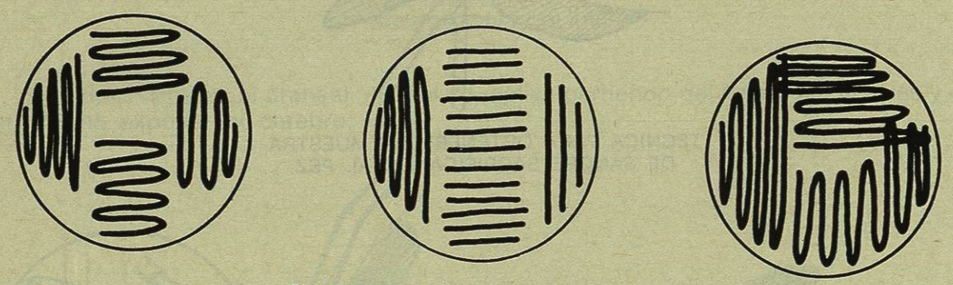
Métodos bacteriológicos

Los métodos bacteriológicos que se usan generalmente son los mismos que se emplean para medicina veterinaria.

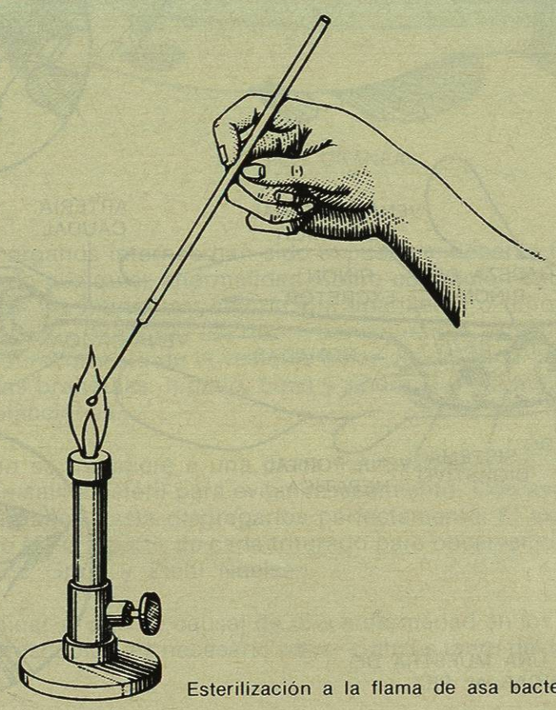
Se hace uso del microscopio compuesto y en ocasiones con equipo de contraste de fase. Es imprescindible una incubadora que proporcione la temperatura óptima para el crecimiento de los microorganismos en los diferentes medios de cultivo.

En una autoclave se esterilizan tanto los medios de cultivo, como el instrumental necesario para el manejo de las muestras. Asimismo, se requiere material de vidrio, placas de Petri y asas bacteriológicas.

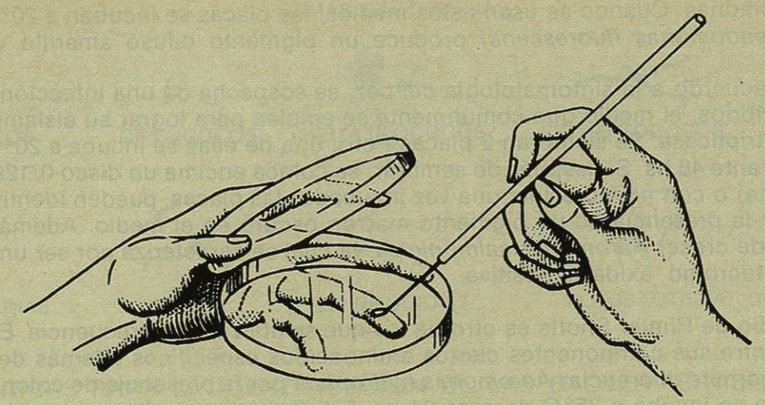
Para el aislamiento de Gram negativos, se siembra por duplicado en placas con agar cytophaga (medio de aislamiento de flexibacterias) y en agar soya tripticasa (medio de utilidad secundaria). Una serie se incuba a 35°C y la otra a 23°C durante 48 hs.



Siembra para aislamiento de colonias

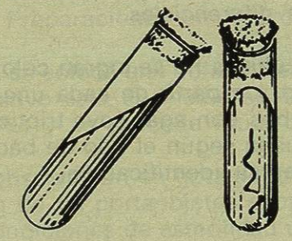


Esterilización a la flama de asa bacteriológica.



Siembra de estrías en placa Petri para aislamiento de colonias

Las colonias aisladas se resiembran en tubos con agar soya tripticasa inclinado, se incuban a 35°C durante 24 hs y se realiza la prueba de la oxidasa, para clasificarlos como citocromo oxidasa positiva o negativa.



CULTIVO PURO

Los microorganismos citocromo oxidasa positiva generalmente están clasificados dentro de las familias Pseudomonadaceae y Vibrionaceae y para lograr su identificación deberán hacerse las pruebas bioquímicas correspondientes.

Los patógenos Gram negativos, citocromo oxidasa negativa, generalmente corresponden a la enterobacteria *Edwardsiella tarda,* la cual también deberá ser identificada mediante pruebas bioquímicas.

Para reducir al mínimo los contaminantes e identificar con mayor rapidez las bacterias patógenas de los peces, se recomienda hacer subcultivos en medios selectivos y diferenciales. En ocasiones estos medios también se utilizan para hacer siembras directamente de las lesiones o a partir de medios líquidos. El agar cetrimida y el agar pseudosel, son medios específicos inhibidores que contienen una sal cuaternaria de amonio (cetrimida) que inhibe el crecimiento de gran número de bacterias, pero no lo hace con

las pseudomonas. Cuando se usan estos medios, las placas se incuban a 20° C durante 48 hs *(Pseudomonas fluorescens)* produce un pigmento difuso amarillo verdoso).

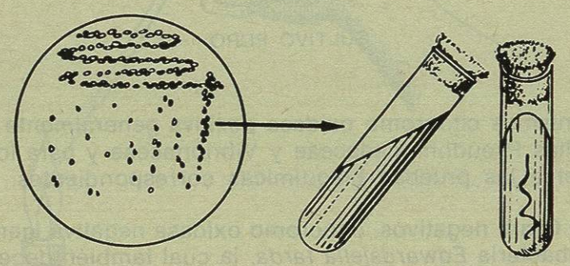
Si de acuerdo a la sintomatología del pez, se sospecha de una infección por aeromonas o vibrios, el medio que comúnmente se emplea para lograr su aislamiento es el agar soya tripticasa. Se siembran 2 placas Petri; una de ellas se incuba a 20° C y la otra a 25° C durante 48 hs. Si después de sembrar, se coloca encima un disco 0/129 (Vibriostat-pteridina) o con novobiocina; una vez incubadas las placas, pueden identificarse los vibrios por la presencia de un pigmento marrón oscuro en el medio. Además, en este medio puede crecer *Aeromonas salmonicida,* la cual se caracteriza por ser una bacteria inmóvil, citocromo oxidasa positiva.

El medio de Rimler Shotts es otro de los que se utilizan con frecuencia. Este medio presenta entre sus componentes ciertos aminoácidos específicos además de novobiocina, que permite diferenciar *Aeromonas hydrophila* por la presencia de colonias amarillas cuando se incuba a 35° C durante 24 hs. Esta bacteria es citocromo oxidasa positiva, pero cuando se trata del mismo tipo de colonias y la prueba de oxidasa es negativa, es probable que la bacteria sea *Citrobacter freundii.*

Otros medios de cultivo que se utilizan en el estudio de enfermedades bacterianas de peces son: agua peptonada, caldo nutritivo, agar sangre, agar fucsina sacarosa, medio de Jensen, medio de Amlacker y agar Mac Conkey. Cada uno de ellos se emplea de acuerdo al tipo de microorganismos que se sospecha como agente causal.

También es recomendable sembrar inicialmente en medios líquidos, tales como agua peptonada, caldo nutritivo o caldo soya tripticasa y posterior a la incubación hacer subcultivos en los medios diferenciales.

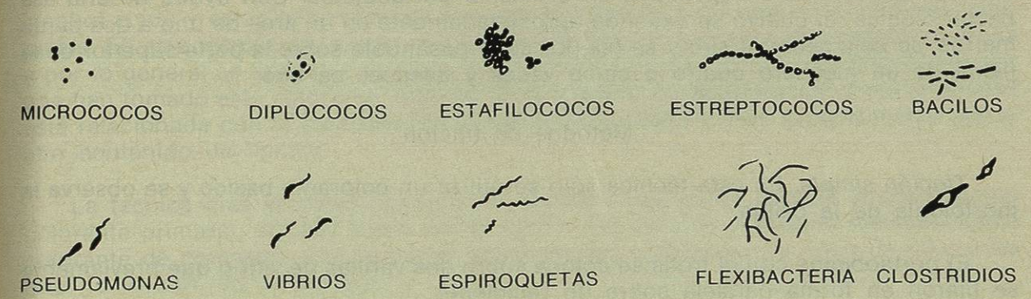
Asimismo, cuando en los cultivos no se logran colonias aisladas, deberán hacerse nuevas siembras hasta lograrlo y a partir de cada una de las que morfológicamente sean diferentes, sembrar en tubos con agar soya tripticasa o agar nutritivo inclinado, incubar a la temperatura adecuada según el tipo de bacteria y conservar en refrigeración para posteriormente hacer su identificación.



OBTENCION DE UN CULTIVO PURO

Cuando las bacterias aisladas son Gram positivas, pudiera tratarse de estreptococos o bien una especie de *Mycobacterium* si es ácido alcohol resistente. Para lograr su identificación será necesario realizar un aislamiento y posteriormente las pruebas bioquímicas necesarias.

FORMAS BACTERIANAS



TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS AISLADAS

A) OBSERVACION MICROSCOPICA

Para la identificación de las bacterias es importante conocer su estructura y su relación con los colorantes. Esto se hace examinando el crecimiento de los diferentes medios de cultivo.

Si se desea observar la motilidad o desplazamiento de los microorganismos se deberán hacer observaciones en fresco entre porta y cubreobjetos o en gota pendiente. Para conocer la morfología y afinidad hacia los colorantes se utilizarán preparaciones teñidas.

Preparaciones en fresco

1) Si el cultivo es líquido, se coloca una gota entre porta y cubreobjetos observándose al microscopio. Si el cultivo está en medio sólido, se hace una suspensión en solución salina (NaCl al 0.65%) y se procede igual que para cultivos líquidos.

2) Si se desea hacer la observación en gota pendiente se pone un poco de vaselina alrededor de la depresión de un portaobjetos excavado, y con ayuda de una asa bacteriológica se coloca en condiciones de esterilidad una gota de cultivo en el centro de un cubreobjetos.

El portaobjetos excavado se coloca sobre el cubreobjetos tratando que la excavación quede al centro de la gota de cultivo; se hace presión por los bordes para que la vaselina selle a ambos y se invierte de manera que el cubreobjetos quede hacia arriba y la gota de cultivo suspendida. Para que ésta no se desprenda es recomendable trabajar con gotas pequeñas.

Preparaciones teñidas

La tinción hace posible determinar las propiedades citoquímicas de los microorganismos frente a ciertos colorantes, así como la presencia de estructuras celulares.

La preparación de frotis se hace sobre un portaobjetos limpios y libre de grasa, para lo cual se sumergen durante unos minutos en una solución de alcohol o éter.

Sobre el portaobjetos, limpio y seco, se deposita una gota de cultivo; si éste procede de un medio sólido, una pequeña cantidad del cultivo se mezcla con una gota de

solución salina estéril depositada en el mismo portaobjetos. Con ayuda de una asa bacteriológica, el cultivo se extiende aproximadamente en un área de uno a dos centímetros, se deja secar al aire y se fija por calor pasándolo sobre la parte superior de la flama de un mechero cuatro o cinco veces y después se tiñe.

Métodos de tinción

Tinción simple. En esta técnica sólo se utiliza un colorante básico y se observa la morfología de la célula.

El portaobjetos con el frotis se coloca sobre dos varillas de vidrio que previamente se fijaron en forma paralela sobre un recipiente.

Con ayuda de un gotero se cubre el frotis con cualquiera de los siguientes colorantes: cristal violeta, azul de metileno de Loeffler, solución acuosa o alcohólica de azul de metileno; se mantiene el colorante por 30 segundos, se lava con agua y se seca la preparación entre papel filtro presionando suavemente (procurando no despegar la película).

La preparación se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

Tinciones diferenciales. La coloración está basada en las diferencias físicas y químicas entre las bacterias y se ponen de manifiesto ciertas estructuras de la morfología bacteriana.

Coloración de Gram. Esta coloración permite observar la propiedad de las bacterias Gram positivas de retener el complejo formado por el colorante cristal violeta y el mordiente lugol, tiñéndose de violeta y de las Gram negativas, que pierden el complejo y se tiñen de rojo con el colorante de contraste safranina.

Para realizarla se hace lo siguiente:

Preparar un frotis como se hizo para la tinción simple.

Cubrir con cristal violeta y dejar actuar durante un minuto.

Lavar con agua.

Cubrir con lugol y dejar actuar un minuto.

Lavar con agua.

Decolorar con alcohol de 96° hasta que éste no arrastre colorante.

Lavar con agua.

Cubrir con safranina y dejar actuar por 30 segundos.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

CAPILLA ALFONSINA

Tinción ácido-alcohol-resistente. Cierto tipo de bacterias presentan resistencia al alcohol ácido y éstas generalmente resultan difíciles de teñir con los colorantes habituales. En esta técnica se utilizan colorantes básicos con bastante afinidad por la célula y por lo general se aplican con calor. Las bacterias ácido-alcohol-resistentes, una vez que han tomado este colorante, resisten el tratamiento de decoloración. Esta propiedad está relacionada con la composición química de la célula y muy especialmente por el alto contenido de lípidos.

La tecnica más empleada es la Ziehl Neelsen que utiliza fucsina fenicada como colorante primario, alcohol ácido como agente decolorante y azul de metileno como colorante de contraste. Las bacterias ácido-alcohol-resistentes se tiñen de rojo, y las que no lo son, de color azul.

Para realizar la técnica de Ziehl Neelsen se hace lo siguiente:

Preparar un frotis como se hizo para la coloración simple.

Colocar el portaobjetos sobre un recipiente con agua en ebullición para obtener calentamiento por vapor.

Colocar sobre el frotis un trozo de papel filtro y sobre él agregar fucsina fenicada. Dejar actuar durante 5 a 10 minutos. Reponer continuamente el colorante evaporado, evitando poner un exceso del mismo.

Dejar enfriar la preparación a temperatura ambiente.

Lavar con agua.

Decolorar con alcohol ácido durante 30 segundos o hasta que no se arrastre más colorante.

Lavar con agua.

Cubrir la preparación con solución de azul de metileno y dejar actuar durante un minuto.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Los bacilos ácido-alcohol-resistentes se observarán de color rojo.

Tinción de esporas. La observación de esporas bacterianas permite además de conocer su presencia, determinar su forma, tamaño y posición dentro de la célula vegetativa.

Para realizar esta tinción se requiere de ciertos métodos que permitan la penetración del colorante primario, ya sea recurriendo al calor o a una exposición prolongada del colorante.

Método de Bartholomew Mettwer (exposición prolongada del colorante).

Preparar un frotis como se hizo para la tinción simple.

Fijarlo por calor, pasándolo de 20 a 25 veces por la flama de un mechero.

Cubrir la preparación con solución acuosa al 7.6% de verde de malaquita durante 10 minutos.

Lavar con agua.

Cubrir con solución acuosa de safranina al 0.25% durante 15 segundos.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Las esporas se tiñen de verde y la célula vegetativa de rojo.

Los agentes causales de infección en peces generalmente no forman esporas.

Tinción de cápsulas. La cápsula de las bacterias presenta diferente afinidad a los colorantes en comparación con otras estructuras celulares.

Se pueden utilizar métodos en donde la cápsula se observa por contraste o bien teñida; este último se considera más eficaz, ya que la cápsula se contrasta con respecto a la célula y el resto del campo.

Método de Leifson. Preparar un frotis como se hizo en la tinción simple.

Dejarlo secar al aire (no fijar por calor).

Cubrir la preparación con solución colorante de Leifson durante 10 minutos.

Lavar con agua.

Cubrir con solución colorante de bórax-azul de metileno y dejar actuar por 5 minutos.

Lavar con agua.

Secar entre papel filtro.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Las cápsulas se teñirán de rojo y las células de azul.

Tinción de flagelos. Los flagelos son estructuras termolábiles y sus diámetros están por debajo de los límites del poder de resolución del microscopio óptico; por lo tanto, para colorearlos, es necesario manejar cuidadosamente la muestra y utilizar técnicas especiales.

El método de Gray, utiliza un mordiente que cubre la superficie del flagelo, aumentando aparentemente su grosor y a su vez proporcionando una capa de material teñible para captar el colorante.

CAPILLA ALFONSINA

Método de Gray

Pasar un portaobjetos 3 a 4 veces sobre la flama de un mechero.

Preparar una suspensión de la bacteria en agua estéril.

Sobre el portaobjetos flameado y frío, colocar 5 gotas de la suspensión (4 gotas en las esquinas y una en el centro).

Dejar secar la preparación al aire NO CALENTAR.

Cubrir con el mordiente durante 10 minutos.

Lavar con agua, tratando de no arrastrar la preparación.

Cubrir con solución de carbol-fucsina durante 5 a 10 minutos.

Lavar con agua.

Dejar secar al aire.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Los flagelos se observarán de color rojo.

El mordiente deberá ser preparado el mismo día de su uso.

B) DIFERENCIACION BIOQUIMICA

A partir de los cultivos puros de los diferentes tipos de colonias se siembra en medios de cultivo específicos para diferenciación bioquímica de los microorganismos.

Las pruebas más importantes se describen a continuación:

Prueba de motilidad. Sembrar por picadura en medio de agar semisólido. Se incuba a 35°C durante 24 horas. El crecimiento difuso en el medio indica la motilidad del microorganismo.

Prueba de indol. Sembrar por picadura en un tubo con medio de SIM o caldo triptona, se incuba a 35°C durante 24 horas, se agregan 0.5 ml de reactivo de Kovacs. La prueba es positiva cuando se forma un anillo púrpura en la superficie del medio.

Prueba de Voges Proskauer (acetil-metil-carbinol o acetoína). Sembrar en un tubo con 5 ml de medio MR-VP incubar a 35°C durante 48 horas. A 1 ml del cultivo agregar 0.6 ml de reactivo de alfa-naftol y 0.2 ml de una solución de hidróxido de potasio al 40%.

Agitar y dejar repasar de 2 a 4 hrs. Si se ha producido acetil-metil-carbinol, se formará un color rojo anaranjado brillante en la superficie del tubo, que gradualmente se irá difundiendo en el medio.

Prueba del rojo de metilo. Inocular un tubo con 5 ml de medio MR-VP, incubar a 37°C durante 48-96 hrs. Agregar 5 gotas de reactivo de rojo de metilo. La reacción positiva la indica un color rojo intenso.