

Manual práctico de Microbiología Forense

**Antonio Santos de la Sen. Alejandro Alonso Conde.
Luis Gamella Pozuelo. Ignacio Belda Aguilar. Domingo Marquina Díaz.**

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.
ansantos@bio.ucm.es dommarq@bio.ucm.es

Resumen: entre las distintas ciencias que un técnico forense utiliza en el desarrollo de su actividad se encuentra la Microbiología, ciencia que en su ámbito forense intenta conocer, entre otros, qué microorganismos pueden originar la muerte de un individuo, intervienen en el proceso de putrefacción cadavérica y los agentes biológicos que podrían usarse en el futuro como arma en bioterrorismo. También incluye su ámbito laboral el conocer la distribución de los microorganismos en la naturaleza, la forma de diseminarse en el humano, los animales y el medio ambiente, así como conocer la forma de diagnosticar los microorganismos usados en bioterrorismo. También es competencia de la [Microbiología Forense](#) el conocer las bases científicas que validan las técnicas de diagnóstico microbiológico como prueba incriminatoria. Esta publicación educativa supone una ayuda para conocer y saber utilizar la terminología microbiológica adecuada, determinar el tipo de análisis microbiológico más adecuado, interpretar los resultados del análisis microbiológico y resolver en equipo e individualmente casos prácticos que pudieran acontecer durante la vida profesional de un técnico forense.

Palabras clave: Microbiología. Ciencia forense. Microbiología forense. Protocolo de actuación.

INTRODUCCIÓN

Las ciencias forenses comprenden hoy en día un conjunto de técnicas que incluyen la investigación policial, judicial y científica y que tienen como finalidad la consecución de pruebas a efectos judiciales. La Microbiología Forense, es una disciplina de reciente aplicación en criminalística que proporciona nuevas herramientas para poder resolver las dudas que acontecen tanto en los procesos de muerte natural como violenta. Sin embargo, la Microbiología Forense es algo más que eso, pues permite determinar la impronta de microorganismos en restos cadavéricos muy antiguos y poder así determinar si la causa del fallecimiento fue por causas infecciosas o no. Permite conocer qué microorganismos intervienen en los procesos relacionados con la descomposición cadavérica, facilitando la determinación del ámbito temporal de la muerte. También, y después de los últimos atentados terroristas a nivel internacional, la Microbiología Forense juega un importante papel a

la hora de proteger y determinar los posibles agentes biológicos empleados en un ataque terrorista en periodo de paz o en una contienda bélica.

Protocolo de actuación forense en Microbiología

Aunque el principal deber de la patología forense es auxiliar a la administración de justicia, no podemos olvidar las obligaciones que como médicos tenemos con los familiares del fallecido y con la comunidad a la que servimos. La investigación basada en autopsias ofrece información útil y fiable en estudios sobre prevención y epidemiología en diversas áreas de la medicina. Esta información sobre las causas de la muerte es esencial en el desarrollo de políticas de salud nacional e internacional para la prevención y control de las enfermedades. Por otro lado, mediante la autopsia se pueden identificar enfermedades hereditarias de las que la familia debería ser informada para el oportuno consejo genético (por ejemplo, determinadas miocardiopatías y síndromes arrítmicos primarios), y enfermedades infecto-contagiosas. Estas últimas exigen la rápida instauración de medidas preventivas en los contactos cercanos para evitar casos secundarios. Se trata de patologías de indudable interés sanitario que se consideran enfermedades de declaración obligatoria (Fig. 1).

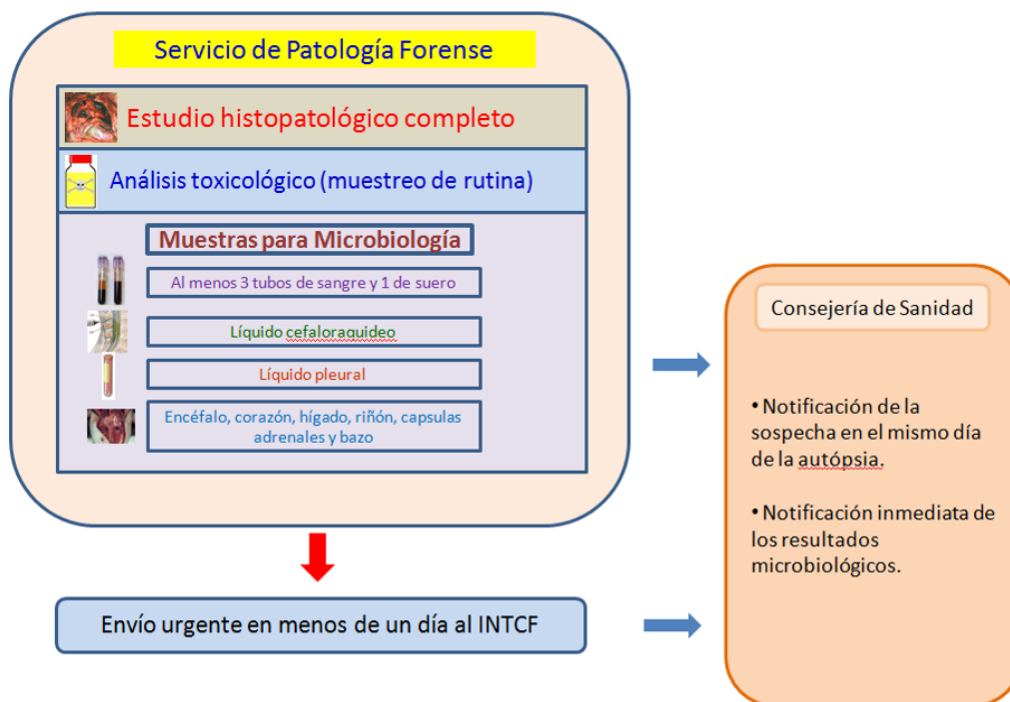


Figura 1. Protocolo de actuación forense cuando se sospecha una posible muerte por acción de agentes microbianos.

PROTOCOLO DE ESTUDIO EN MICROBIOLOGÍA. MUESTRAS NECESARIAS Y ENVÍO

Las principales muestras necesarias para enviar al laboratorio son: sangre, suero, LCR, orina y vísceras en fresco (Fig. 1). Además, si existen exudados, es conveniente

analizarlos. Como regla general, en microbiología forense, se considera conveniente la detección del mismo microorganismo en más de un tejido o fluido corporal. Por este motivo se aconseja disponer siempre del mayor número posible de muestras. Todas las muestras deben tomarse en recipientes estériles y su envío debe ser inmediato desde la toma. Las muestras para estudios antigénicos y moleculares deben refrigerarse, mientras que se recomienda mantener a temperatura ambiente en vez de en refrigeración las muestras destinadas a cultivo.

Sangre y suero

De acuerdo a las recomendaciones publicadas en la literatura especializada, la sangre se debe tomar por punción intracardiaca transcutánea a tórax cerrado y tras la desinfección de la piel, o mediante punción directa del ventrículo derecho a tórax abierto. En este último caso, se debe aplicar una espátula al rojo sobre el miocardio. También es posible extraer la sangre, en idénticas condiciones de asepsia, de aorta o vena cava inferior. Sin embargo, según la experiencia de los autores también se consigue resultados válidos con muestras recogidas mediante punción directa de una vía periférica (vena axilar o femoral), previa exposición de la misma en las mejores condiciones posibles de asepsia.

Se recomienda tomar, al menos, 4 tubos de sangre de 3 ó 5 ml: tres de ellos se van a destinar al estudio microbiológico:

- Un tubo se destinará al cultivo bacteriológico; se recomienda que este lleve polianetol sulfonato sódico (SPS) como anticoagulante, o citrato trisódico (TCS). No se recomienda que este tubo lleve fluoruro sódico como conservante o EDTA como anticoagulante, ya que ambos son tóxicos para muchos microorganismos.
- Un tubo se destinará a técnicas moleculares, que deberá contener EDTA sódico como anticoagulante.
- Un tubo con activador del coágulo se destinará a la recogida de suero; este tubo permite que, tras la centrifugación, el suero se separe directamente antes de llegar al laboratorio.
- El cuarto tubo, que se reservará para los análisis químicos-toxicológicos, deberá contener oxalato potásico como anticoagulante y fluoruro sódico como conservante.

El líquido cefalorraquídeo (LCR)

Siempre que exista sospecha de meningitis es conveniente la extracción de LCR, que se hará mediante punción en la cisterna magna (entre los hemisferios cerebelosos) con aguja larga desde la parte posterior del cuello. Se coloca al cuerpo en decúbito prono y se inserta la aguja en la línea media bajo la base del hueso occipital y dirigida

levemente hacia arriba. Habrá que manipular con cuidado para evitar la hemorragia de los pequeños vasos de la zona. Si no se consigue de esta manera, se podría intentar mediante aspiración a través de agujero espinal entre L1 y L2. La zona de piel donde se va a realizar la punción lumbar se desinfecta con lugol-povidona al 10 % y se deja secar, procediéndose a la extracción de la mayor cantidad posible de líquido.

Tejidos y órganos en fresco

Se recomienda el estudio de bazo, hígado, pulmón, miocardio, cerebro, riñón y glándulas suprarrenales. Se requiere solo una pequeña cantidad de muestra de cada uno de estos tejidos, que se introduce en un vial estéril. Se cauteriza una superficie amplia con espátula al rojo y con ayuda de instrumental estéril se toma un bloque de tejido de 1 cm³, empleando un equipo para cada muestra.

La orina

Se recoge por punción de la vejiga. Es una muestra útil para el estudio de antígenos bacterianos, especialmente ante la sospecha de *S. pneumoniae*.

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO. TÉCNICAS DE LABORATORIO

El protocolo microbiológico ante una sospecha de infección meningocócica o de shock séptico fulminante se realiza sistemáticamente desde 2001 en el Departamento de Madrid del INTCF (Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses), al que se pueden enviar las muestras antes indicadas desde cualquier punto del país (Figura 1). Este protocolo consta de las siguientes fases:

Detección de antígenos bacterianos

Investiga la presencia de las bacterias que más frecuentemente son responsables de infecciones fulminantes (meningitis y shock séptico) mediante la detección de sus antígenos en suero, LCR, exudado pleural y orina.

Se trata de unas técnicas rápidas (1/2 hora), sensibles y que no suelen presentar falsos positivos. Su carácter es presuntivo, por lo que se deben confirmar mediante análisis moleculares y/o cultivo bacteriano. Estas técnicas son:

La aglutinación en látex, que detecta antígenos polisacáridicos capsulares de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, B, C, Y y W135, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* serotipo b, *Streptococcus* β hemolítico del grupo B (*S. agalactiae*) y *Escherichia coli* K12. Esta técnica se ha validado en muestras forenses y ha demostrado su utilidad para el diagnóstico de infecciones fulminantes por estos agentes. El protocolo del INTCF incluye el empleo conjunto de dos kits comerciales diferentes, lo que permite confirmar tanto los resultados positivos como los negativos.

Las muestras necesarias son suero, LCR y orina. Aunque en general esta técnica no tiene una sensibilidad muy alta, en el caso de infecciones fulminantes con evolución fatal suele existir una alta concentración de antígenos circulantes, por lo que la sensibilidad es mayor que en muestras clínicas de individuos vivos. Además, cuando las muestras forenses se hallan en buen estado de conservación, se suele obtener una adecuada correlación con la PCR.

La inmunocromatografía. Esta técnica se aplica a la detección de antígenos capsulares de *S. pneumoniae*, siendo el LCR la muestra de elección.

El inmunoensayo para detección de antígeno de *Streptococcus pyogenes* (β hemolítico del grupo A). Este método, inicialmente diseñado para los exudados faríngeos, también ha sido aplicado satisfactoriamente por los autores a la detección de infección fulminante por *S. pyogenes* en suero, líquido pleural y LCR.

Diagnóstico molecular

Consiste en la detección de genes específicos de los microorganismos patógenos con la técnica de PCR. La presencia de ADN de patógenos en muestras forenses consideradas estériles (sangre, LCR, líquido pleural, etc.) se considera diagnóstica. Se trata de técnicas muy específicas y sensibles, que permiten la detección de algunos microorganismos lábiles cuyo crecimiento en medios de cultivo (Anexo I) a partir de muestras forenses es difícil (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* etc.). Por este motivo y por su rapidez (3 horas), esta tecnología presenta grandes ventajas frente al cultivo. Se trata de técnicas no comerciales, basadas en estudios de diversos Centros de Referencia de Microbiología (Instituto Nacional de la Salud Pública de Manchester, CDC e Instituto Pasteur) y que han sido validadas en el INTCF para su empleo forense.

Las muestras que se pueden analizar son sangre, suero, LCR, líquido pleural y tejidos y órganos en fresco (corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón, suprarrenales y cerebro). Excepcionalmente se podrían analizar cortes de parafina de muestras fijadas con formol mediante técnicas de PCR; sin embargo, el rendimiento de estas técnicas es mucho menor que cuando se aplican a muestras en fresco, ya que el tratamiento con formol fragmenta y altera el ADN.

En el INTCF la detección de material genético se realiza mediante ensayos de **PCR a tiempo real** con oligonucleótidos y **sondas Taq-Man** MGB diseñados para amplificar regiones específicas de cada una de las especies estudiadas. Esta técnica permite cuantificar la cantidad del producto de amplificación obtenido, correlacionándolo con unas medidas de fluorescencia que se monitorizan automáticamente, por lo que también se le denomina PCR cuantitativa. En el supuesto de meningitis bacteriana y/o shock séptico fulminante, se analizan los siguientes agentes:

1. Investigación de *Neisseria meningitidis* mediante detección del gen *ctr-A*, común a todas los serogrupos de esta especie.

2. Detección de los serogrupos B, C, W135 e Y de *N. meningitidis* mediante el análisis del gen siaD.
3. Investigación de *Streptococcus pneumoniae* mediante detección del gen de la pneumolisina ply.
4. Investigación de *Haemophilus influenzae* mediante detección del gen bex-A que codifica la exportación del polisacárido capsular.

Concretamente, aunque existen otras técnicas basadas en la PCR, consideramos que la PCR a tiempo real es la más adecuada para aplicar a muestras forenses ante el supuesto de shock séptico o [meningitis meningocócica](#), dada la necesidad de detectar o excluir con la mayor rapidez posible la presencia de *N. meningitidis*, puesto que esta permite obtener un resultado fiable solo en unas horas desde el inicio del análisis.

Cultivo bacteriológico

En microbiología clínica el cultivo bacteriano es la técnica de referencia o "gold standard"; no obstante, en microbiología forense no siempre se ha considerado como útil, dado el elevado grado de contaminación de las muestras, que se suele deber a la falta de asepsia durante la toma. Otra razón de su menor utilidad es que aquellos microorganismos más lábiles pueden no crecer en los medios de aislamiento, ocasionando falsos negativos. No obstante, un resultado positivo en el aislamiento de bacterias patógenas no ofrece dudas acerca de su interpretación, aportando siempre datos claves para establecer la etiología de la causa de muerte. Por ello, consideramos que en microbiología forense no se debe prescindir del cultivo, sino que este debe complementarse con otras técnicas como las antigénicas y moleculares.

Ante la sospecha de una meningitis bacteriana o un shock séptico fulminante, aunque las técnicas moleculares permiten la detección específica, rápida y sensible de los patógenos investigados, es conveniente realizar también un cultivo para aislar la bacteria responsable de la muerte. Este tendría dos objetivos fundamentales: confirmar los resultados moleculares y antigénicos, y caracterizar la cepa de la bacteria aislada con fines epidemiológicos. Estos resultados se suelen obtener entre 24 y 72 horas. El cultivo bacteriológico se puede efectuar en sangre (hemocultivos), LCR, líquido pleural y tejidos y órganos en fresco, pudiendo realizarse una tinción de Gram (Anexo II) en el LCR como técnica de *screening* previo.

INFORMACIÓN A LAS AUTORIDADES SANITARIAS COMPETENTES

Las meningitis bacterianas son enfermedades de declaración obligatoria. Ante su sospecha se debe realizar una declaración urgente a la Unidad de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección Territorial de Sanidad (Consejería de Salud). En el caso de infección meningocócica, una vez conocido el serogrupo se deberá comunicar con

la mayor rapidez posible para valorar la necesidad de vacunación de los contactos no vacunados. Tras aislar la cepa, esta deberá ser analizada para su tipado (Tabla 1).

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha
Muestra (código)	Técnica	FECHAS Inicio / lectura	Resultados y observaciones
Ejemplo: LCR001/50.323.323	Siembra en agar sangre de 0.1 ml LCR. Incubación 37°C, 24h. Atmósfera de CO2	21/02/2005	Positivo/negativo? Recuento? Interpretación?
COPIA REGISTRADA Nº ASIGNADA A			
Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro			
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.			

Tabla 1. Protocolo para información a las autoridades sanitarias competentes.

PROTOCOLO DE ACTUACIÓN

Ejemplos de muestras para examen

Las muestras a examinar provienen de tres autopsias donde se sospecha que la casusa de la muerte ha sido debida a la acción de distintos agentes microbianos. Se pide al laboratorio de Microbiología que realice los análisis correspondientes y envíe al forense el informe correspondiente. A cada una de las muestras se le da un número correspondiente al código de la muestra.

Tipo de Muestra	Fecha de entrada	Código
Encéfalo	27/1/2010	enc001/52.273.298
Pulmón	27/1/2010	pul001/50.694.927
Hígado	27/1/2010	hig001/25.296.618

Muestra 1: código enc001/52.273.298. Informes previos de anatomía patológica

Varón de 3 años, de origen brasileño, que fallece tras un cuadro febril, con rigidez cervical, e intenso dolor de cabeza, náuseas, descoordinación motora y una intensa fotofobia y confusión. La anatomía patológica del cerebro indica que en su base aparece un exudado inflamatorio y purulento (Fig. 2). Así mismo, se observa una elevación de la duramadre con el mismo exudado verde amarillento. Se sospecha una posible infección microbiana y se solicita al laboratorio de microbiología análisis aclaratorio (Fig. 3).

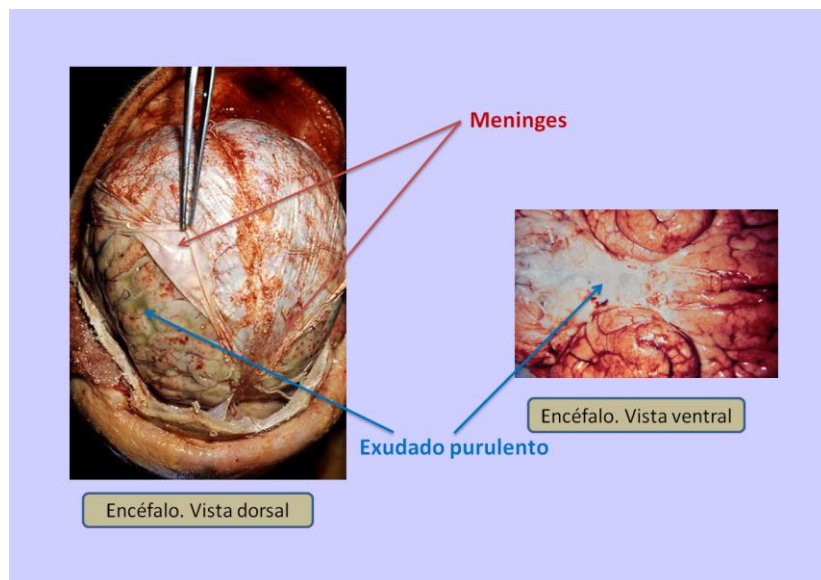


Figura 2. Anatomía patológica del cerebro.

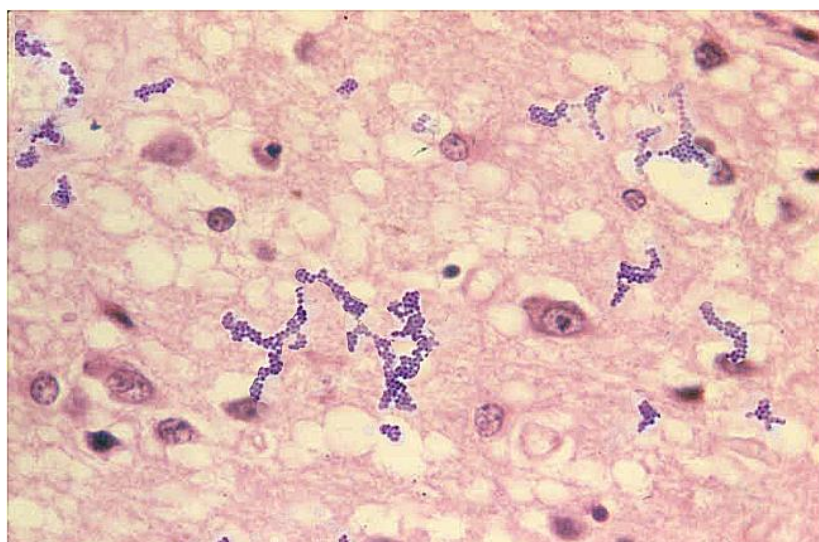


Figura 3. Imagen procedente de un corte de corteza cerebral en la que se aprecian agrupaciones de microorganismos con morfología de coco.

Muestra 2: código pul001/50.694.927. Informes previos de anatomía patológica

Individuo fumador, de 45 años, con tos obstructiva, fiebre, fatiga al caminar y un aumento de la frecuencia cardiaca. Ingresa en el hospital con niveles normales de CO₂ en sangre. No responde al tratamiento con antibióticos β-lactámicos, falleciendo por cuadro de insuficiencia respiratoria aguda a los pocos días de su ingreso en la unidad de neumología de un hospital. Tras el análisis anatomopatológico forense se observan manchas y pulmonares con un olor muy fuerte y focos histológicamente compatibles con una fibrosis quística (Fig. 4 y Fig. 5). Se solicita análisis al laboratorio de microbiología ante una posible infección pulmonar como causa de la muerte.

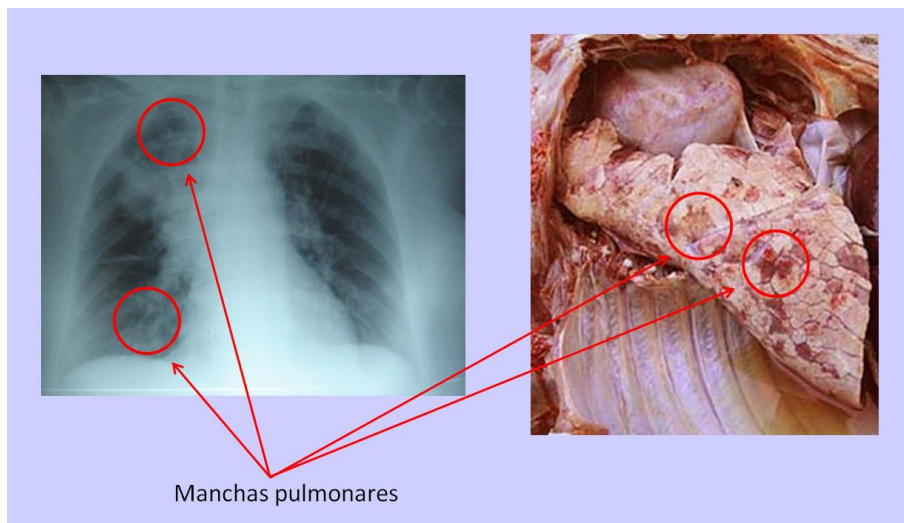


Figura 4. Anatomía patológica del pulmón y radiografía del mismo.

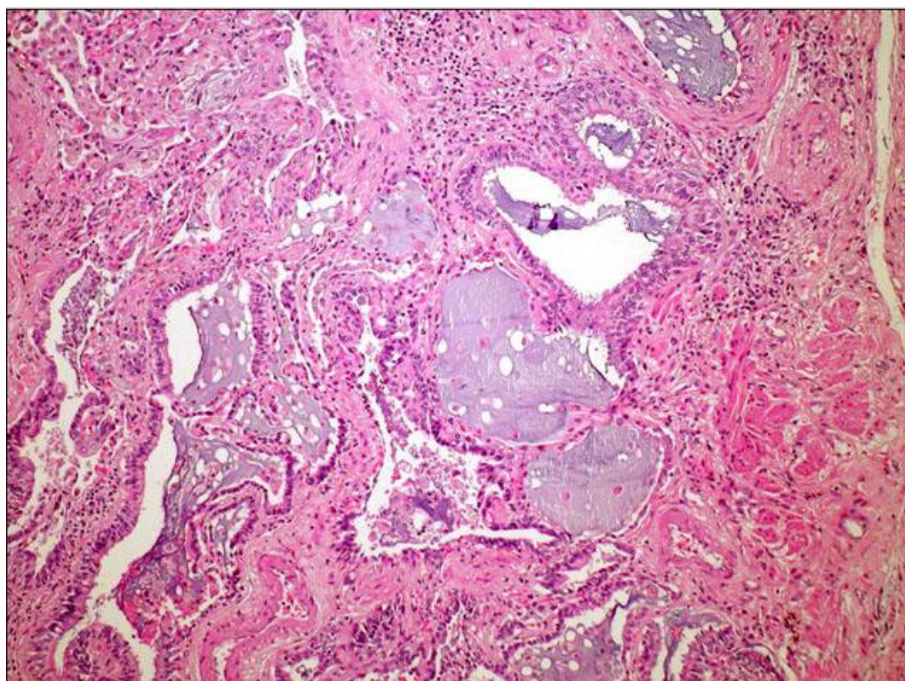


Figura 5. Imagen histológica que ilustra la presencia fibrosis pulmonar.

Muestra 3: código Hig001/25.296.618. Informes previos de anatomía patológica

Varón de 33 años de edad, que acaba de regresar de un viaje por el Congo ingresa en urgencias en el hospital con un cuadro de deshidratación generalizada, diarrea profusa, 40°C de temperatura. El torso aparece cubierto de pápulas de color salmón. Aparece una gran hepatomegalia y esplenomegalia. El individuo no responde al tratamiento de rehidratación y estabilización y fallece a las pocas horas de su ingreso hospitalario.

El examen forense muestra las pápulas sobre la piel y el hígado extremadamente inflamado. El aspecto de la necropsia hepática muestra focos purulentos. El forense solicita análisis al laboratorio de microbiología (Fig. 7).

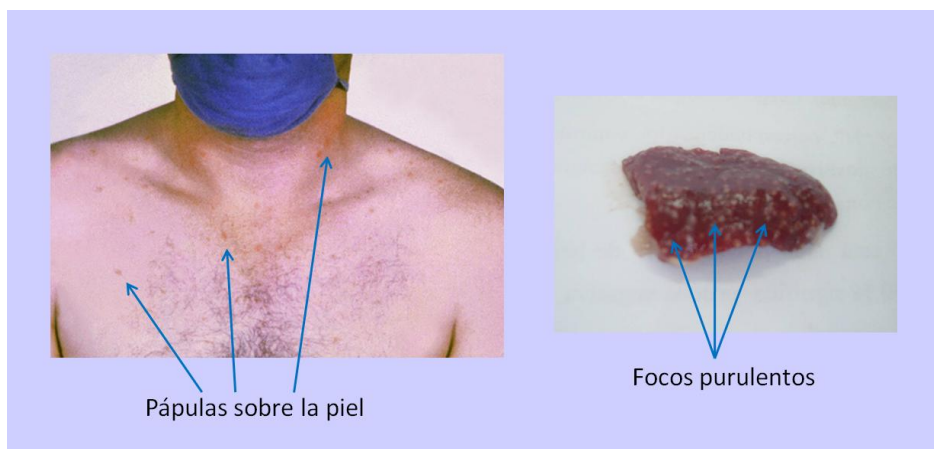


Figura 6. Anatomía patológica del hígado y fotografía del enfermo mostrando las pápulas rojizas sobre el torso.

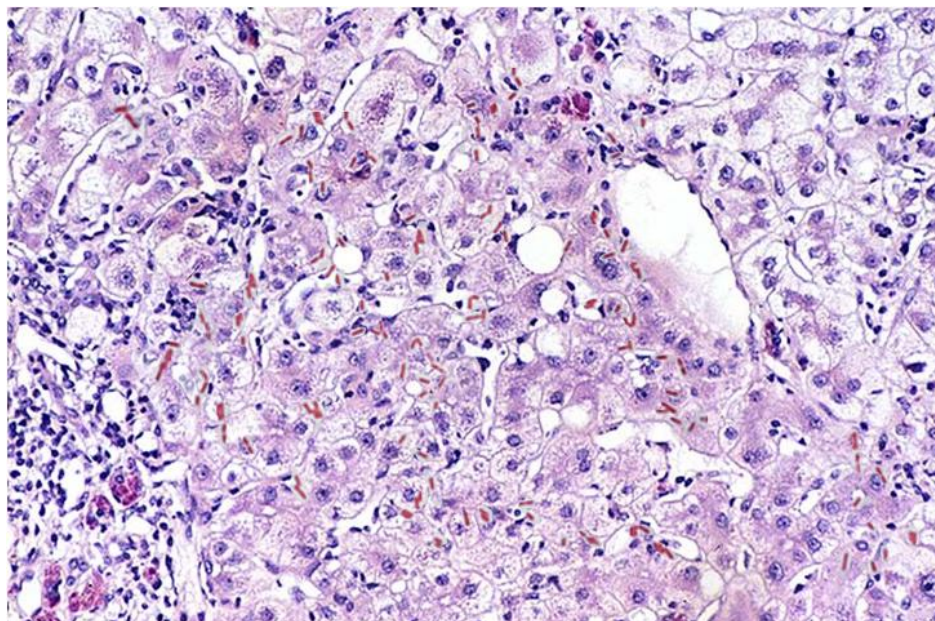


Figura 7. Imagen procedente de un corte de un corte histológico de tejido hepático en la que se aprecian microorganismos con morfología bacilar.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Debido a la descripción anatomopatológica de los órganos analizados y por las características de sus lesiones, el estudio microbiológico va a circunscribirse a tres posibles agentes biológicos:

- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella spp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Metodología

Cada equipo formado por dos personas analizará los tres órganos intentando comprobar si las lesiones que aparecen en los mismos son debidas a los microorganismos arriba indicados.

Día primero. Se pesarán 10 gramos de cada uno de los órganos a analizar y se resuspenderán en 90 ml de una solución de suero salino, que será considerada la "solución madre" para cada una de las muestras. Se inocula 1,0 ml de la solución madre en un tubo conteniendo el medio de cultivo de Giolitti -Cantoni. Una vez inoculado, se le añaden 2 ml de vaselina estéril aproximadamente para generar condiciones anaeróbicas. Se incuba a 37°C durante 24 horas. En segundo lugar se siembra por agotamiento de asa una placa conteniendo medio de cultivo PSIA, que se incuba así mismo a 37°C durante 24 horas. Por último, se inocula un tubo de medio de cultivo Rappaport-Vassiliadis con 0,5 ml de la solución madre, se incuba a 42°C durante 24 horas.

Día segundo. Inicialmente se realiza la lectura de los medios de cultivo inoculados el día anterior, y en función de los resultados se plantean distintas estrategias de identificación microbiana.

• **Muestra 1 (enc001/52.273.298). Resultados**

Medio de cultivo de Giolitti-Cantoni (+): tubos con sedimento color negro.

Medio de cultivo PSIA (-): No se observa crecimiento sobre el medio de cultivo.

Medio de cultivo Rappaport-Vassiliadis (-): No se aprecia turbidez en el medio de cultivo.

Observaciones: por los resultados obtenidos, los microorganismos que se encuentran en el tejido no parecen pertenecer a las especies *Pseudomonas aeruginosa* ni a *Salmonella spp.*

Metodología: a partir de los tubos con precipitado negro del medio Giolitti-Cantoni, se realizará un aislamiento por el método de agotamiento de asa en placa empleando el medio de cultivo Agar Baird-Parker. Del mismo modo, a

partir de los tubos con precipitado negro, se realizará una siembra por estría en una placa de petri con el medio de cultivo Agar DNAsa. Ambos cultivos se incubarán a 37°C durante 24 horas.

- **Muestra 2 (pul001/50.694.927). Resultados**

Medio de cultivo de Giolitti-Cantoni (-): Ausencia de sedimento negro en el fondo del tubo.

Medio de cultivo PSIA (+): Presencia de crecimiento sobre el medio de cultivo.

Medio de cultivo Rappaport-Vassiliadis (-): No se aprecia turbidez en el medio de cultivo.

Observaciones: los resultados obtenidos parecen indicar que los microorganismos que se encuentran en el tejido no parecen pertenecer a las especies: *Staphylococcus aureus* ni a *Salmonella* spp.

Metodología: a partir de la placa de petri con medio de cultivo PSIA con crecimiento se sembrará por estría un tubo con medio de cultivo TSA, empleando un asa de siembra. Se sembrará así mismo, una placa con medio de cultivo agar cetrimida mediante la técnica de la estría. Por último, se sembrará una placa con medio de cultivo agar gelatina mediante el método de siembra masiva en el centro de la placa. Todos los medios de cultivo se incubarán a 37°C durante 24 horas

- **Muestra 3: (hig001/25.296.618). Resultados**

Medio de cultivo de Giolitti-Cantoni (-): Ausencia de sedimento negro en el fondo del tubo.

Medio de cultivo PSIA (+): Presencia de crecimiento sobre el medio de cultivo.

Medio de cultivo Rappaport-Vassiliadis (+): Presencia de turbidez a lo largo de todo el tubo.

Observaciones: los resultados obtenidos parecen indicar que los microorganismos que se encuentran en el tejido no parecen pertenecer a las especies: *Staphylococcus aureus* ni *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodología: a partir del tubo del medio de cultivo Rappaport-Vassiliadis con turbidez se sembrará un tubo conteniendo agar de Kligler. Este medio de cultivo se sembrará con aguja de siembra sobre el bisel del medio y en profundidad por picadura profunda con aguja de siembra.

Así mismo, a partir del tubo positivo del medio de cultivo Rappaport-Vassiliadis se realizará un agotamiento de asa en una placa de petri conteniendo medio de Hektoen. Ambos medios de cultivo se incubarán a 37°C durante 24 horas.

Día tercero. Se procede a la lectura de los medios de cultivo inoculados el día anterior y a la identificación de los microorganismos.

- **Muestra 1 (enc001/52.273.298). Resultados**

Medio de cultivo Agar Baird-Parker (+): Colonias de color negro y halo blanco a su alrededor.

Medio de cultivo Agar DNAsa (+): Este medio de cultivo se revela mediante la incorporación sobre la superficie de la placa de unas gotas de HCl 1N. Aparece un halo transparente alrededor de la colonia.

Prueba de producción de catalasa (+): La presencia de burbujas pone de manifiesto la presencia de catalasa.

Tinción de Gram (Cocos Gram positivos): Se observan cocos en racimos de color violeta intenso.

Metodología: a partir de la masa microbiana crecida en el medio de Agar DNAsa, se depositará una muestra con un asa de siembra sobre un portaobjetos en el que se ha puesto una gota de H₂O₂ de 10 vol. Se mezclarán ambos y se determinará la aparición de burbujas o no. La presencia de burbujas indica la positividad de la prueba. Del mismo modo, a partir de la misma masa microbiana, se tomará una muestra y se realizará una tinción de Gram. La presencia al microscopio de bacterias teñidas de violeta indicará que se trata de un microorganismo Gram positivo, mientras que el color rojo de las bacterias indicará que se trata de un microorganismo Gram negativo.

Conclusión: en función de los resultados obtenidos por las pruebas bioquímicas y morfológicas realizadas al microorganismo aislado a partir de una muestra de encéfalo (enc001/52.273.298) se puede concluir que se trata de una cepa de *Staphylococcus aureus*. Dicha cepa produce un exudado purulento que cubre toda la superficie encefálica invadiendo incluso las meninges. Así pues, la posible causa de fallecimiento del individuo pudiera ser una meningitis bacteriana producida por este microorganismo a falta de otras posibles pruebas patológicas a realizar.

- **Muestra 2 (pul001/50.694.927). Resultados**

Prueba de producción de catalasa (+): La presencia de burbujas pone de manifiesto la presencia de catalasa.

Tinción de Gram (Bacilos cortos Gram negativos): Se observan bacilos aislados de color rojo intenso.

Presencia de la enzima citocromo c oxidasa (+) aparición de color violeta sobre la tira de papel con reactivo.

Metodología: a partir de los microorganismos cultivados en el tubo conteniendo medio de cultivo TSA se depositará una muestra con un asa de siembra sobre un portaobjetos en el que se ha puesto una gota de H₂O₂ de 10 vol. Se mezclarán ambos y se determinará la aparición de burbujas o no. La presencia de burbujas indica la positividad de la prueba. Del mismo modo, a partir de la misma masa microbiana, se tomará una muestra y se realizará una

tinción de Gram. La presencia al microscopio de bacterias teñidas de violeta indicará que se trata de un microorganismo Gram positivo, mientras que el color rojo de las bacterias indicará que se trata de un microorganismo Gram negativo. Así mismo se determinará la presencia de citocromo C oxidasa en el microorganismo. Para tal fin, se tomará una muestra de microorganismos con un asa de siembra del tubo con medio de cultivo TSA y se depositará sobre una tira reactiva conteniendo el reactivo NNNN-tetrametilparafenilendiamina Si la bacteria posee citocromo *c*, al cabo de unos 30 segundos se observa una coloración azul oscuro, que con el tiempo se oscurece más.

Conclusión: en función de los resultados obtenidos por las pruebas bioquímicas y morfológicas realizadas al microorganismo aislado a partir de una muestra de pulmón (pul001/50.694.927) se puede concluir que se trata de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha cepa es la responsable de las manchas que aparecen sobre el tejido pulmonar y de la fibrosis quística observada. Así pues, la posible causa de fallecimiento del individuo pudiera ser un cuadro de infección respiratoria severo por *Pseudomonas aeruginosa* con fibrosis quística e insuficiencia respiratoria congestiva a falta de otras posibles pruebas patológicas a realizar.

- **Muestra 3 (hig001/25.296.618). Resultados**

Medio de cultivo de Kligler: Fermentación de lactosa (-) el fondo del tubo aparece amarillo y el bisel rojo.

Producción de SH₂ (+) presencia de precipitado negro de sales de hierro.

Medio de cultivo de Hektoen (+): colonias verdes con o sin centro negro. Al dar positivo esta prueba se toman muestras de los microorganismos crecidos sobre este medio y se utilizan para las pruebas siguientes.

Prueba de producción de catalasa (-): Ausencia de burbujas pone de manifiesto la inexistencia de catalasa.

Tinción de Gram (Bacilos cortos Gram negativos): Se observan bacilos aislados de color rojo intenso.

Presencia de la enzima citocromo *c* oxidasa (-): La tira conteniendo el reactivo no cambia de color. Por tanto el microorganismo carece de citocromo *c* oxidasa.

Metodología: a partir de los microorganismos cultivados la placa de petri conteniendo en medio de Hektoen se depositará una muestra con un asa de siembra sobre un portaobjetos en el que se ha puesto una gota de H₂O₂ de 10 vol. Se mezclarán ambos y se determinará la aparición de burbujas o no. La presencia de burbujas indica la positividad de la prueba. Del mismo modo, a partir de la misma masa microbiana, se tomará una muestra y se realizará una tinción de Gram. La presencia al microscopio de bacterias teñidas de violeta indicará que se trata de un microorganismo Gram positivo, mientras que el color rojo de las bacterias indicará que se trata de un microorganismo Gram negativo. Así mismo se determinará la presencia de citocromo C oxidasa en el

microorganismo. Para tal fin, se tomará una muestra de microorganismos con un asa de siembra del tubo con medio de cultivo TSA y se depositará sobre una tira reactiva conteniendo el reactivo NNNN-tetrametilparafenilendiamina Si la bacteria posee citocromo *c*, al cabo de unos 30 segundos se observa una coloración azul oscuro, que con el tiempo se oscurece más.

Conclusión: en función de los resultados obtenidos por las pruebas bioquímicas y morfológicas realizadas al microorganismo aislado a partir de una muestra de hígado (hig001/25.296.618) se puede concluir que se trata de una cepa de *Salmonella*. Dicha cepa es la responsable de los abscesos y de la necrosis hepática observada.

Así pues, la posible causa de fallecimiento del individuo pudiera ser un cuadro de infección hepática aguda con posterior fallo hepático severo producido por *Salmonella spp.* a falta de otras posibles pruebas patológicas a realizar.

ANEXO I MEDIOS DE CULTIVO

AGAR TRIPTICASA SOJA (TSA)

Es un medio general, también denominado agar nutritivo. Se trata de un medio complejo, que por elevado poder nutricional de sus componentes permite el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos que no precisen de requerimientos específicos.

AGAR GELATINA

Se trata de un medio de cultivo que emplea como base el agar tripticasa soja al que se le incorporan 10,0 g/l de gelatina. Este medio de cultivo se emplea para determinar la actividad proteolítica de los microorganismos. La presencia de proteolisis se determina cuando el medio ha sido incubado en presencia del microorganismo y se le incorpora el [reactivo de Frazier](#). Un halo transparente alrededor de las colonias indica que el microorganismo es proteolítico.

AGAR CETRIMIDA (medio selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*)

Es un medio selectivo para el aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. Se trata de una modificación del [medio de Brown y Lowry](#) para el aislamiento y diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa* en varios tipos de muestras. El uso de la cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) inhibe la microbiota acompañante y mimetiza la interferencia con el desarrollo de *Pseudomonas* y la producción de pigmento. La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* se visualiza mediante el crecimiento sobre el medio y la aparición de un pigmento verde fluorescente a la luz ultravioleta.

MEDIO DE GIOLITTI-CANTONI (caldo de enriquecimiento selectivo para *Staphylococcus*)

En el medio de cultivo, la tripteína, el extracto de carne y el extracto de levadura, constituyen la base nutritiva para el desarrollo de microorganismos. El piruvato de sodio y el manitol son estimulantes del desarrollo de estafilococos y ayudan a la detección de estos microorganismos presentes en la muestra, aún en pequeñas cantidades. El cloruro de litio inhibe el crecimiento de bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa, mientras que otras bacterias Gram positivas, son inhibidas por el telurito y la glicina. Cubriendo la superficie del medio inoculado con una capa de agar o parafina estéril, se evita el crecimiento de micrococcos.

MEDIO DE BAIRD-PARKER (Medio selectivo y diferencial para *Staphylococcus*)

En el medio de cultivo preparado y completo la peptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura aporta vitaminas

del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los estafilococos. Este medio de cultivo es selectivo y diferencial debido al **telurito de potasio** y al **cloruro de litio**, los cuales inhiben el desarrollo de la flora acompañante. La yema de huevo permite demostrar la actividad lecitínásica. Los estafilococos coagulasa positivo reducen el telurito a telurio y originan colonias de color grisáceo-negro, y dan reacción sobre la yema de huevo produciendo alrededor de la colonia una zona opaca que a menudo tiene una zona clara más externa. Se pueden encontrar cepas no lipolíticas, que presentan igual características de colonias pero sin la zona opaca y clara.

MEDIO PSIA (agar para el aislamiento de *Pseudomonas*)

Este medio de cultivo se emplea para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* y para la diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa* de otras pseudomonas según la formación de pigmentación. La bactopectona del medio proporciona el carbono y el nitrógeno necesarios para el crecimiento microbiano. El IRGASAN (Triclosan) es un agente antimicrobiano que inhibe selectivamente todas las bacterias Gram positivas y Gram negativas diferentes de *Pseudomonas spp.* Además de ser selectivo, el medio está formulado para favorecer la formación de piocianina por *P. aeruginosa* mediante la adición de cloruro magnésico y sulfato potásico. El glicerol del medio sirve como fuente de energía y además favorece la producción de piocianina.

AGAR DNAsa

Medio de cultivo utilizado para la detección de enzimas desoxirribonucleasas (DNAsas). En el medio de cultivo, la tripteína es la fuente de nitrógeno, aminoácidos, y aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El ácido desoxirribonucleico (ADN), se encuentra en grado altamente polimerizado, y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), la cual lo hidroliza. Este medio de cultivo, permite diferenciar bacterias que poseen la enzima desoxirribonucleasa de aquellas que no la poseen. La presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N. El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y torna opacidad al medio de cultivo.

RAPPAPORT-VASSILIADIS

Es un medio (caldo) de enriquecimiento selectivo para *Salmonella*. El medio incorpora cloruro de magnesio y oxalato de verde malaquita. El cloruro magnésico eleva la presión osmótica y el verde malaquita inhibe a los microorganismos distintos a *Salmonella*. El pH bajo del medio ($5,1 \pm 0,2$), en combinación con los productos anteriormente descritos crea las condiciones de máxima selectividad para el aislamiento de *Salmonella*.

AGAR KLIGLER

En el medio de cultivo, la peptona de carne y la tripteína, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa (10X) y la glucosa (1X) son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador de pH rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Resultados posibles:

1. Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
2. Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa y lactosa.
3. La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
4. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

AGAR HEKTOEN

Este es un medio ideal para el aislamiento selectivo de *Salmonella* y *Shigella* sp. El medio de cultivo contiene sales biliares que inhiben el desarrollo de la flora acompañante, y 2 sistemas indicadores: (i) azul de bromotimol y fucsina ácida como indicadores de la fermentación de carbohidratos, y (ii) el citrato de hierro como un indicador de la formación de SH_2 a partir del tiosulfato. El medio de cultivo, permite una buena diferenciación de las colonias e inhibe el desarrollo de algunos coliformes y otras bacterias no fermentadoras de lactosa, facilitando así la identificación de *Salmonella* y *Shigella* a partir de la muestra.

No fermentadores de lactosa: colonias verdes

Fermentadores de lactosa: colonias Naranja-Salmón

Productores de SH_2 : Color Negro

Microorganismos	Colonias
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Verdes, elevadas, húmedas
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Verde-azuladas, con o sin centro negro
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Verde-azuladas, con o sin centro negro
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Color salmón rodeadas en algunas ocasiones por un precipitado biliar
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Color salmón rodeadas en algunas ocasiones por un precipitado biliar

ANEXO II TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

TINCIÓN DE GRAM

Finalidad. Observar la morfología y clasificar a las bacterias en uno de los dos grupos, Gram positivas o Gram negativas, en función de la composición de su pared celular (Fig. 9).

Fundamento. La tinción Gram requiere cuatro pasos con la utilización de cuatro soluciones. Un primer colorante básico que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ella coloreándolas (cristal violeta). Una solución mordiente que aumenta la afinidad entre el colorante y las células (lugol). Un agente decolorante o diferencial (alcohol) que decolorará a las bacterias Gram negativas debido a la composición de su pared celular. Un colorante de contraste de distinto color que el primero (safranina) que teñirá a las bacterias Gram negativas.

Procedimiento

- A. Hacer el frotis (Fig. 8)
- B. Cubrir con cristal violeta. Dejar actuar 2 minutos. Lavar.
- C. Añadir lugol. Dejar actuar 1 minuto. Lavar.
- D. Colocando el porta en posición inclinada añadir alcohol hasta decoloración. Máximo 30". Lavar.
- E. Añadir safranina. Dejar actuar 1 minuto. Lavar.
- F. Secar al aire y observar con objetivo de inmersión.

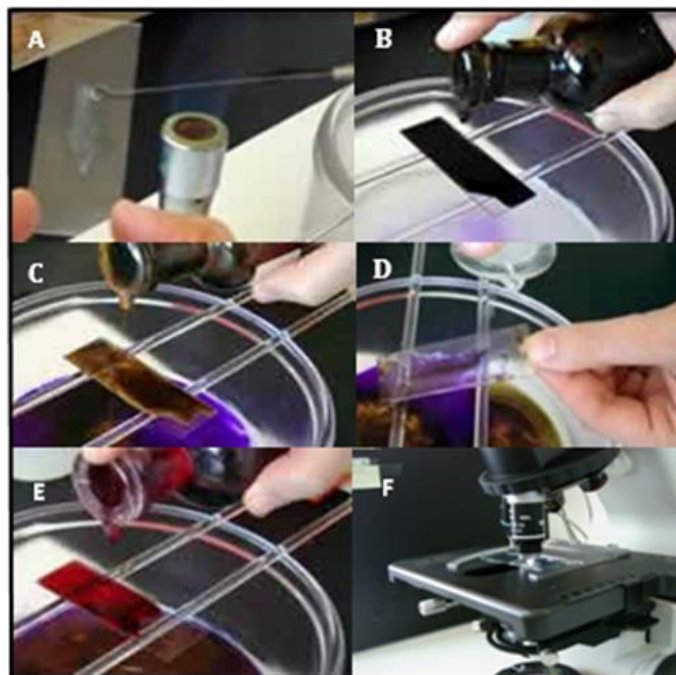


Figura 8. Preparación de un frotis microbiano y su tinción de gram correspondiente. A. frotis. B. Tinción con cristal violeta. C. Utilización de lugol. D. Decoloración con alcohol. E. Tinción con safranina. F. Observación al microscopio.

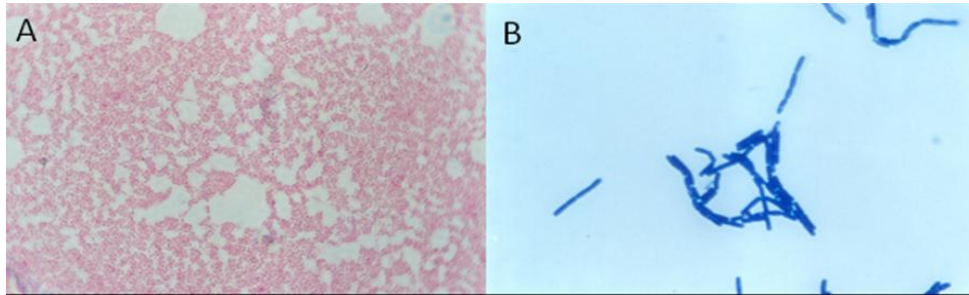


Figura 9. Tinción de bacterias A gram negativas y B gram positivas.

PRESENCIA DE CATALASA

La catalasa es una enzima generalmente presente en muchos microorganismos aerobios. La catalasa produce la descomposición del agua oxigenada, dando lugar a la formación de oxígeno naciente: $2\text{H}_2\text{O}_2 \text{-----} > 2 \text{H}_2\text{O} + \text{Burbujas de O}_2$.

Fundamento. En los ambientes acuosos, que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células, aparecen formas tóxicas derivadas del oxígeno. Las bacterias que viven en ambientes aerobios necesitan un equipo enzimático capaz de neutralizar estas formas tóxicas. Entre estas enzimas se encuentra la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Esta prueba se emplea, entre otras, para diferenciar el género *Streptococcus* (catalasa negativo) del género *Staphylococcus* (catalasa positivo).

Procedimiento. Se toma un inóculo abundante de un medio sólido y se pone en un porta. Se le añade una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes, observando como resultado positivo la producción de burbujas (Fig. 10).



Figura 10. Prueba de la catalasa.

PRESENCIA DE CITOCROMO C OXIDASA

Esta prueba pone de manifiesto la presencia del citocromo c en las bacterias que lo poseen en sus cadenas respiratorias.

Fundamento. Los citocromos son proteínas que forman parte de algunas cadenas transportadoras de electrones, propias del metabolismo respiratorio. Determinar la presencia o ausencia de estas proteínas proporcionará información útil para la clasificación de grupos bacterianos. La prueba de la citocromo *c* oxidasa detecta la presencia de citocromo *c* en la bacteria. Se basa en la capacidad del colorante tetrametil-p-fenilendiamonio de oxidarse al ceder electrones al citocromo *c*. Este colorante es incoloro en estado reducido y puede oxidarse rápidamente en presencia de citocromo *c*, produciendo un color azul (Fig. 11 y 12). Esta prueba permite diferenciar a *Enterobacteriaceae* (sin citocromo *c*; oxidasa negativo) del género *Pseudomonas* (que posee citocromo *c*; oxidasa positivo).

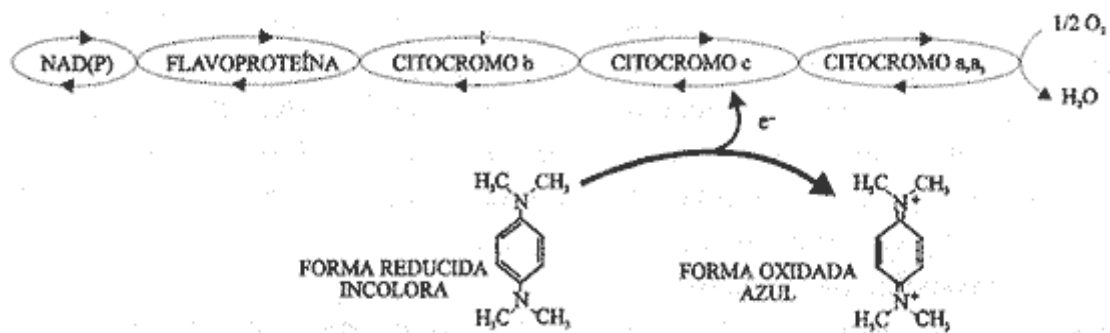


Figura 11. Cadena de transporte electrónico y su detección mediante el reactivo de las tiras comerciales para la detección de la presencia de citocromo *c* oxidasa.

Procedimiento. Se toma un inóculo abundante de un medio sólido y se extiende sobre una tira de papel especial impregnada con el reactivo NNNN-tetrametilparafenilendiamina. Si la bacteria posee citocromo *c*, al cabo de unos 30 segundos se observa una coloración azul oscuro, que con el tiempo se oscurece más.



Figura 12. Detección de la presencia de citocromo *c* oxidasa mediante tiras comerciales.

BIBLIOGRAFIA

- Barnaby, W. (2002). Fabricantes de epidemias: El mundo secreto de la guerra biológica. Siglo XXI de España. Madrid.
- Breeze, R. G.; Budowle, B. y Schutzer, S. E. (2005) Microbial forensics. London. Elsevier Academic Press.
- Campobasso, C. P.; Marchetti, D. y Introna, F. (2004) Postmortem artifacts made by ants and the effects of ant activity on decomposition rates. Proceedings of the 2nd Meeting of the European Association for Forensic Entomology. 29-30. London.
- Carter, D. O. y Tibbett, M. (2003) Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. Journal of Forensic Sciences. 48: 168-171.
- Dent, B. B., Forbes, S. L. y Stuard, B. H. (2004) Review of human decomposition processes in soil. Environmental Geology 45: 576-585.
- Money, N. P. (2004) Carpet monsters and killer Spores: A Natural History of Toxic mold. Oxford: Oxford University Press.
- Pearson. G. (1995) Chemical and Biological defense: An Essential National Security Requirement. RUSI Journal 140: 4-24.
- Stoermer, E. F. y Smol, J. P. (2001) The Diatoms: Applications for the Earth and Environmental Sciences: Cambridge: Cambridge University Press.
- Thuesen, I. Engberg, J. y Nielson, H. (1995) Ancient DNA from a very cold and a very hot place. In Proceedings of the first World Congress on Mummy Studies, February, 1992 Vol 1, pp 41-57 Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands: Archaeological and Ethnological Museum of Tenerife.
- Tucker, J. (1992) The Future of Biological Warfare. In W Thomas Wander and Erick Arnett (comps). The proliferation of Advanced Weaponry, American Association for the Advancement of Science. pg 61.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

Tornados attack aircraft "built to spray anthrax". The Guardian, 19 de diciembre de 1998.

Recibido: Recibido: 10 febrero 2012.

Aceptado: 1 octubre 2012.