

## Agar Biggy / Agar sangre / Agar Mac Conkey

### USO

**Agar Biggy** (por sus siglas en Inglés Bismuth Glucose Glycine Yeast) es un medio para el aislamiento y diferenciación de levaduras del género *Candida*. También es conocido como Agar de Nickerson.

**Agar Sangre** es utilizado para el aislamiento, cultivo y actividad hemolítica de *Streptococos* y otros microorganismos fastidiosos.

**Agar Mac Conkey** es un medio selectivo para el aislamiento de coliformes.

### EXPLICACIÓN

**Agar Biggy** es una modificación de la fórmula desarrollada por Nickerson, quién realizó estudios sobre la reducción de sulfito por especies de *Candida*. La diferenciación está basada en la morfología colonial y la pigmentación típica que se presenta en este medio. El extracto de levadura proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento, tales como nitrógenos, vitaminas y aminoácidos. La glicina es utilizada para estimular el crecimiento, además por su alta concentración, también inhibe a ciertos grupos bacterianos. La dextrosa es el carbohidrato fermentable, la fuente de carbono y energía. El citrato de amonio y bismuto y el sulfito de sodio actúa como inhibidores del desarrollo bacteriano. Las especies de *Candida* a través de un proceso de reducción del sustrato, reducen la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro, estos se combina, manifestándose en un precipitado negro a café que pigmenta a las colonias y que en ocasiones difunde en el medio. El agar es adicionado como agente solidificante.

**Agar Sangre:** 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. 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 Biggy*

Citrato de amonio y bismuto	5.0 g	Glicina	10.0 g
Sulfito de sodio	3.0 g	Extracto de levadura	1.0 g
Dextrosa	10.0 g	Agar bacteriológico	16.0 g

**pH 6.8 ± 0.2 a 25°C**

### *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 7.4 ± 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 del Agar Biggy*

Suspender 45 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. No esterilizar en autoclave. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en uno de los compartimentos de las placas triples de Petri estériles.

## **Procedimiento**

1. Inocular las placas con la muestra previamente procesada de acuerdo a los procedimientos establecidos.
2. Incubar en condiciones aeróbicas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  de 24 a 48 horas y de 3 a 5 días en caso de ser necesario a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## **Método de preparación del Agar Sangre:**

Suspender 40 g 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  $121^\circ\text{C}$  (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre  $45\text{-}50^\circ\text{C}$ , adicionar aseptícamente 50mL de sangre de carnero desfibrinada estéril al medio y vaciar en uno de los compartimentos de las placas triples 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  $\text{CO}_2$ , según los procedimientos establecidos a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  de 24 a 48 horas.
3. Los tipos de hemólisis que pueden presentarse son:
  - a. Alfa ( $\alpha$ )-hemólisis: Es la reducción de hemoglobina a metahemoglobina en el medio que rodea a la colonia; presentándose como una decoloración verdosa en el medio.
  - b. Beta ( $\beta$ )-hemólisis: Es la lisis de los eritrocitos; presentándose como zonas claras alrededor de las colonias.
  - c. Gama ( $\gamma$ )-hemólisis: Indica no hemólisis. No ocurre destrucción alguna de los eritrocitos y no hay cambio en el medio.
  - d. Alfa prima ( $\alpha'$ )-hemólisis: Se observa un pequeño halo de células intactas o parcialmente hemolizadas adyacente a la colonia bacteriana, rodeada por una zona de hemólisis completa.

## **Método de preparación del 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  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre  $45\text{-}50^\circ\text{C}$  y vaciar en uno de los compartimentos de las placas triples 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, color de la colonia y recuperación en el **Agar Biggy** se describe en la siguiente tabla:

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	COLOR DE LA COLONIA	INOCULO cfu/mL	% DE RECUPERACIÓN
<i>Candida albicans</i>	10231	Bueno	Café a negro	≤ 100	>80%
<i>Candida tropicalis</i>	1369	Bueno	Café oscuro con centro negro	≤ 100	>80%
<i>Candida krusei</i>	34135	Bueno	Café a negro	≤ 100	>80%
<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibido	-	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>6</sup>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Inhibido	-	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>6</sup>	-

### Características coloniales:

**Candida albicans:** Colonias circulares café oscuro a negro, ligero borde micelial.

**Candida tropicalis:** Colonias pequeñas con centro negro, ligero borde micelial, después de 72h el medio presenta color negro difuso.

**Candida krusei:** Colonias grandes café oscuro, planas y rugosas con halo amarillo difundido en el medio.

**Candida kefyr:** Colonias grandes de color rojo oscuro, planas con ligero crecimiento micelial.

**Candida parakrusei:** Colonias medianas, planas rugosas, café-rojizas, con crecimiento micelial amarillo.

Algunas bacterias pueden crecer en el medio y producir un precipitado café, estas pueden ser discriminadas mediante un examen microscópico.

El crecimiento, hemolisis y recuperación de **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	≥ 80%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Bueno	Alfa	≤ 100	≥ 80%
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Bueno	Beta	≤ 100	≥ 80%
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	-	≤ 100	≥ 80%

El crecimiento, características de las colonias y recuperación de **Agar Mac Conkey** 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	≥80%
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Bueno	Incoloras, transparentes	≤ 100	≥80%
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Bueno	Incoloras, transparentes	≤ 100	≥80%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	Bueno	Rosa, mucoide	≤ 100	≥80%
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Bueno	Incoloras, opacas sin swarming	≤ 100	≥80%
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Inhibido	Rosa puntiforme	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>	≤25%

## PRESENTACIÓN Y ALMACENAMIENTO

CAT. No	PRESENTACIÓN	ALMACENAMIENTO
8214	Medio preparado en Placa (Pqte/10 Placas con tres divisiones)	2-8°C
		

## BIBLIOGRAFÍA

1. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in feces. *J. Hyg.* 5:333-379.
2. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1995. The United States pharmacopeia, 23 ed. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, M. D.
3. Food and Drug Administration. 1995 Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
4. 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.
5. MacConkey J. H. 5:33. 1905. *Joseph Md. State. Dept. Health. Procedures*, 1960. *European Pharmacopoeia*. 4th Ed. 2002.
6. 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.
7. 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.
8. Porwollik S. 2011 Salmonella: From Genome to Function. Ed. Ilustrada Horizon Scientific Press. 300 Págs.
9. 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.
10. 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
11. Curry, A. S., G.G., Joyce, and G.N. Mc Ewwn, Jr. 1993. CFTA Microbiology guidelines. The cosmetic, Toiletry and Fragrance Association. Inc. Washington, DC.
12. Brown, J.H. 1919. The use of blood agar for the study of streptococci. NY Monograph No. 9 The Rockefeller Institute for Medical Research.
13. The United States Pharmacopeia (USP XXIII) and The National Formulary (NF18). 1995 Sterility test, p. 1686-1690.
14. United States Pharmacopeia Convention Inc., Rockville, MD.
15. Vera and Power. 1980 In Lennette, Balows, Hausler and Truand (ed.) *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. ASM, Washington, D.C.
16. Chapman, G.H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.* 50:201-203.
17. Kloos, W.E., and T.L. Bannerman. 1995. Staphylococcus and Micrococcus. 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.
18. United States Pharmacopeial Convention. 1995. The United States pharmacopeia, 2nd ed. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, M.D.
20. Hitchins, A.D., T.T. Tran, and J.E. MacCarron. 1995. Microbiology methods for cosmetics, p. 23.01-23.12. In *Bacteriological analytical manual*, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, M.D.
21. McColloch Am. j. Vet. Research, 8:173. 1947. Velilla, Faber, and Pelczar Am. J. Vet. Research, 8:275. 1947.
22. 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*.
22. Rodríguez C.E. 2005 *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Ed. Universidad de Costa Rica. 475 págs.