

Agar Sangre / Agar Mac Conkey

USO

Agar Sangre es un medio utilizado para el aislamiento, cultivo y detección de microorganismos hemolíticos fastidiosos, también se utiliza para determinar reacciones hemolíticas.

Agar Mac Conkey es un medio moderadamente selectivo y diferencial para la detección de bacilos, coliformes y enteropatógenos basados en la fermentación de la lactosa.

EXPLICACIÓN

Agar Soya Trypticaseína (AST) adicionado de sangre de carnero es un medio enriquecido, que favorece las reacciones hemolíticas además de que proporciona factores de crecimiento, las peptonas proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas y aminoácidos esenciales. El Cloruro de Sodio tiene la función del balance osmótico y el Agar bacteriológico es incorporado como agente solidificante.

Agar Mac Conkey es un medio selectivo y diferencial recomendado para el aislamiento e identificación de Enterobacterias a partir de muestras clínicas, alimentos, agua, productos lácteos y productos farmacéuticos. En este medio se aíslan y diferencian bacilos entéricos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de la lactosa. Agar MacConkey en su fórmula original fue utilizado para diferenciar cepas de Salmonella de otros miembros del grupo coliforme. La fórmula fue modificada para mejorar el crecimiento de cepas de Salmonella y Shigella y con ello también se mejoraron las reacciones diferenciales entre los microorganismos patógenos entéricos y del grupo coliforme. El medio contiene gelatina y mezcla de peptonas que proporcionan los nutrientes básicos: nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos. La lactosa es el carbohidrato fermentable y proporciona la fuente de energía. El cloruro de sodio favorece el crecimiento de Salmonella y Shigella. Las sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben a los microorganismos Gram positivos y permiten el crecimiento de microorganismos Gram negativos. El rojo neutro es el indicador de pH. El agar bacteriológico es el agente solidificante. Las colonias aisladas de bacterias que fermentan la lactosa son rosadas y pueden estar rodeadas de una zona de precipitado de sales biliares el cual es debido a una caída en el pH por la fermentación de la lactosa. Las colonias que no fermentan la lactosa, como la de *Salmonella enterica* serotipo Typhi, *Salmonella enterica* serotipo *Paratyphi* y *Shigella dysenteriae* permanecen incoloras.

FÓRMULA POR LITRO

Agar Sangre

Digerido Pancreático de Caseína	15.0 g	Cloruro de Sodio	5.0 g
Peptona de Soya	5.0 g	Agar Bacteriológico	15.0 g
Sangre de carnero desfibrinada	50.0 mL		

pH 7.3 ± 0.2 a 25°C

Agar Mac Conkey

Digerido pancreático de gelatina	17.0 g	Sales biliares	1.5 g
Digerido péptico de tejido animal	1.5 g	Cloruro de sodio	5.0 g
Digerido pancreático de caseína	1.5 g	Cristal violeta	0.001 g
Lactosa	10.0 g	Agar bacteriológico	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g		

pH 7.1 ± 0.2 a 25°C

PREPARACIÓN

Método de preparación Agar Sangre

Suspender 40 gramos del medio en un litro de agua purificada. Mezclar y calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C, adicionar asepticamente 50mL de sangre de carnero desfibrinada estéril al medio y vaciar en uno de los compartimentos de las placas dobles de Petri estériles.

Procedimiento

1. Inocular las placas de acuerdo a procedimientos internos de laboratorio.
2. Incubar aeróbicamente o bajo condiciones de atmosfera parcial de CO₂, según los procedimientos establecidos a 35± 2°C de 24 a 48 horas.
3. Los tipos de hemólisis que pueden presentarse son:
 - a. Alfa (α)-hemólisis: Es la reducción de hemoglobina a meta-hemoglobina en el medio que rodea a la colonia; presentándose como una decoloración verdosa en el medio.
 - b. Beta (β)-hemólisis: Es la lisis de los eritrocitos; presentándose como zonas claras alrededor de las colonias.
 - c. Gama (γ)-hemólisis: Indica no hemólisis. No ocurre destrucción alguna de los eritrocitos y no hay cambio en el medio.
 - d. Alfa prima (α')-hemólisis: Se observa un pequeño halo de células intactas o parcialmente hemolisadas adyacente a la colonia bacteriana, rodeada por una zona de hemólisis completa.

Método de preparación Agar Mac Conkey

Suspender 50 gramos del medio en un litro de agua purificada. Mezclar bien y calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en uno de los compartimentos de las placas dobles de Petri estériles.

Procedimiento

1. Inocular las muestras de acuerdo a procedimientos internos de laboratorio.
2. Incubar en condiciones aeróbicas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 horas.

CARACTERÍSTICAS

El crecimiento, hemolisis y recuperación del **Agar Sangre** se describe en la siguiente tabla:

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	HEMOLISIS	INOCULO cfu/mL	% DE RECUPERACIÓN
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Bueno	Beta	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Bueno	Alfa	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Bueno	Beta	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	-	≤ 100	$\geq 80\%$

El crecimiento, características de las colonias y recuperación del **Agar MacConkey** se describe en la siguiente tabla:

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	CARACTERÍSTICAS DE LA COLONIA	INOCULO cfu/mL	% DE RECUPERACIÓN
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	Rosa con halo de precipitado	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Bueno	Incoloras, transparentes	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Bueno	Incoloras, transparentes	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	Bueno	Rosa, mucóide	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Bueno	Incoloras, opacas sin swarming	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Inhibido	Rosa puntiforme	10^4 - 10^6	$\leq 25\%$

Interpretación: Los microorganismos lactosa positiva dan colonias de color rosa con o sin zona de precipitado alrededor.
Los microorganismos lactosa negativos dan colonias incoloras o de color rosa tenue.

PRESENTACIÓN Y ALMACENAMIENTO

CAT. No	PRESENTACIÓN	ALMACENAMIENTO
7674	Medio preparado en Placa (Pqte/10 Placas con dos divisiones)	2-8°C
		

BIBLIOGRAFÍA

1. Leavit, J.M. Naidorf and P. Shugaefsky. 1955. The undetected anaerobe in endodontic, a sensitive medium for detection of both aerobes and anaerobes. The NY.J. Dentist. 25:377-382
2. Curry, A. S., G.G., Joyce, and G.N. Mc Ewain, Jr. 1993. CTFA Microbiology guidelines. The cosmetic, Toiletry and Fragrance . Association. Inc. Washington, DC.
3. Brown, J.H. 1919. The use of blood agar for the study of streptococci. NY Monograph No. 9 The Rockefeller Institute for Medical Research.
4. The United States Pharmacopeia (USP XXIII) and The National Formulary (NF18). 1995 Sterility test, p. 1686-1690. United States Pharmacopeia Convention Inc., Rockville, MD.
5. Vera and Power. 1980 In Lennette, Balows, Hausler and Truand (ed.) Manual of clinical microbiology, 3rd ed. ASM, Washington, D.C.
6. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in feces. J. Hyg. 5:333-379.
7. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1995. The United States pharmacopeia, 23 ed. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, M. D.
8. Food and Drug Administration. 1995 Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
9. Gray, L.D. 1995 Escherichia, Salmonella, Shigella and Yersinia, p450-456. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. MacConkey J. H. 5:33. 1905. Joseph Md. State. Dept. Health. Procedures, 1960. European Pharmacopoeia. 4th Ed. 2002.
11. Song Y., Roumagna P., Weill F-X., Wain J., Dolecek C., Mazzoni C.J., Holt K.E., y Achtman M. 2010 A multiplex single nucleotide polymorphism typing assay for detecting mutations that result in decreased fluoroquinolone susceptibility in Salmonella enteric serovars Typhi and Paratyphi A. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 65 1631-1641.
12. Jarvik T., Smillie C., Groisman E. A. y Ochman H. 2010 Short-Term Signatures of Evolutionary Change in the Salmonella enterica Serovar Typhimurium 14028 Genome. Journal of Bacteriology. Vol. 192 No. 2 560-567.
13. Porwollik S. 2011 Salmonella: From Genome to Function. Ed. Ilustrada Horizon Scientific Press. 300 Págs.
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos: Suplemento para Dispositivos Médicos. 3a. Ed. -- México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014