte I:

(1) Solución salina	250.0	ml.
KH ₂ PO ₄	60.00	gm.
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.00	gm.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.80	gm.
CaCl ₂	0.08	gm.

Disuelva en un litro de agua destilada.

(2) Casitona (U.S.P.), Digestión pancreática 4.0 gm.

(3) Cisteína HCL 1.0 gm.

(4) Extracto de levaduras 2.0 gm.

(5) Caldo infusión cerebro-corazón (Difco) 25.0 gm.

Ajuste el pH del medio a pH 6.5 con KOH al 20% y diluya hasta 500 ml. Esterilizar por filtración.

b.—Parte II:

Agua destilada	500.0	ml.
Glucosa	5.0	gm.
Agar	7.0	gm.
Almidón purificado de papas Baker	10.0	gm.
Acido oleico	1000.0	ml.

100 mgm/100 ml. de agua destilada y neutralizada a pH 7.0 con N NaOH

Prepare el medio vertiendo el almidón en 50 ml. de agua fría, luego mézclelos a 450 ml. de agua hirviendo y agréguele los componentes restantes.

Esterilice en autoclave la Parte II y mezcle con la Parte I mientras esté todavía caliente, luego complete hasta 1 litro.

Reparta en tubos estériles y sellelos con la mezcla pirogalol-carbonato de sodio.

Pirogalol-100 gramos/150 ml. de agua destilada

Carbonato de sodio sol. al 10%

Introduzca el tapón de algodón, cubra con un pedazo de algodón absorbente, añada 5 gotas de cada una de las soluciones arriba mencionadas y tape con un tapón de goma.

XII

REACTIVOS

Azul de Bromotimol al 1%:

Disuelva 1 gm. de azul de bromotimol en 20 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N. Añada 80 ml. de agua destilada.

Agua tamponada:

1.—Solución buffer madre:

KH_2PO_4	32 gm.
Agua destilada	500 ml.

Ajuste el pH a 7.2 (usualmente se requiere aproximadamente 175 ml. de hidróxido de sodio normal). Agregue agua destilada hasta completar 1 litro.

2.—Solución buffer de trabajo

Solución madre buffer de fosfato	1.25 ml.
Agua destilada	C.S.P. 1000 ml.

Reparta cantidades de 450 ml. en frascos de medicina de 32 Oz. o en cantidades de 9 ml. en tubos tapas de rosca de 16 x 150 mm.

Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Carbol fuscina al 1%:

Disuelva 1 gramo de fuscina básica en 10 ml. de alcohol a 95%. Agregue 5 ml. de fenol y 85 ml. de agua destilada. Diluya 1:2 con alcohol 95% antes de usarla.

Ehrlich (Reactivo para el Indol). (23).

Disuelva 4 gm. de para-dimetil-amino-benzaldehido en 380 ml. de alcohol etílico al 95% y añada 80 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

Gelatina: (diluyente)

Gelatina	2 gm.
Na ₂ HPO ₄	4 gm.
H ₂ O destilada	1000 gm.

Ajuste el pH a 6.2 con HCL.

Reparta en frascos tapa rosca y esterilicelos en autoclave a 121° C. por 15 minutos.

Metileno Azul de (Indicador): (Smith, modificador) (24).

Na H CO ₃	40 gm.
Glucosa	100 gm.
Azul de metileno	Trazas

Nitratos, Solución A: (23).

Disuelva 5 gm. de ácido sulfanílico en 1000 ml. de 5 N ácido acético.

Nitratos, Solución B: (23).

Disuelva 5 gm. de dimetil-alfa-naftilamina en 1000 ml. de 5 N ácido acético.

Fenol, Rojo de: 1%

Disuelva 1 gm. de rojo de fenol en 30 ml. de 0.1 N. Na OH. Añada 70 ml. de agua destilada.

Tripsina, Solución al 1%

Disuelva 1 gm. de tripsina 1:250 (Difco) en 100 ml. de agua destilada.

Guárdela en la refrigeradora. Prepare soluciones frescas cada semana.

Vaspar:

Fundir conjuntamente partes iguales (peso/peso) de vaselina y parafina. Mezcle, vierta la mezcla en frascos de Erlenmeyer tapa de rosca y esterilice en autoclave a 121° C por 30 minutos.

Vitamina K-hemina, Solución de:

1. Solución madre de hemina:

Disuelva 50 mgm. de hemina en 1 ml. de solución N de Na OH. Añada 100 ml. de agua destilada.

Esterilice en autoclave a 121° C. por 15 minutos.

2. Menadiona (Solución madre de) 100 mgm.

alcohol etílico 95% 20 ml. Esterilizar por filtración.

3. Solución de trabajo de Vitamina K-hemina:

Añada 1 ml. solución de estéril de menadiona a 100 ml. de solución estéril de hemina.

4. Para usarla añada 1 ml. de la solución vitamina K-hemina por cada 100 ml. de medio estéril o 0.08 ml. por cada tubo con 8 ml. de medio.

X I I I

PROCEDIMIENTOS DE COLORACION

L.—Coloración de Gram.

- 1.—Fije los frotos pasándolos sobre la llama de manera que reciban un calor suave.
- 2.—Cubra la lámina durante 1 minuto con una mezcla de partes iguales de solución cristal violeta según Hucker y solución bicarbonato de sodio al 1%. Lave brevemente con agua corriente (no más de 5 segundos).
- 3.—Cubre las láminas con solución de Ioduro de Gram por 1 minuto y lávela luego con agua corriente.
- 4.—Cubra las preparaciones con alcohol a 95% y bote rápidamente. Recubra las preparaciones con alcohol a 95% por 10 segundos y lave con agua corriente.
- 5.—Cubra las láminas con solución de safranina según Hucker por un minuto (1) y lave la preparación con agua corriente.

Coloración de esporas: (23).

A: Schaeffer-Fulton (1933), modificación al de Wirtz (1908).

Procedimiento de Coloración:

- 1.—Haga los frotos y fijelos por el calor.
- 2.—Cubra las preparaciones con solución acuosa de verde malaquita al 5% por 30-60 segundos.
- 3.—Caliente la lámina hasta emisión de vapores por 3 a 4 veces.
- 4.—Elimine el exceso de colorante con lavado en agua corriente.
- 5.—Tiña 30 segundos con solución acuosa de safranina O al 0.5%
- 6.—Lave el frote con agua corriente.
- 7.—Seque. Examine.

Resultado: Esporas: Verde

Restos de las células: Rojos.

Nota: A veces se experimenta algunos inconvenientes debido al desvanecimiento de la coloración verde después de algunos días. Aparente-

mente esto es debido a una reacción alcalina y puede ser evitada por una limpieza previa de las láminas con una solución ácida antes de hacer las preparaciones. (La alcalinidad de las láminas portaobjetos puede ser debido a una capa invisible de jabón o sustancias detergentes).

B.—Método en "frio" de Bartholomew y Mittmer.

Tiempos de la Coloración

- 1.—Fije por el calor los frotos secados al aire, pasándolos 20 veces por la llama.
- 2.—Tifia por 10 minutos con solución acuosa saturada de verde malaquita aproximadamente 7.6% sin calentar.
- 3.—Lave en agua de chorro por 10 segundos.
- 4.—Coloree por 15 segundos con solución acuosa de safranina al 0.25%.
- 5.—Lave en agua corriente y seque con papel secante.

Resultado: Esporas: Verde Resto de las células: Rojo.

X I V

MÉTODOS PARA OBTENER ANAEROBIOSIS UTILIZACIÓN DE LAS JARRAS PARA CULTIVOS ANAEROBICOS

Las jarras para cultivos anaerobicos aunque de aspectos diferentes tienen funciones similares. El material por incubar se coloca en la jarra y se establece un sello a prueba de aire entre el cuerpo de la jarra y su tapa. El aire es parcialmente extraído y reemplazado por una mezcla gaseosa libre de oxígeno. El oxígeno residual es reducido por el hidrógeno de la mezcla gaseosa reemplazante. El catalizador de paladio ubicado en la tapa de la jarra acelera el proceso de reducción del oxígeno.

La jarra anaeróbica de Brewer y de Torbal difieren algo en el método de sellado y en el catalizador utilizado. Para realizar un sello a prueba de aire en la jarra de Torbal se utiliza un anillo de goma (O-Ring) entre el fondo de la jarra y su tapa. En la jarra de Brewer, se utiliza plasticina en el sellado a prueba de aire y el catalizador es colocado encima de una pantalla metálica en la tapa de la jarra y es calentado por corriente eléctrica. Un catalizador que no necesita ser calentado, pues actúa a temperatura ambiente, es utilizado en la jarra de Torbal y en el (O-Ring seal) Gaspak.

El azul de metileno es utilizado para indicar que las condiciones anaerobicas han sido logradas. En presencia de oxígeno el azul de metileno es azul, en su ausencia es incoloro. Si se utilizan temperaturas inferiores a 35° C. reduzca la solución indicadora previamente a su introducción en la jarra colocándola en agua hirviendo durante algún tiempo.

La mezcla de gases contiene 10% de hidrógeno, 10% de bióxido de carbono y 80% de nitrógeno (Matheson Co., East Rutherford, N. J.). Una

bombona llena de gas tiene una presión de 1.500 libras (aproximadamente). Estas bombonas de gas deben ser fijadas con seguridad a un pilar o a la pared por medio de un soporte adecuado.

Para facilitar la operación, la fuente de vacío, bombona, manómetro y jarra anaeróbica, son conectadas con conexiones en T y tubos de goma como se ilustra en la figura N° 2.

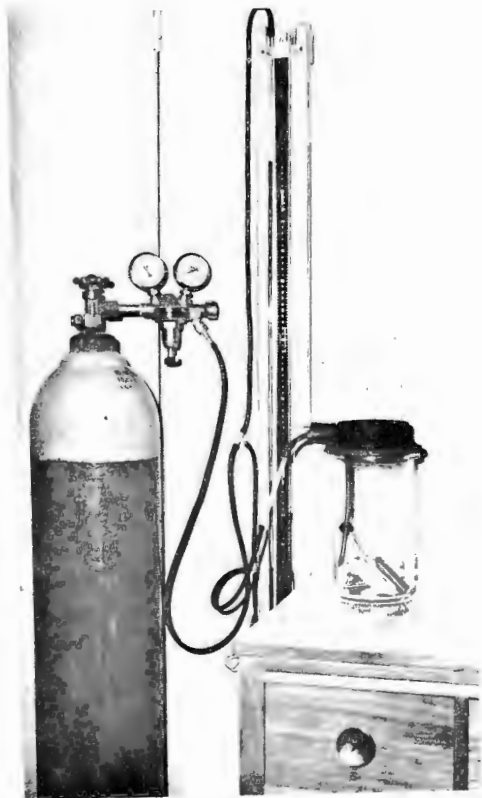
Todas estas conexiones deben ser realizadas a prueba de escapes con grasa de vacío.

Si no se tiene a mano un manómetro, se puede incorporar un balón al sistema para revelar que las presiones estén niveladas.

El burbujeo del líquido del indicador puede ser utilizado como guía de un adecuado vacío.

USO DE LA JARRA DE BREWER

- 1.—Coloque el material a incubar en el interior de la jarra.
- 2.—En un tubo de 15 x 125 mm., coloque la mezcla de azul de metileno-Na H CO₃-glucosa en cantidad que alcance una altura de aproximadamente 1.3 cm. (0.5 pulgadas). Agregue agua hasta la mitad y mezcle. Coloque el tubo en la jarra.
- 3.—Prepare un cordón de plasticina de diámetro uniforme y colóquelo encima del borde de la jarra y una los extremos cuidadosamente haciéndoles presión.
- 4.—Coloque la tapa de la jarra sobre el cordón de plasticina y presione hacia abajo.
- 5.—Conecte el terminal de la tapa de la jarra al sistema vacío-manómetro en la forma indicada en la figura N° 2.
- 6.—Haga el vacío equivalente a 30 cm. de mercurio. Coloque una pinza de Kocher o similar en el tubo que comunica con la fuente de vacío y cierre el vacío.
- 7.—Lentamente llene la jarra con el gas de reemplazo.
- 8.—Quite la pinza del tubo que comunica con la fuente de vacío.
- 9.—Repita las operaciones 6, 7 y 8.
- 10.—Repita las operaciones 6 y 7.
- 11.—Fije la pinza y aprieta en la salida de la tapa de la jarra.
- 12.—Desconecte la jarra del sistema vacío-gas-manómetro.
- 13.—Quite la pinza a la fuente de vacío.
- 14.—Conecte la tapa al terminal eléctrico y calientela por 10 minutos.
- 15.—Desconéctela de la corriente y coloque la jarra en la estufa.



Sistema de Vacío y reemplazo gaseoso

A la izquierda: Bombona con mezcla gaseosa compuesta de 10% de Hidrógeno, 10% de CO_2 y 80% de Nitrógeno. Aparecen los manómetros indicadores de presión y medidor de salida de gases.

En el centro manómetro para indicar el vacío en la jarra. El nivel de mercurio en la gráfica indica 30 cms. de presión negativa.

A la derecha, jarra de Brewer.

USO DE GASPAC EN LA JARRA DE BREWER

- 1.—Apague todas las llamas antes de trabajar con la jarra. Conecte el balón que acompaña al equipo de Gas-pack al extremo de salida de la tapa de la jarra de Brewer.
- 2.—Conecte la tapa a la corriente y caliente el catalizador por 10 minutos antes de colocar la tapa a la jarra.
- 3.—Coloque el material a incubar dentro de la jarra.
- 4.—Coloque el tubo indicador de azul de metileno en la jarra.
- 5.—Aplique una delgada capa de mezcla selladora (Fisher Cello Seal 14-636 puede ser utilizada) a la boca de la jarra y a la tapa de la jarra de Brewer.
- 6.—Corte una esquina del paquete de Gas-pack y coloque el paquete verticalmente en la jarra.
- 7.—Con una pipeta, vierta dentro del Gas-pack por la esquina cortada 10 ml. de agua destilada o de chorro y presione la tapa de Brewer sobre la boca.
- 8.—Deje que la reacción se produzca por 35 minutos.
- 9.—Cierre con una pinza el tubo de salida de la tapa; desconecte la electricidad y el balón de la tapa. Coloque la jarra en la estufa.

El procedimiento con la nueva jarra anaeróbica Gas-pack⁽²⁵⁾ es esencialmente el mismo, sin embargo, la jarra se suministra con un catalizador que actúa a la temperatura ambiente, en una jarra que se sella con un anillo especial de goma (O-Ring-Seal), no tiene conexiones eléctricas y tampoco salida para escape de la presión. Se añaden 10 ml. de agua al paquete de Gas-pack, la tapa es fijada con la abrazadera **atornillada solamente a mano** y luego colóquela en la estufa. La abrazadera está manufacturada de manera de dejar escapar cualquier exceso de presión.

X V

REFERENCIAS CITADAS

- 1.—Dowell, V. R. Jr. Hill, E. O. and W. A. Altemeier, 1964. Use of phenethyl alcohol in media for insolation of anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 88:1811-1813.
- 2.—Finogold, S. M. Miller, A. B. and D. J. Posnick. 1965. Further studies on selective media for Bacteroides and other anaerobes. *Ernährungsforschung* 10:517-528.
- 3.—McClung, L. S. And R. Toabe, 1947. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium sporogenes* and certain species of the gangrene and botulinum groups. *J. Bacteriol.* 53:139-147.
- 4.—Smith, L. DS. 1955. *Introduction to the pathogenic anaerobes.* U. Chicago Press, (Out of print).

- 5.—Smith, L. D.S. and L. V. Holdeman, 1968 (to be published). Pathogenic anaerobes. Charles C. Thomas, Springfield. III.
- 6.—Lewis, K. H. and K. Casel, Jr. (ed.) 1964. Botulism. Proceeding of a symposium. Public Health Service Pub. 999-FP-1-Cincinnati.
- 7.—Sterne, M. and G. H. Warrack, 1964. The types of *Clostridium perfringens*, J. Path. Bacteriol, 88:279-283.
- 8.—Prévot, A. R. and V. Fredette, 1966. Manual for the Classification and Determination of the Anaerobic Bacteria. 1st. American ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- 9.—Eiken, M. 1958. Studies on an anaerobic, rod-shaped, gram-negative microorganism: *Bacteroides corrodens* n. sp. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 43:404-416.
- 10.—Pinc, L. and Georg 1965. The classification and phylogenetic relationships of the *Actinomycetales*. Int. Bull. Bact. Nom. Tax. 15:143-163.
- 11.—Werner, H. 1966. The gram positive nonsporing anaerobic bacteria of the human intestine with particular reference to the *Corynebacteria* and *Bifidobacteria*. J. Appl. Bacteriol. 29:133-146.
- 12.—Beerens, H. M. Tahon-Castel, 1965. Infections humaines a bacteries anaerobies non toxigenes. Press Acad. Europ., Bruxelles.
- 13.—Moss, C. W. Dowell, V. R., Jr., Lewis, V. W. and M. A. Schekter, 1967. Cultural characteristics and fatty acid composition of *Corynebacterium acnes* J. Bacteriol, 94:1300-1305.
- 14.—Holdeman, L. V., Cato E. P. and W. E. C. Moore, 1967. Amended description of *Bambacterium alactolyticum* Prévot and Taffanel with proposal of a neotype strain. Int. Bull. Bact. Nom. Tax. 17:323-341.
- 15.—Koenig, M. G., Spickard, A. Cardella, M. A. and D. E. Rogers, 1964. Clinical and laboratory observation of type E Botulism in man. Medicine 43:517-545.
- 16.—Duff, J. T. Wright, G. G. and A. Yarinsky, 1956. Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. J. Bacteriol 72:455-460.
- 17.—Eklund M. W., Weiler, D. I. and F. T. Poysky. 1967. Outgrowth and toxin production of nonproteolytic type B *Clostridium botulinum* at 3.3 to 5.6-C. J. Bacteriol. 93:1461-1462
- 18.—Angelotti, R., Hall, H. E., Foter, M. J. and K. H. Lewis. 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in food. Appl. Microbiol. 10:183-199.
- 19.—Hobbs, B. C. 1965. *Clostridium welchii* as a food poisoning organism J. Appl. Bacteriol. 28:74-82.
- 20.—Klotz, A. W. 1965. Application of FA techniques to detection of *Clostridium perfringens*. Public. Health Reports. 80:305-311.
- 21.—Gibbons, R. J. and J. B. MacDonald. 1960. Hemin and vitamin K compounds as required factors for cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*, J. Bacteriol 80:164-170.
- 22.—Georg, L. K., Robertad, G. W. and S. A. Brinkman, 1964. Identification of species of *Actinomyces*. J. Bacteriol. 88:477-490.
- 23.—Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of Microbiological Methods. McGraw-Hill.
- 24.—Bailey, W. R. and E. G. Scott. 1962. Diagnostic microbiology. C. V. Mosby, Co., St. Louis.
- 25.—Brewer, J. H. and D. L. Allgeir, 1966. Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system. Appl. Microbiol. 14:985-988.

XVI

B I B L I O G R A F I A

GENERAL

- Breed, R. S., Murray, E. G. D. and N. R. Smith, 1957, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th Ed. Williams & Wilkins, Co., Baltimore.
- Prevot, A. R. 1960. *Tecnicas pour le diagnostic des bacteries anaerobies*. Toureile St. Mande (Seine).
- Willis, A. T. 1964. *Anaerobic bacteriology in clinical medicine*, 2nd ed. Butterworth Co., London.

METODOS ANAEROBICOS

- Dowell, V. R., Jr., Hill, E. O. and W. A. Altemeier 1962. Methods for the isolation and identification of non-sporulating anaerobic bacteria from clinical specimens. *Bacteriol. Proc.* P. 80.
- Fredette, V. 1964. The role of the anaerobic bacteria with particular reference to the virulence of *Clostridium perfringens*. *Rev. Canad. Biol.* 23:85-93.
- Hall, I. C. 1929. A review of the development and application of physical and chemical principles in the cultivation of obligately anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 17:25-301.
- Moore, W. E. C. 1966. *Tecnicas for routine culture of anaerobes Intern.* *J. Syst. Bacteriol.* 16:173-190.
- Holdeman, L. V. 1964 Isolation and identification of anaerobic bacteria from clinical material. *Public Health Lab.* 23:154-168.
- Hungate, R. E. 1960. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1-49. (See pp. 1-7.)
- Reed, G. B. and J. H. Orr, 1943. Cultivation of anaerobes and oxidation reduction potentials, *J. Bacteriol.* 45:309-320.

BOTULISMO

- Dolman, C. E. 1937. Recent observation on type E botulism. *Canad. J. Public Health*, 48:187-198.
- Dolman, C. E. and L. Murakami. 1961. *Clostridium botulinum* type F with recent observations on other types, *J. Infect. Dis.* 109:107-128.
- Poster, E. M. and H. Sugiyama, 1966. Latest developments in research on botulism, *J. Milk Food Technol* 29:342-347.
- Lamanna, C. 1959. The most poisonous poison. What do we know about the toxin of botulism? What are the problem to be solved? *Science* 130:763-772.
- Meyer, K. F. 1956. The status of botulism as a world health problem. *Bull. World Health Organ.* 15:281-298.
- Ward, B. Q., Carroll, B. J. Carret, E. S. and G. B. Reese, 1967. Survey of the U. S. Gulf Coast for the presence of *Clostridium botulinum*. *Appl. Microbiol.* 15:629-636.

CLASIFICACION DE LOS CLOSTRIDIOS

- Batty, I and P. D. Walker, 1965. Colonial morphology and fluorescent labelled antibody staining in the identification of species of the genus *Clostridium* *J. Appl. Bacteriol.* 28:112-118.

- Moore, W. E. C., Cato, E. P. and L. V. Holdeman, 1966. Fermentation patterns of some *Clostridium* species. Intern. J. Syst. Bacteriol. 16:383-415.
- Oakley, C. L. 1963. Classification of the genus *Clostridium* World Symp. Diseases Caused By Anaerobes. Office Internat. Epizootics, Paris.
- Oakley, C. L. and G. H. Warrack, 1953. Routine typing of *Clostridium welchii*. J. Hyg. 51:102-107.
- Sanada, I. and S. Nishida, 1965. Isolation of *Clostridium tetani* from soil. J. Bacteriol. 89:626-629.
- Smith, L. D.S. and E. King 1962. *Clostridium innocuum*. sp. n. A spore-forming anaerobe isolated from human infections. J. Bacteriol. 83:938.
- Clostridium Perfringens e Intoxicaciones Alimentarias Ocasionadas por C. perfringens.***
- Altemeier, W. A. 1944. The rapid identification of the *Clostridium welchii* in accidental wounds. Surg. Gynecol. and Obstet. 78:1-4.
- Brooks, M. E. Sterne, M. and G. H. Warrack, 1957. A reassessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. J. Pathol, and Bacteriol. 74:185-195.
- Collee, J. G. Knowlden, J. A. and B. C. Hobbs. 1961. Studies on the growth, sporulation and carriage of *Clostridium welchii*, with special reference to food-poisoning strains, J. Appl. Bacteriol. 24:326-339.
- Dack, G. M., Sugiyama, H., Owens, F. J. and J. B. Kirsner. 1954. Failure to produce illness in human volunteers fed *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*, J. Infect. Diseases 94:34-38.
- Ellner, P. D. 1956. A medium promoting rapid quantitative sporulation in *Clostridium perfringens*, J. Bacteriol. 71:495-496.
- Galton, M. M. and J. H. Steele, 1961. Laboratory and epidemiological aspects of foodborne diseases, J. Milk Food Technol. 29:104-114.
- Gibbs, B. M. and B. Freame, 1965. Methods for the recovery of clostridia from foods, J. Appl. Bacteriol. 28:95-111.
- Hall, H. E., and R. Angelotti. 1965. *Clostridium perfringens* in meat and meat products. Appl. Microbiol. 13:352-367.
- Hall, H. E. Angelotti, R., Lewis, K. H., and M. J. Foter, 1963. Characteristics of *Clostridium perfringens* strains associated with food and foodborne disease. J. Bacteriol. 85:1094-1103.
- Hall, H. E. and G. H. Hauser, 1966. The examination of feces from food handlers for *Salmonellae*, *Shigellae*, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 14:928-933.
- Kemp, G. E., Procter, R. and A. S. Browne. 1962. Foodborne disease in California with special reference to *Clostridium perfringens (welchii)* Public Health Rept. 77:910-919.
- Knox, R. and E. C. MacDonald. 1895. Outbreaks of food poisoning in certain Leicester Institutions, Medical Officer 69:21-22.
- Lowbury, E. J. L. and H. A. Lilly, 1955. A selective plate medium for *C. welchii*. J. Pathol. Bacteriol. 70:105-109.
- Marshall, R. S. Steenbergen, J. F. and L. S. McClung, 1965. Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 13:559-563.

- McClung, L. S. 1945. Human food poisoning due to growth, of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in freshly cooked chickens: Preliminary note. *J. Bacteriol.* 50:229-231.
- McNicol, M. and E. J. McKillop. 1958. Food poisoning caused by *Clostridium welchii* in cold chicken. *Lancet.* 1:787-789.
- Mossel, D. A. A., Koopman, M. J. and E. Jongerins. 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.* 15:650-653.
- Mossel, D. A. A., De Bruin, A. S. Van Diepen. H. M. J., Vendrig, C. M. A., and G. Zoute-welle, 1956. The enumeration of anaerobic bacteria, and of *Clostridium* species in particular, in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 19:142-154.
- Mossel, D. A. A., 1959. Enumeration of sulfite-reducing *Clostridia* occurring in foods *J. Sci. Food Agr.* 19:662-669.
- Nygren, B. 1962 Phospholipase C-producing Bacteria and food poisoning. *Acta Path, Microbiol. Scand* 56: Suppl. 160.
- Southworth, J. M. L. and D. H. Strong, 1964. Comparison of media for the isolation of *Clostridium perfringens* from food, *J. Milk Food Technol* 27:205-209.
- Strong, D. H. Canada, J. C. and B. B. Griffiths. 1963. Incidence of *Clostridium perfringens* in american foods, *Appl. Microbiol.* 11:42-44.
- Wetzler, T. F. Marshall, J. D., Jr. and M. A. Cardella. 1956. Rapid isolation of *Clostridium*s by selective inhibition of aerobic flora. II, A. systematic method as applied to surveys of *Clostridium* in Korea, *Am. J. Clin. Pathol.* 28:345-351.
- Willis, A. T. 1957, A rapid method for the purification of some clostridia from mixtures with other organisms, especially the aerobic sporeformers. *J. Pathol. Bacteriol.* 74:113-117.
- Yamagishi, T., S. Ishida and S. Nishida 1964. Isolation of toxigenic strain of *Clostridium perfringens* from soil *J. Bacteriol.* 88:646-652.

ANTICUERPOS FLUORESCENTES

- Boothroyd, M. and D. L. Georgala. 1964 Immunofluorescent identification of *Clostridium botulinum*. *Nature* 202:515-516.
- McCain, C. S. 1967. Isolation and identification of *Clostridium hemolyticum* in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 28:878-880.
- Midura, T. F. Inouye, Y. and H. L. Bodily. 1967. Use of immunofluorescent to identify *Clostridium botulinum* types A, B, and E, and E. *Public Health Rept.* 82:275-279.
- Walker, P. D. and I. Batty. 1964. Fluorescent studies in the genus *Clostridium*, I. The location of antigens on the surface of *Clostridium sporogenes* during sporulation and germination *J. Appl. Bacteriol.* 27:137-139.
- Walker, P. D. and I. Batty, 1964. Fluorescent studies in the genus *Clostridium*, II A. rapid method for differentiating *Clostridium botulinum* types A, B and F, types C and D, and type E. *J. Appl. Bacteriol.* 27:140-142.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

- Bornstein, D. L., Weinberg, A. N. Swartz, M. N. and L. J. Kunz. 1964. Anaerobic infections-review of current experience. *Medicine.* 43:207-232.

- Egerton, J. R. and P. D. Walker, 1964. The isolation of *Clostridium perfringens* type C. from necrotic enteritis of man in Papua-New Guinea. *J. Pathol. Bacteriol.* 88:275-278.
- Heath, C. W. Zusman, J. and I. L. Sherman, 1964. Tetanus in the United States, 1950-1960. *Am. J. Public Health.* 54:769-779.
- MacLennan, J. D. 1962. The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriol. Rev.* 26:177-276.
- Potvin, A. and J. E. Morin. 1957. Thirty-five cases of human anaerobic infections. *Canad. J. Public Health* 48:317-322.
- Sterne, M. and A., Thomason, 1963 The isolation and identification of Clostridia from pathological conditions of animals, *World, Symp, on Diseases caused by Anaerobes. Office Internat. Epizootics, Paris* See particularly pp. 9-11.
- Stokes, E. J. 1958. Anaerobes in routine diagnostic cultures. *Lancet* 1:668-670.
- Zissler, J. Rossfeld, Steinberg L. Oakley, C. L., Dieckman, C. and E. Hain, 1949. Enteritis necroticans due to *Clostridium welchii* type F. *Brit. Med. J.* 1:267-271.
- ANAEROBIOS NO ESPORULADOS.**
- De Vries, W. and A. H. Stouthamer. 1967 Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria *J. Bacteriol.* 93:574-576.
- Hoogendijk, J. L. 1965. Resistance of some strains of *Bacterioides* to ampicillin, methicillin, and cloxacillin. *Antonie van Leeuwenhoek* 31:383-385.
- Leesche, W. J., Socransky, S. S. and R. J. Gibbons. 1964. *Bacteroides oralis*, proposed new species isolated from the oral cavity of man. *J. Bacteriol.* 88:1329-1337.
- Miller, L. G. and S. M. Finegold. 1967. Antibacterial sensitivity of *Bifidobacterium (Lactobacillus bifidus)*. *J. Bacteriol* 93:125-130.
- Rogosa, M. 1965. The genus *Veillonella*. IV. Serological groupings and genus and species emendations, *J. Bacteriol.* 90:704-709
- Sebal, M. Gasser, F. and H. Werner. 1965. Teneur GC% et classification. Application au groupe des bifidobacteries et a quelques genres voisins. *Ann. Inst. Pasteur* 109:251-269:
- Socransky, S. S. and R. J. Gibbons, 1965. Required role of *Bacteroides melaninogenicus* in mixed anaerobic infections, *J. Infect. Diseases* 115:247-253.
- Suzuki, S., Ushijima, T. and H. Ichinose. 1966. Differentiation of *Bacteroides* from *Sphaerophorus* and *Fusobacterium*, Japan, *J. Microbiol.* 10:193-200.
- Tynes, B. S. and W. B. Fronmeyer, Jr. 1962. *Bacteroides* septicemia. Cultural, clinical, and therapeutic features in a series of twenty-five patients. *Ann Int. Med.* 56:12-23.
- Van Haute, J. 1966. Studies on the cultivable flora of normal human feces, *Antonie van Leeuwenhoek.* 32:212-222.