

Agar sangre/Agar Sal y Manitol/ Agar Mac Conkey

USO

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

El Agar Sal y Manitol es utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos patógenos a partir de muestras clínicas y de diversos materiales.

El Agar MacConkey es un medio moderadamente selectivo y diferencial para la detección de bacilos coliformes y enteropatógenos basado en la fermentación de la lactosa.

EXPLICACIÓN

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 Sal y Manitol, es un medio de cultivo nutritivo debido a que el contenido de peptonas y de extracto de carne proporcionan los factores de crecimiento esenciales como son carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, la concentración de cloruro de sodio al 7.5% inhibe de forma parcial o completa el crecimiento de otros microorganismos, cuando hay producción de ácido por la fermentación del manitol, ésta es indicada por un cambio en el indicador rojo fenol y las colonias aparecen con un halo amarillo. El agar es adicionado como agente solidificante.

Agar MacConkey, 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 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 Sal y Manitol

Digerido péptico de tejido animal	5.0 g	D-Manitol	10.0 g
Digerido pancreático de caseína	5.0 g	Rojo de fenol	0.025 g
Extracto de carne	1.0 g	Agar bacteriológico	15.0 g
Cloruro de sodio	75.0 g		

pH 7.4 ± 0.2 a 25°C

Agar MacConkey

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 de 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°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 placas triples de Petri estériles.

Procedimiento

1. Sembrar las muestras de acuerdo a los 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 metahemoglobina 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 del Agar Sal y Manitol

Suspender 111 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 placas triples de Petri estériles.

Procedimiento

1. Sembrar las muestras de acuerdo a los procedimientos internos de laboratorio o normas aplicables.
2. Incubar en condiciones aeróbicas las placas a 35 ± 2°C durante 24 a 48 horas y observar el desarrollo

Método de preparación del Agar MacConkey

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 placas de Petri estériles.

Procedimiento

1. Inocular las muestras de acuerdo a procedimientos internos de laboratorio.
2. Incubar en condiciones aeróbicas a 35 ± 2°C de 24 a 48 horas.

CARACTERÍSTICAS

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, color de la colonia y recuperación en el **Agar Sal y Manitol** describe en la siguiente tabla:

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	COLOR DE LA COLONIA	INOCULO cfu/mL	% DE RECUPERACIÓN
<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición total	-	>10 ⁴	0%
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Inhibición total o parcial.	-	> 10 ⁴	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Bueno	Amarillo	≤ 100	≥50%
<i>Staphylococcus aureus</i>	13150	Bueno	Amarillo	≤ 100	≥50%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Bueno	Roja	≤ 100	≥50%

El crecimiento, características de las colonias y recuperación de **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	≥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 ⁴ -10 ⁶	≤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
8224	Medio preparado en Placa Triple (Pqte/10 Placas siones)	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., Mazzone 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. Leavitt, 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. McEwen, Jr. 1993. CTFA 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.
19. 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.
20. McColloch Am. j. Vet. Research, 8:173. 1947. Velilla, Faber, and Pelczar Am. J. Vet. Research, 8:275. 1947.
21. 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.