

00524
160



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

ADAPTACION DE UN METODO MINIATURIZADO PARA
IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS Y PSEUDOMONAS PARA SU
USO EN DOCENCIA E INVESTIGACION

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE ROJO ALATORRE



MEXICO, D. F.

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: María Del Carmen Cortes Decuir
Vocal: María Guadalupe Tsuzuki Reyes
Secretario: Luciano Hernández Gómez
1er. Suplente: Maite Astigarraga Zavaleta
2do. Suplente: María del Carmen Urzua Hernández

Sitio donde se desarrollo el tema:
Cepario de la Facultad de Química
Laboratorio 1-C Edificio. A
Bibliotecas de la Facultad de Química.



Biol. Luciano Hernández Gómez
Asesor del tema.



Q.F.B María Antonieta Silva Chávez.
Supervisor técnico.



María Guadalupe Rojo Alatorre
Sustentante.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Agradecimientos.

Gracias: es una palabra corta, pero de gran importancia y significado, es una forma de expresar el sentir de las personas para con sus sentimientos y así de esta manera:

Gracias a la que fue mi segundo hogar, que me abrió sus puertas y me abrigó por varios años a la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a sus profesores que me dieron sus conocimientos, experiencias, para transformarme en una mejor profesionista y con ética.

Agradezco el apoyo y la confianza que me brindaron mis padres, hermanos, amigos y especialmente a mi esposo, que todos y cada uno de ellos han compartido conmigo alegrías, tristezas, fracasos y el apoyo incondicional.

Agradezco la ayuda, el apoyo, y la enseñanza que me han brindado mis asesores y profesores de la Facultad de Química para poder realizar esta tesis.

Dedicatorias.

A DIOS nuestro señor por que me dio la vida, por que con él, con su compañía, paciencia, y su constante ayuda como padre, hermano y amigo, por darme su sonrisa y gran amor, por guiar mis pasos y levantarme en los tropiezos, por que me ha levantado con su mano y su palabra y que me permites seguir ¡ Muchas Gracias Jesús Mío!

A mis padres: Angel Rojo Amezola y Soledad Alatorre Ascencio, ya que a través de su unión me dieron la vida, que siempre estuvieron a mi lado en momentos de alegría y angustias, que hicieron un gran esfuerzo para que yo llegará a este nivel, y espero que Dios se los recompense, y que yo no los defraude. Los quiero mucho y estoy muy orgullosa de tener a unos padres como ustedes.

A mi esposo Jorge Arroyo Mejía, por ser el hombre que me ha dado la dicha de conocer el amor, la comprensión, por iluminar mi vida, darme su apoyo y su confianza, por ser un tipo que no vale ni un quinto, si no muchos millones de quintos, o es más no tiene precio, ya que es sensacional. Gracias Amor.

A mis hermanos Joaquín, Yolanda, Magdalena, Juan y Elvira, por estar siempre conmigo, por que juntos hemos salido adelante, compartido alegrías, pleitos, enojos, confidencias, cariño y compañía. Gracias Hermanos.

A mis profesores Luciano, Antonieta y todos los compañeros del Cepario que me brindaron hospitalidad, enseñanza y amistad. Gracias por aguantarme.

A todos mis amigos Guadalupe Trejo, Roxana, Sandy, Nelly, Salvador, los cómicos, aunque no mencione más nombres, todos ustedes saben que son parte de mi mundo y que sus palabras de aliento y compañía, hemos salido adelante. Gracias amigos.

GRACIAS POR SU AYUDA Y CONFIAR EN MÍ.

ABREVIATURAS

Abreviaturas.

En este trabajo se haga referencia a las siguientes abreviaturas se entiende por :

MIMITEC **Método miniaturizado o micrométodo**

CDC	Centers for Disease Control
ARA	Arabinosa
DUL	Dulcitol
GLU	Glucosa
INO	Inocitol
MAN	Manitol
MEL	Melibiosa
RAM	Ramnosa
SAL	Salicina
SAC	Sacarosa
SOR	Sorbitol
MAL	Maltosa
RAF	Rafnosa
TRE	Trhealosa
ADO	Adonitol
LAC	Lactosa
XIL	Xilosa
MALO	Malonato
CIT	Citrato
OF	Oxido fermentativo
URE	Urea
IND	Indol
NO ₃	Nitratos
H ₂ S	Acido sulfhídrico

V-P	Voges Proskaver
ONPG	Orto-nitrofenil- β -D-galactósido
FDA	Fenilalanina desaminasa
ADH	Arginina deshidrogenasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
S.S.E	Solución salina estéril a pH 7,0.
N.D	No definido.
CTA	Cistina Tripticasa Agar
ONP	Orto-nitrofenol
EIA	Electroinmuno Absorción
PCR	Reacción en cadena de la polímerasa
ARNr 16s	Acido Ribonucleico Ribosomal 16S
ADN	Acido Desoxirribonucleico

INDICE

- 1. Introducción**
 - 1.1 Generalidades**
 - 1.2 Importancia de la identificación bacteriana para la salud, industria y medio ambiente. Así como la importancia de las Enterobacterias y Pseudomonas.**
 - 1.3 Enterobacterias.**
 - 1.4 Pseudomonas .**
 - 1.5 Métodos para la identificación de bacterias.**
 - 1.5.1 Pruebas bioquímicas (biotipificación) y fundamentos de las pruebas**
 - 1.5.2 Serotipificación**
 - 1.5.3 Técnicas de biología molecular**
 - 1.5.4 Cromatografía**
 - 1.6 Sistemas comerciales de identificación**
 - 1.6.1 BBL: Enterotubell (Becton-Dickson)**
 - 1.6.2 OXI/FERM tube II**
 - 1.6.3 Sistema de Eterobacteriaceae API 20e**
 - 1.6.4 Enteroset 20**
 - 1.6.5 Sistema minitek**
 - 1.6.6 Sistema Micro-ID (General Diagnosti Division)**
 - 1.6.7 Micro-Media Eteric System.**
 - 1.6.8 Sistema API Rapid 20E (RE)**
 - 1.6.9 Sistema ID BBL Cristal Enterico/No fermentador**
 - 1.6.10 Sistema Rapid One**
 - 1.6.11 Microplacas Biolog GN**
 - 1.6.12 Sistema MicroScan**
 - 1.6.13 Sistema Sceptor**
 - 1.6.14 Sistema Sensititre**
 - 1.7 Otros métodos.**

2. Justificación
3. Objetivos
4. Equipo, material y reactivos
5. Metodología
 - 5.1 Pruebas convencionales
 - 5.2 Preparación de sustratos del método miniaturizado MIMITEC
 - 5.3 Control de calidad de sustratos
 - 5.4 Preparación de Cepas Bacterianas
 - 5.5 Preparación de las placas del método miniaturizado MIMITEC e inoculación
 - 5.6 Lectura de resultados
 - 5.7 Prueba del Micrométodo con un grupo de Bacteriología
6. Resultados
 - 6.1 Resultados de pruebas bioquímicas
 - 6.2 Determinación de sensibilidad, especificidad y exactitud
 - 6.3 Determinación de reproducibilidad en el grupo de bacteriología
7. Discusión de Resultados
8. Conclusiones
9. Referencias bibliográficas
10. Anexos
 - Anexo 1. "Elaboración de medios bioquímicos."
 - Anexo 2. "Elaboración de reactivos reveladores".
 - Anexo 3. "Figuras"
 - 10.3.1 Figura 1. Medios Estériles
 - 10.3.2 Figura 2. Llenado de medios por duplicado
 - 10.3.3 Figura 3. Llenado de medio, dividiendo la placa.
 - 10.3.4 Figura 4. Liofilizadora y aditamentos
 - 10.3.5 Figura 5-A. Llenado de medios por triplicado
 - 10.3.6 Figura 5-B. Llenado de microplaca
 - 10.3.7 Figura 6. Liofilizadora
 - 10.3.8 Figura 7-A y 7-B

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Antony Van Leewenhoek, estableció la diferenciación bacteriana en tres órdenes de acuerdo a su morfología; cocos, bacilos y espirilos, y durante muchos años la morfología fue la base de la identificación microbiana.

Los primeros sistemas de clasificación agruparon a los microorganismos basándose únicamente en la similitud de la apariencia morfológica, más tarde, las propiedades fisiológicas dominaron la forma de clasificación microbiana. Actualmente los sistemas de clasificación todavía incluyen características morfológicas y fisiológicas, pero los métodos taxonómicos modernos, hacen mucho énfasis sobre las similitudes a nivel molecular (relaciones genéticas); es decir, los sistemas de clasificación genéticos (determinan similitudes). (7)

La clasificación de los microorganismos debería seguir el orden natural establecido por el proceso evolutivo, y así mostrar, sistemas de clasificación filogenéticas que determinen relaciones evolutivas verdaderas. Sin embargo las afinidades evolutivas entre los microorganismos son difíciles de discernir porque no existen registros fósiles de la mayoría de los microorganismos, lo que hace imposible examinar los restos de microorganismos ancestrales. En consecuencia la taxonomía microbiana por lo general requiere muchas decisiones subjetivas, dando como resultado esquemas artificiales de sistemas de clasificación. (7)

La Sistemática se encarga del estudio de los organismos, en cuanto a su diversidad e interrelaciones, con el propósito de organizarlos en forma ordenada. Siendo una de sus subdivisiones la Taxonomía, que se basa en procedimientos establecidos y reglas para describir los grupos de microorganismos, sus interrelaciones y los límites entre los grupos microbianos; es decir, se ocupa de la clasificación (ordenamiento de organismos en grupos basándose en sus

relaciones), la nomenclatura (asignación de nombres a las unidades descritas en un sistema de clasificación) e identificación (aplicación de los sistemas de clasificación y nomenclatura para asignar el nombre de los organismos desconocidos y colocarlos en un lugar dentro del sistema de clasificación). (7)

Al clasificar a los microorganismos se utiliza una jerarquía consistente en distintos niveles de organización. Los niveles usuales de la jerarquía taxonómica, del más alto al más bajo son: reinos, filas, clases, órdenes, familias, géneros y especies. Aún cuando las especies son las unidades taxonómicas (taxa o taxón) básicas, la variabilidad genética de los microorganismos admite futuras divisiones en subespecies o tipos.(4)

Existen varias formas de hacer la clasificación bacteriana según el grupo de microorganismos a estudiar y las facilidades de las que se disponga: La primera se denomina Taxonomía Clásica, en la cual se determina la variedad de características de los diferentes microorganismos y estos rasgos se emplean después en la separación por grupos. Un grupo que tiene la mayoría de las características en común será clasificado en especies únicas y las especies afines se clasifican en el mismo género. Las características de valor taxonómico son: morfología, afinidad a los colorantes (Gram, Ziehl Neelsen, etc), pigmentos, requerimientos nutricionales, capacidad para emplear varias fuentes de carbono, nitrógeno y azufre, productos de fermentación, requerimientos y tolerancia de temperatura y pH, sensibilidad a los antibióticos, patogenicidad, relaciones simbióticas, características inmunológicas y hábitat. (7,22,23)

La segunda es denominada Taxonomía Numérica que se asemeja al enfoque clásico, la diferencia radica en que todas las características tienen el mismo valor, para su análisis se requiere de una computadora para comparar las diferencias entre los microorganismos, a fin de encontrar semejanzas. Las similitudes entre dos o más microorganismos se representan por medio de uno o dos coeficientes,

aunque ambos coeficientes comparan el número de características idénticas de el total de diferencias y semejanzas observadas en los microorganismos, se puede usar uno u otro según convenga al investigador. Los coeficientes son: coeficiente de parentesco (es el porcentaje de características que son comunes a dos microorganismos) y el coeficiente de similitud (determina el porcentaje de características que están presentes en ambos microorganismos y no se consideran las características ausentes). Cuando se comparan varios microorganismos con muchas características, se usa una matriz diagramática conocida como dendrograma y así, se pueden ilustrar los niveles de similitud, además la taxonomía numérica elimina las vías comunes para otros métodos taxonómicos y provee una comparación objetiva entre ellos. (7,22,23)

La tercera y quizá la aproximación fundamental, es la Taxonomía Genética o Molecular, que pretende descubrir el grado de relación genética de los diferentes microorganismos; las clasificaciones en grupos se hace de acuerdo a las secuencias de nucleótidos cromosómicos observadas en estudios de hibridación de ADN. Si bien la taxonomía basada en genotipos puede servir como la referencia final para la clasificación de todos los microorganismos, actualmente no se usan técnicas de hibridación en los laboratorios de microbiología diagnóstica. (7,22,23)

Dado que las expresiones fenotípicas de los microorganismos desde un punto de vista teórico reflejan determinantes genéticos; las clasificaciones basadas en la morfología y reacciones bioquímicas de las bacterias en gran medida deben ser paralelas a las derivadas de estudios genéticos. Cuando se producen discrepancias significativas, las clasificaciones genéticas deben tener precedencia porque reflejan mejor las relaciones naturales. (7,22,23)

1.2 Importancia de la identificación bacteriana para la salud, industria y medio ambiente. Así como la importancia de las Enterobacterias y Pseudomonas.

La importancia de la identificación bacteriana en los centros de salud, es debida a la frecuencia de las enfermedades infecciosas cuyo agente etiológico es de tipo bacteriano. La familia *Enterobacteriaceae* es responsable del 30 al 35 % de las septicemias, 70 % de las infecciones del tracto urinario, infecciones en meninges, pulmonares e intestinales. (5,7,8) La familia *Pseudomonadaceae* esta asociada a estas enfermedades, además de la fibrosis quística, e infecciones en pacientes inmuno suprimidos e inmuno comprometidos. (6,9)

Así la tarea preventiva y curativa de las enfermedades infecciosas, abarca aspectos que van desde la identificación hasta la completa erradicación del agente infeccioso ó contaminante mediante el tratamiento antimicrobiano.

La importancia de la identificación bacteriana en la industria farmacéutica y alimentaria, es muy grande. Dentro de la industria farmacéutica se tiene en cuenta que el medicamento que se produce esta destinado a la población pediátrica, adulta y senil, y es una gran responsabilidad asegurar que el medicamento no presente contaminación microbiana y que realmente este destinado para ofrecer el efecto terapéutico a la población. Los tres microorganismos objetables en productos farmacéuticos no estériles y estériles son *E. coli*, *Salmonella sp* y *P. aeruginosa*, , aunque en los productos estériles todos los microorganismos son objetables.

En la industria alimentaria también se monitorea la ausencia de estos microorganismos, entre otros; ya que si no fuera así indicaría contaminación bacteriana que afecta la salud de la población y podría provocar un problema muy grave de salud, económico y de prestigio para esa industria. El control

microbiológico es un factor determinante en la industria alimentaria, tanto en procesos de calidad, elaboración, transporte, almacenamiento, etc. (26)

La identificación bacteriana en salud pública tiene su importancia, porque las bacterias que mayormente se han aislado en los laboratorios clínicos forman parte de la microflora intestinal, (con excepción de los géneros *Salmonella* y *Shigella*), lo que indica una contaminación fecal del medio ambiente. Debido a ésto se comprende su amplia distribución en aire, suelo y agua, principalmente en las zonas geográficas de bajo nivel cultural, por la práctica de fecalismo al aire libre o el uso de fosas sépticas, escasez de agua potable y la falta de higiene personal y en la preparación de alimentos.

La identificación bacteriana es importante porque:

- Sin ella no es posible precisar el agente etiológico de una enfermedad infecciosa.
- Ayuda a identificar los problemas de contaminación en productos alimenticios y farmacéuticos.
- Permite posteriormente, tomar las medidas necesarias para erradicar al microorganismo infeccioso ó contaminante.

Las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* se consideraban poco virulentas o completamente no patógenas, incluso miembros de la flora humana normal y saprófitos , éstas se han asociado con mayor frecuencias a enfermedades nosocomiales (infecciones en heridas quirúrgicas, neumonías adquiridas en hospitales, etc.), gastrointestinales, infecciones del tracto urinario entre otras, en los países desarrollados y subdesarrollados. (21)

Las enterobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en vegetales, tierra, agua y en los intestinos de los humanos y animales, normalmente no son patógenos y algunas especies ocupan nichos ecológicos limitados, la *Salmonella*

typhi causa fiebre tifoidea solamente a humanos, en contraste con la *Klebsiella pneumoniae* que está distribuida generalmente en el desarrollo y contribución de procesos bioquímicos y geoquímicos. Sin embargo a el humano debido a las tensiones de trabajo le puede causar infecciones, empezando por una colonización asintomática en el tracto respiratorio, intestinal, y urinario, puede ser fatal al producir neumonía, septicemia y meningitis. También las enterobacterias pueden ser causantes de contaminación de alimentos y de medicamentos. (13)

Las pseudomonas se encuentran distribuidas en el agua, tierra y vegetales es la principal causan de enfermedades intrahospitalarias por que es un microorganismo oportunista que infecta a los pacientes que se encuentran inmuno suprimidas, Dentro de hospitales se pueden encontrar en soluciones acuosa de los desinfectantes, ungüentos, jabones, fluidos de irrigación, secreción lagrimal, fluidos de diálisis y en equipos, de esta manera originando enfermedades a los pacientes.. (25)

1.3 Enterobacterias

Las Enterobacterias son bacilos Gram negativos, de $0.3 - 1.0 \times 1.0 - 6.0 \mu\text{m}$, usualmente móviles (con flagelos peritricos), inmóviles, no forman esporas, son anaerobios facultativos, y de modo habitual, las Enterobacterias tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa, reducen nitratos a nitritos, catalasa positiva y oxidasa negativa, se observa crecimiento tras 18 a 24 horas de incubación en una amplia variedad de medios. (6,11,15)

Según Murray en 1999, describe por lo menos 30 géneros y 132 especies. Los géneros se han clasificado sobre la base de homología del ADN, propiedades bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a bacteriófagos específicos de género y de especie, y patrones de susceptibilidad a los antibióticos. (1,2,15,22)

La familia está compuesta por un grupo grande y diverso de microorganismos con diferente estructura antigénica y propiedades bioquímicas. La complejidad antigénica de estas bacterias llevó al desarrollo de esquemas serotípicos, elaborados según el esquema de Kauff-Mann-White para *Salmonella*, en el cual se mencionan serotipos como es el antígeno somático O, antígeno flagelar H, antígeno capsular o virulento Vi, así también hay otras especies que tienen complejidad antigénica como *Escherichia coli* con sus serotipos que produce cepas enterotoxigénicas (4,7,75 del antígeno O, O78:H12, etc). Así como para *Proteus*, *Shigella*, que también tiene serotipos. (5,9,22)

1.4 Pseudomonas

Las pseudomonas son bacilos Gram negativos, de 0.5 – 1.0 x 1.5 – 5.0 µm, aerobias estrictas, oxidasa positivas, catalasa positivas, usualmente móviles (tienen flagelos polares), no forman esporas, no fermentan carbohidratos, en general producen pigmento hidrosoluble (*Pseudomonas aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*), reducen nitratos a nitritos, oxidan glucosa y se observa crecimiento tras 18 a 24 horas de incubación en una variedad de medios. (4,13,16)

Tienen amplia distribución en hábitats húmedos, aire, suelo, plantas, frutas, vegetales. La producción de pigmentos es una de las características que agilizan el diagnóstico diferencial de *Pseudomonas*, pero es fundamental la elección correcta del medio de cultivo más adecuado para favorecer la pigmentación de ciertas especies e inhibir esta característica en otras. Se han estudiado algunos aspectos metabólicos en relación con la cromogénesis, como la influencia de los compuestos inorgánicos, y la temperatura ambiente sobre la producción de pigmentos fluorescentes en estas bacterias. (9,15)

La especie de *Pseudomonas aeruginosa* es citocromo oxidasa positiva, no fermenta carbohidratos, su olor es similar al de las tortillas húmedas y sintetiza dos pigmentos hidrosolubles: la fluoresceína, que sólo puede observarse en el medio cuando se hace incidir luz ultravioleta sobre él, y la piocianina, que es de color azul verdoso. (16)

1.5 Métodos para la identificación de bacterias.

1.5.1 Pruebas bioquímicas (biotipificación) y fundamento de estas pruebas.

La tipificación es el uso de pruebas bioquímicas para caracterizar e identificar a las bacterias hasta especie, lo que da un biotipo, utilizando sustratos o poniendo de manifiesto la presencia de productos metabólicos específicos.

La identificación microbiana se da en dos pasos:

1º. Pruebas primarias: con las cuales se puede determinar la familia, o incluso el género a la que pertenece un microorganismo aislado. Las pruebas primarias involucran tinción de Gram, morfología, prueba de la catalasa, reacción de oxidasa, y prueba óxido fermentación de la glucosa, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad, reducción de nitratos. (23)

2º. Realización de pruebas secundarias y terciarias a efectos de determinar la especie. Estas dependerán de familia o género determinado (ej: producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptofano, producción de coagulasa, de fenilalanina desaminasa, etc.). (23)

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, a continuación se enumerarán las más utilizadas.

Oxidasa:

Está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que actúa en la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. (14)

Catalasa.

Es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos, si se acumula es letal para las células bacterianas. (7)

Gluconato

Determina la capacidad de un organismo de oxidar el ácido glucónico, su única fuente de carbono, en los compuestos reductores es el 2-cetogluconato. (14)

Bilis esculina

Determina la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa en presencia de bilis.

Utilización de carbohidratos

La utilización de carbohidratos por los microorganismos se puede dar por dos vías, la fermentativa y la oxidativa. La fermentativa se lleva a cabo en

condiciones de anaerobiosis y la oxidativa en condiciones de aerobiosis. (14). La fermentación de carbohidratos: determina la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado al medio básico, produciendo ácido y gas. (7)

Algunos ensayos combinados:

Pruebas con el Medio de Kligler (AHK)

Se determina la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (H_2S). (14)

El Agar Hierro de Kligler (AHK) sirve para determinar las fermentaciones de los hidratos de carbono, y la producción de ácido sulfhídrico. Un microorganismo puede utilizar diversos sustratos incorporados en el medio; los diferentes sustratos metabolizados son utilizados para la diferenciación entre varios grupos, géneros o especies, sobre todo entre las Enterobacterias.

Este medio contiene dos hidratos de carbono: lactosa y glucosa, que algunos microorganismos tienen la capacidad de fermentar ambos sustratos, otros solamente fermentan la glucosa y otros no son capaces de fermentar ni la lactosa ni la glucosa. Esta fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de la flauta) y anaeróbicamente (en la capa inferior del cultivo).

Para observar la fermentación de la glucosa solamente (alcalina/ácida) después de haber incubado 18 a 24 horas en el pico de flauta es alcalino (rojo) lo que indica que se ha producido la degradación aeróbica de la glucosa que ha sido consumida por completo y el organismo comienza a utilizar las pectonas que se encuentran en el medio para obtener los nutrientes para su crecimiento, el catabolismo de las pectonas que produce liberación de

amoníaco dando un pH alcalino con el rojo de fenol (indicador incorporado al medio); y en la capa profunda del tubo es ácida (alcalina/ácida) se observa un color amarillo debido a la degradación anaeróbica de la glucosa. Aquí, la glucosa también es degradada después de 18 a 24 horas de incubación; sin embargo, se forman productos terminales ácidos dando un pH ácido (color amarillo). (14)

Cuando los microorganismos tienen la facultad de fermentar ambos hidratos de carbono en el medio se observa una producción ácida/ácida dando color amarillo tanto en el pico de flauta y en la capa profunda, después de haber incubado 18 a 24 horas. Pero cuando el microorganismo no fermenta ni la lactosa ni la glucosa, ya que utilizan las peptonas para obtener sus nutrientes. Pueden utilizar la peptona aeróbica que el pico de flauta se encuentra de color rojo intenso debido a la producción de amoníaco y la parte profunda del medio no hubo cambio (alcalina/sin cambio), pero también puede utilizar la peptona de manera anaeróbica o aeróbica donde el pico de flauta es alcalino (rojo) y la capa profunda alcalina (rojo). (14)

TSI (Triple Azúcar Hierro)

Determina la capacidad de un organismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico. Es un medio sumamente útil para la identificación de microorganismos entéricos Gram negativos por medio de su capacidad para fermentar dextrosa, lactosa y sacarosa y de liberar sulfuros. En caso de un microorganismo que fermenta dextrosa únicamente, la pequeña cantidad de ácido producida por la utilización de dextrosa (visible como un plano inclinado amarillo en las primeras horas de incubación) se oxida en condiciones aerobias en dicho plano, que luego vuelve al estado alcalino (rojo). En el fondo, en condiciones anaerobias, la reacción no se invierte y se mantiene el estado

ácido (amarillo). Los microorganismos que producen H_2S muestran ennegrecimiento del agar. Los microorganismos que fermentan la lactosa y/o sacarosa muestran plano y fondo ácidos. La formación de gas se muestran por burbujas en el fondo; aveces el medio se divide. (21)

LIA (Agar Hierro Lisina)

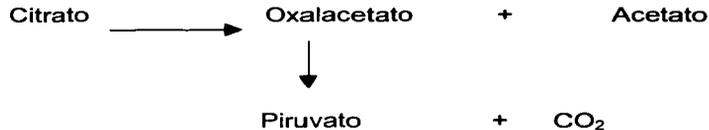
Permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de ácido sulfhídrico y es más sensible que TSI para la detección de H_2S . (21)

Las siguientes pruebas también son muy utilizadas y sus fundamentos bioquímicos se indican más profundamente porque se utilizaron para la adaptación del micrométodo.

Utilización de Citrato.

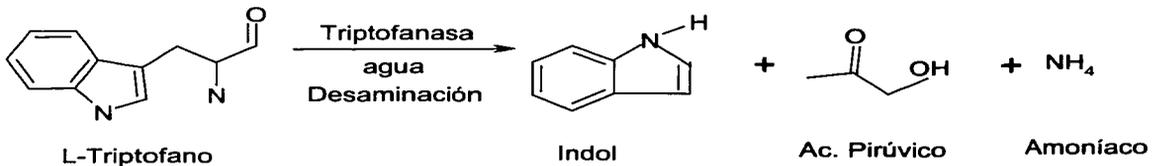
Determina la capacidad de un microorganismo para utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para metabolismo y desarrollo. El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs). Es una prueba útil en la identificación de Enterobacterias y se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y/o la alcalinización del medio, observándose un color azul en el medio tras la incubación de 18 a 24 horas debido a que hubo la formación de productos alcalinos y se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira a alcalino a un pH 7.6 . El medio incluye citrato de sodio, un anión, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con la producción de amoníaco y así alcalinizando el medio. Esta prueba es positiva cuando se observa crecimiento a

lo largo de la estría acompañado de un vire del indicador al azul o solamente crecimiento del microorganismo, esto es posible debido a que para que el desarrollo del microorganismo sea visible, debe encontrarse en la fase logarítmica, la cual es factible sólo si el carbono y el nitrógeno han sido asimilados. (11,14,23)



Producción del Indol.

El Indol es uno de los productos de degradación metabólica del triptofano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción del indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos. La reacción positiva de esta prueba está basada en la formación de un complejo rojo cuando el Indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovacs y Ehrlich y el medio utilizado debe ser rico en triptofano. (11,23)

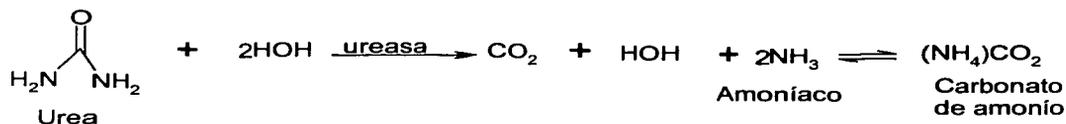


Reacción de la Ureasa.

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida. La hidrólisis de la urea es catalizada por la enzima

ureasa la cual es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. La ureasa es considerada una enzima constitutiva dado que es sintetizada por ciertas bacterias sin tener en cuenta la presencia o ausencia de su sustrato.

Esta prueba determina la capacidad de un organismo de hidrolizar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Dicha acción se puede detectar por el vire del indicador rojo de fenol hacia un color rojo rosado, que indica la alcalinización del medio por la presencia del amoníaco.(4)



Rojo de Metilo

La prueba del rojo de metilo se basa en el empleo de un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno presentes cuando un microorganismo fermenta la glucosa. Los productos que se originan de la fermentación de la glucosa, se da por dos vías la ácido mixta (se forman ácido lactico, succínico, acético) y la vía de butanodiol (se forma butanodiol, etanol, CO₂, H₂ y en menor cantidad succinato, acetato). El rojo de metilo es un indicador de pH que se utiliza para visualizar la producción de ácido por la vía de fermentación ácido mixta. (1, 3)

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4,4 y es una prueba positiva. (3)

Voges-Proskauer.

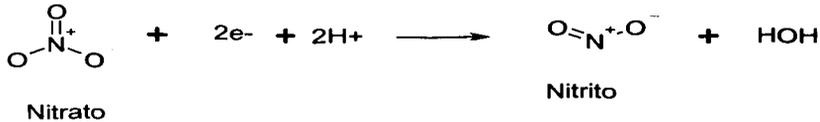
En esta prueba se determina la vía de fermentación del butanodiol. El acetil-metil-carbinol (acetoína) es el producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo y este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo-fiusha después de 15 minutos indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína y por tanto una prueba positiva. (7,14).

Reducción de Nitratos:

La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) y en gas nitrógeno (N_2), tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo realiza su respiración con el nitrato, el que sirve como aceptor de electrones. La mayoría de las bacterias aerobias son anaerobias facultativas y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. En la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas. A través de esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre. (7,14)

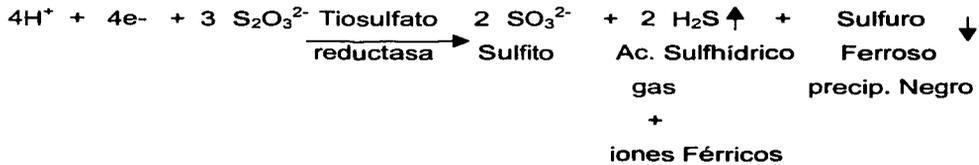
Esta reacción se revela mediante dos reactivos. Reactivo A (α -naftilamina y ácido acético 5 N) más el Reactivo B (ácido sulfanílico y ácido acético 5 N). Un resultado positivo lo da el color rojo, que indica la presencia de nitritos. La ausencia de color después de haber adicionado los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos (una verdadera reacción negativa) o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrógeno molecular (desnitrificación). Dado que los reactivos detectan sólo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falsa negativa. Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas.

Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos, y el desarrollo de un color rojo tras adicionar el polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa verdadera, pero si no aparece el color rojo tras haber adicionado el polvo de zinc confirma la prueba positiva.



Producción de Acido Sulfhídrico

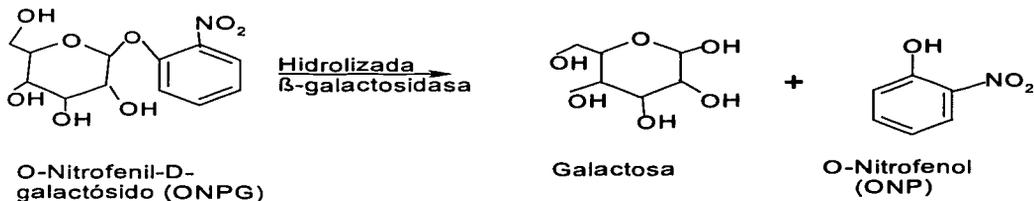
Esta prueba determina si se ha liberado ácido sulfhídrico (H₂S) por acción enzimática produciendo una reacción visible de color negro. La producción de H₂S a partir de tiosulfato que se reduce a sulfuro de hidrógeno en presencia de un donador de hidrógeno por bacterias que poseen la enzima específica., el ácido sulfhídrico reacciona con el hierro (sulfato ferroso) del medio, dando un precipitado negro del sulfuro ferroso. Siendo el sulfuro de hidrógeno un gas incoloro, se debe incluir en el medio un indicador para su detección. El tiosulfato de sodio es la sustancia incluida más a menudo en los medios a fin de proveer los átomos de azufre requeridos por las bacterias para producir el H₂S, el sulfato ferroso es la sal de hierro utilizada que reacciona con el gas H₂S produciendo un precipitado negro que indica una reacción positiva. (7,14,21)



Prueba de la β - galactosidasa (ONPG)

Esta prueba demuestra la presencia o ausencia de la enzima β -galactosidasa utilizando el compuesto orgánico o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG). (14)

La β -D-galactosidasa es una enzima intracelular vinculada con la hidrólisis (descomposición) de la lactosa y otros β -galactósidos, la lactosa es hidrolizada en galactosa y glucosa. La reacción es positiva cuando se observa un color amarillo por la hidrólisis del ONPG (incolore) que libera el cromógeno amarillo del o-nitrofenol (ONP).

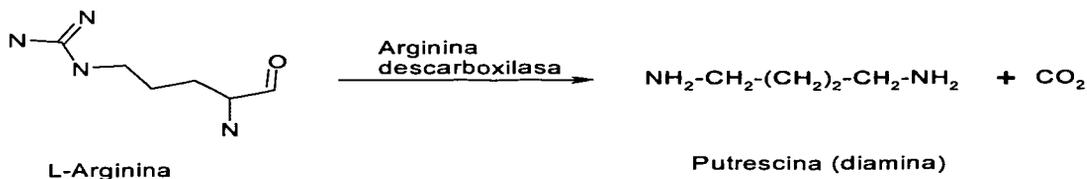


Fenilalanina Desaminasa

La Fenilalanina es un aminoácido que por desaminación oxidativa forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. Sólo los géneros *Proteus* y *Providencia* poseen esta enzima, que permite diferenciarlos del resto de las enterobacterias. La prueba se basa en la detección del ácido fenilpirúvico luego del desarrollo del microorganismo en un medio que contiene fenilalanina. Para eso se agrega cloruro férrico que forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico que indica reacción positiva. El medio de cultivo no puede contener extractos de carne o peptonas por su contenido variable en fenilalanina. (14,23)



El aminoácido L-arginina es catabolizado a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultáneamente o separadamente. Estos sistemas son el de arginina-dehidrolasa y el de arginina-descarboxilasa. En el sistema de la descarboxilasa la arginina sufre una descarboxilación para dar agmatina y este producto a su vez se desdobla en putrescina y urea mediante la enzima agmatinasa. En el sistema dehidrolasa, la descomposición de la L-arginina, se produce en dos etapas: primero una descomposición de la arginina en L-citrulina, seguido por un sistema de desdoblamiento de la citrulina. La reacción general produce la formación de L-ornitina, CO₂ y NH₃ del sustrato L-arginina. (11,14,21)



Fermentación de Glucosa, Lactosa y otros carbohidratos:

Una de las características taxonómicas que se utiliza para identificar los diferentes géneros de Enterobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación de la glucosa. Se conocen 2 tipos generales: la fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol, donde se forman cantidades menores de ácido, acetato, succinico y los principales productos son butanodiol, etanol, H₂ y CO₂. (11,13,19)

La determinación de la capacidad de fermentación de la Glucosa es importante en las primeras etapas de identificación de bacterias quimiótrofas.

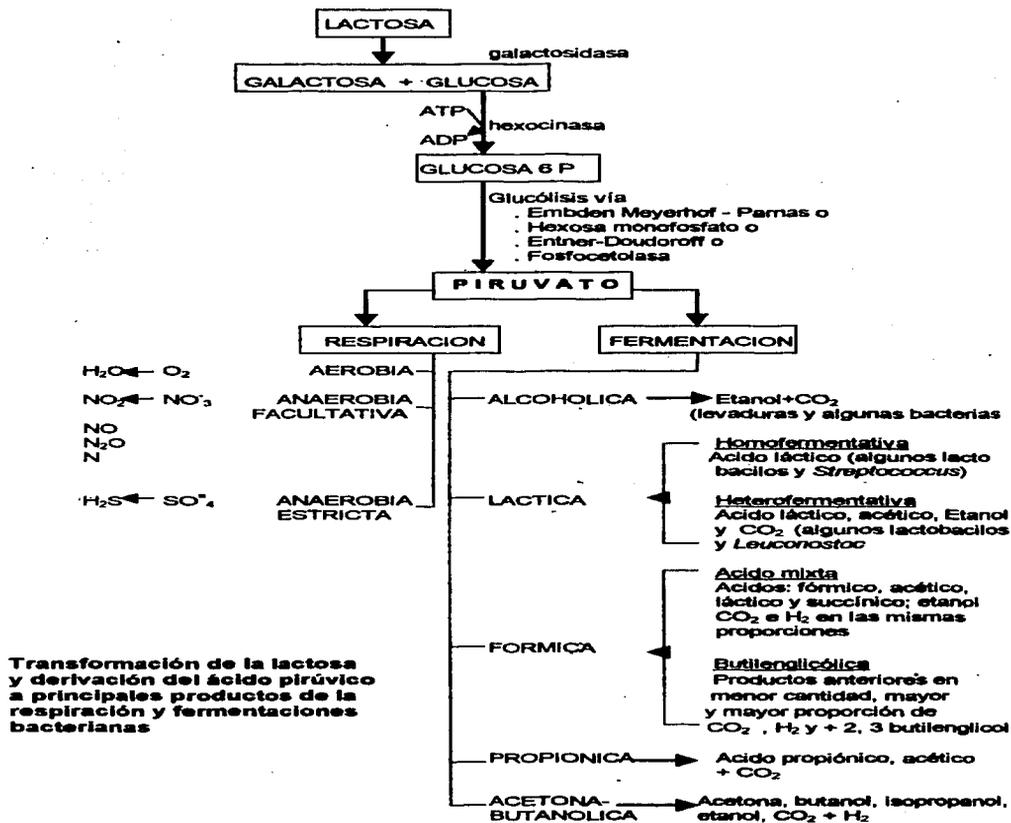
Se utiliza un caldo que contiene glucosa (azúcar del cual la mayoría de las bacterias quimiótrofas pueden obtener energía, ya sea por fermentación o respiración), peptona y un indicador de pH que permite detectar la producción de ácidos (característica de la fermentación de la glucosa).

Además en la fermentación se produce gas, ya sea CO_2 solo o una mezcla de H_2 y CO_2 . Ambos son gases y se detecta por la formación de una burbuja en una campana de Durham presente en el medio. (11,13,19)

La fermentación bacteriana de la lactosa es más compleja que la de glucosa. La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa, conectadas mediante un átomo de oxígeno que constituye lo que se conoce como unión galactósidas. Por hidrólisis se destruye esta unión, liberándose glucosa y galactosa. Para que un microorganismo utilice la lactosa debe estar presente dos enzimas: la β -galactósido permeasa que permite la transmigración de β -galactósidos (tales como la lactosa) a través de la pared celular y la β -galactosidasa, requerida para hidrolizar la unión β -galactósido una vez que el disacárido ha ingresado en la célula. La reacción ácida final proviene de la degradación de la glucosa. (11,13,19)

La capacidad de fermentar distintos carbohidratos es una característica muy utilizada en la identificación de microorganismos. Esta prueba determina la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas. Estos hidratos de carbono son lactosa, ramnosa, arabinosa, rafinosa, melibiosa, maltosa, manitol, sorbitol, trehalosa, adonitol, entre otros. La fermentación es un proceso metabólico de oxidación-reducción anaeróbico en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno. Los productos de la fermentación de los hidratos de carbono depende de varios factores: 1) el tipo de microorganismo que lleva a cabo el proceso de fermentación, 2) la naturaleza del sustrato, y 3) a veces, los factores ambientales como la temperatura y la acidez. Las bacterias pueden generar distintos productos finales dependiendo de la vía de fermentación que utilicen: la vía alcohólica, láctica, fórmica, propiónica, y la vía acetona-butanólica. (7,19,23,25)

Para visualizar la producción de ácidos se utiliza el rojo de metilo que es un indicador de pH con un intervalo entre 6.0 (amarillo) y 4.4 (rojo), y para la acetoina el α -naftol e hidróxido de potasio.^(19,23)



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1.5.2 Serotipificación

La clasificación de microorganismos en ocasiones se basan en las características antigénicas además de las bioquímicas.

Las bacterias tiene antígenos presentes que son específicos como su huella digital, (serotipo). Los antígenos bacterianos pueden ser moléculas capsulares (K) que consisten en polisacáridos, somáticos (O) que corresponden al lipopolisacárido de la pared de los Gram negativos, flagelares (H) que son proteínas llamadas flagelinas. (9)

La estructura antigénica de algunos géneros es tan compleja como en el caso de la de la *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.*, *Shigella sp.* y *Yersinia*, que presentan una gran variedad de subgrupos determinados por los antígenos presentes. Ejemplo:

Se puede expresar el nombre de una cepa de la siguiente manera:

Género	Especie	Biotipo	Serotipo
Yersinia	enterocolítica	4	03

En una primera identificación se usan sueros polivalentes que determina la cantidad de antígeno de un género y para la caracterización serológica específica se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno.

Para la serotipificación de las bacterias, se realizar mediante técnicas de aglutinación en portaobjeto, precipitación, y difusión en gel.

1.5.3 Técnicas de Biología molecular

Las técnicas de DNA recombinante fueron desarrolladas a principios de los años 70 y subsecuentemente revolucionaron la investigación en genética y biología

molecular. Una de estas técnicas, **la Reacción en Cadena de la Polimerasa** (PCR, por sus siglas en inglés) desarrollada por Kary Mullis en 1984. Esta técnica genera múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos de DNA de un microorganismo, provee mecanismos para detectar cantidades diminutas de microorganismos y es de alta especificidad. Es un proceso que consta de tres pasos: 1) Desnaturalización: Separación de la doble hebra de DNA mediante calor de 90 °C en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrógeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la deoxirribosa y los grupos fosfatos permanecen intactos, 2) Alineación: la unión de oligonucleótidos iniciadores (son secuencias cortas de DNA de una sola hebra sintéticas), específicos a los extremos de la región objetivo del genoma del microorganismo de interés, este proceso se lleva a cabo entre 40 °C y 65 °C, dependiendo de la longitud y de la secuencia de bases de los oligonucleótidos iniciadores, y 3) Extensión: una vez que los oligonucleótidos iniciadores se unieron a su secuencia complementaria, se eleva la temperatura a 72 °C y la enzima Taq DNApolimerasa replica las hebras de DNA. Este proceso se repite unos 25 o 30 ciclos, a tal grado que el DNA amplificado puede ser identificado y aislado. Su utilidad para clonar fragmentos de DNA, es una potente herramienta en medicina forense, diagnóstico en infecciones virales, diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas y sumamente útil en la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, *E.coli*, *V.cholerae*, entre otros. La identificación por PCR está dirigida al ARNr16S. (10,12, 24)

Con respecto a la identificación de *M. tuberculosis*, cabe destacar que la exactitud diagnóstica proporcionada por otros métodos, tales como electroinmuno absorción (EIA) para serodiagnóstico, es inferior al 84 %, mientras que la sensibilidad y especificidad de la ampliación del gen que codifica para ARNr16S es de un 85 % - 99 %.(8)

Entre las ventajas que ofrece esta técnica es que es rápida, altamente específica y sensible, pero resulta ser demasiado costosa.

1.5.4 Métodos Cromatográficos.

La cromatografía es una técnica que efectúa la separación física de una mezcla de componentes basados en la interacción selectiva de las especies con el sistema de separación. Esta separación de los componentes celulares de las bacterias se puede realizar por métodos de cromatografía de gases para identificar productos metabólicos, en particular para la identificación de bacterias anaerobias no esporuladas como: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, etc. (3)

1.6 Sistemas comerciales de identificación

La introducción de los sistemas comerciales de identificación microbiana se dió a fines de la década de los 60's. Los sistemas comerciales utilizan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya sea sustratos deshidratados, tiras de papel filtro impregnadas en reactivo o pequeños compartimentos con medios rápidos para sembrar. En todos los casos se emplean códigos numéricos para la interpretación de resultados. (17,20,23)

Estos sistemas fueron desarrollados inicialmente para la identificación de las Enterobacterias debido a la frecuencia de su aislamiento en muestras clínicas; a su desarrollo relativamente rápido y a sus reacciones bioquímicas en general bien definidas. (3,5,23)

La estructura compacta de estos equipos, que requieren poco espacio para su almacenamiento, su facilidad de uso e interpretación de las reacciones químicas, su prolongado tiempo de conservación, y el control de calidad estandarizado que proveen los fabricantes, hace que sean muy convenientes para su empleo en laboratorios de microbiología. Son especialmente útiles en laboratorios que trabajan en menor escala, ya que ayudan a identificar bacterias que de otro modo

pueden requerir medios especiales para llevar a cabo pruebas convencionales donde el control de calidad es más difícil de mantener. También utilizando estos equipos se ha posibilitado la definición de "biotipos" o "impresiones digitales" bioquímicas mediante las cuales muchas especies bacterianas conocidas pueden ser luego subclasificadas. Se han concebido fórmulas matemáticas por las cuales los resultados de las pruebas bioquímicas son transformadas en números de biotipos posibilitando el uso de computadoras para ayudar en la identificación definitiva de las bacterias. Estos números de biotipos se basan en datos obtenidos a partir del análisis de miles de reacciones bioquímicas. (3,5,11,27)

Los sistemas o equipos más comúnmente usados son:

1.6.1 BBL. Enterotube II (Becton Dickinson)

Es un sistema rápido que se usa en la identificación de Enterobacterias. (23)

Consiste en un tubo de plástico con medio de cultivo contenidos en compartimentos individuales. En ellos se hace pasar una colonia aislada de la muestra clínica. Se incuba a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en 5 horas se interpreta. Con este sistema se detectan 15 características bioquímicas, pero se tienen problemas en la interpretación del citrato y urea según los investigadores que lo han utilizado. (18)

1.6.2 OXI/FERM Tube II (Becton Dickinson)

Es un sistema para la identificación de bacilos Gram negativos. Consiste en un tubo de plástico de 12 medios de cultivo que permite la realización simultánea de 14 pruebas bioquímicas. Su incubación es a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y su interpretación es partir de las 5 horas. (11)

1.6.3 Sistema Enterobacteriaceae API 20 E (Analytal Products, Inc)

Es un sistema estandarizado para la identificación de bacilos Gram negativos. Consiste en una planilla con microtubos conteniendo medio de cultivo deshidratado. En ellos se inocula una suspensión de microorganismo y ponen de manifiesto 23 características bioquímicas y la identificación se tendrá a las 5 horas. (22,23)

1.6.4 Entero-set 20 (Inolex Corp. Glenwood.)

En este sistema se ponen de manifiesto 20 características bioquímicas para diferenciar géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, donde se utiliza una tarjeta con 20 unidades, capilares que contienen 20 reactivos. En ellos se hace pasar una colonia aislada, su interpretación se realiza a las 20 a 24 horas.(11)

1.6.5 Sistema Minitek (Baltimore Biological Laboratory)

En este sistema se utilizan discos de papel impregnados con diferentes sustratos. Se colocan los discos en la depresión de una placa de plástico y se inoculan con una suspensión del microorganismo aislado. La identificación se basa en las reacciones de coloración que se producen en los discos luego de la incubación durante 24 horas. (11)

1.6.6 Sistema Micro-ID (General Diagnostics Division)

Se utilizan discos de papel impregnados con sustrato y reactivos para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Consiste en una bandeja de plástico moldeado con tapa a bisagra, contiene 15 cámaras de prueba, una para cada

reacción bioquímica. Se inoculan las cámaras con una suspensión bacteriana. Su interpretación se realiza a las 4 horas.

1.6.7 Micro-Media Enteric System (MMES) (Micro-Media Systems, Inc.)

Este sistema consiste de varias placas de plástico. Una de ellas es para la identificación de microorganismos aislados Gram negativo (entérico o no entérico), las otras para: la identificación de tres microorganismos Gram negativos aislados diferentes (panel Trident), identificación de un solo microorganismo aislado mientras se controla su sensibilidad a varios antibióticos y la última la determinación de la mínima concentración inhibitoria de varios antibióticos para un microorganismo aislado ya identificado. Los materiales vienen congelados en las concavidades de las placas y éstas se deben conservar en un congelador hasta su empleo. En ellos se adiciona una suspensión bacteriana de una colonia aislada y este sistema pone de manifiesto 30 características bioquímicas. Su interpretación se realiza a las 18 a 24 horas de incubación a 35 °C a 37°C. ⁽¹¹⁾

1.6.8 Sistema API RAPID 20E (RE)

Este sistema que da resultados a las cuatro horas, es similar a la tira de API 20 E con algunas modificaciones, las cúpulas de RE son más pequeñas y los sustratos no están tamponados lo que permite reacciones más rápidas. El inóculo es preparado a una densidad de sólo 0.5 de la escala estándar de McFarland. ^(11,12)

1.6.9 Sistema ID BBL Cristal Entérico/No fermentador (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockesville MD)

Es un método de identificación miniaturizado que emplea sustratos convencionales modificados y cromogénicos. Las tapas de BBL Crystal contienen 30 pocillos en la base de BBL Crystal. Cuando la tapa se alinea con la base se

cierra y los inóculos prueba rehidratan los sustratos secos y se inician las reacciones. Los pocillos se examinan para detectar cambios de color y se genera un número de 10 dígitos. (11)

1.6.10 Sistema Rapid One (Innovative Diagnostics Systems, Inc. Norcross GA)

Es un micrométodo cualitativo que emplea sustratos convencionales y cromogénicos para identificar enterobacterias. Consta de 18 cavidades de reacción moldeadas en la periferia de una bandeja de plástico. Las cavidades de reacción contienen reactivos deshidratados, y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada cavidad con una cantidad predeterminada de inóculo. Se emplea como inóculo una suspensión del microorganismo prueba en 2 mL de fluido RapID, la cual se rehidrata y se inicia la reacción. La interpretación puede hacerse a las cuatro horas. (11)

1.6.11 Microplacas Biolog GN (Biolog Inc. Hayward CA)

Consisten en una placa de microtitulación de 96 pocillos que prueba la capacidad de los microorganismos para utilizar (oxidar) una o más de la 95 diferentes fuentes de carbono en presencia de un indicador redox (colorante tetrazolio). La prueba proporciona un patrón de respuesta que constituye la huella digital metabólica de las capacidades de un microorganismo inoculado. (3)

1.6.12 Sistema MicroScan (Dade MicroScan Inc. West Sacramento CA)

El sistema MicroScan consiste en bandejas de microtitulación de 96 pocillos de plástico, de tamaño estándar, en las cuales se incluyen hasta 32 sustratos reactivos para la identificación. Los paneles pueden adquirirse en estado congelado o en la forma de sustratos deshidratados. Se inocula con una

suspensión concentrada del microorganismo y su interpretación se realiza a las 15 a 18 horas. Los paneles pueden interpretarse visualmente, después de lo cual los resultados bioquímicos se convierten en un número biotípico de siete u ocho dígitos que puede ser traducido en una identificación con un libro de códigos provisto por el fabricante. Como alternativa puede usarse un lector automático de bandejas para detectar crecimiento bacteriano o los cambios de color por diferencias en la luz de transmisión. (11)

1.6.13 Sistema Sceptor (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Towson MD)

El sistema Sceptor permite la hidratación e inoculación simultánea de paneles de sustrato secos en bandejas de microtitulación para la identificación de miembros de enterobacterias. Este reservorio se ubica en un dispositivo de inoculación automática, y las placas son simultáneamente hidratadas e inoculadas al sustrato de los pocillos. Las reacciones se interpretan visualmente y se ingresan en forma manual en un módulo de computadora. Los programas de computadora proporcionan un número biotípico de 7 dígitos de identificación. (11)

1.6.14 Sistema Sensititre (AccuMed International Inc. Westlake OH)

Puede adquirirse como un sistema de identificación entérico manual o en la forma de un sistema autoidentificación. La placa manual contiene medios para llevar a cabo 23 pruebas bioquímicas estándar, además del control. Los medios están deshidratados en los pocillos de una bandeja de microtitulación de tamaño estándar de 96 pocillos. El sistema contiene pruebas bioquímicas convencionales, se inocula y se lee manualmente. (11)

1.7 Otros métodos.

La mayor parte de los sistemas se basan en el análisis matemático de los datos obtenidos con las reacciones bioquímicas, para la identificación rápida de enterobacterias. El sistema API tiene un registro de perfil para computadora. Encise II es una base de datos, que se emplea con el Enterotube, se puede leer con un sistema de computadora binomio o un número de referencia de cuatro dígitos. También se ha efectuado la identificación bacteriana con ayuda de la computadora utilizando los esquemas de susceptibilidad antimicrobiana.

2. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias presentan diferencias en cuanto a sus requerimientos nutricionales, así como la capacidad para transformar algunos compuestos orgánicos, a través de enzimas que participan en los procesos metabólicos. Por medio de ensayos se ponen de manifiesto estos procesos, y así se permite la identificación de los mismos. La identificación de las bacterias en los laboratorios de microbiología, generalmente se lleva a cabo por estos métodos donde se pone de manifiesto su actividad metabólica, lo que implica un gasto excesivo de reactivos y materiales de laboratorio. Un ejemplo claro de la conveniencia de utilizar como alternativa un micrométodo durante las actividades docentes de bacteriología, es que tan solo para poder identificar una cepa, por el método convencional, se utilizan aproximadamente un mínimo de nueve tubos con sustratos: glucosa, lactosa, gas, sulfhídrico, indol, movilidad, citrato, sacrosa, urea. Si se toma en cuenta que el volumen de cada uno de los tubos con medio de cultivo es de 3 mL de sustrato, se tiene un volumen total de 27 mL en los nueve tubos, pero generalmente se identifican tres cepas, por lo tanto se prepara un volumen de 81 mL en 27 tubos que se encuentran en una gradilla, si esto lo extrapolamos a grupo de 20 alumnos se obtiene un volumen de 1620 mL de medios de cultivo, en 560 tubos en 20 gradillas, con todos estos cálculos se tiene una idea de la cantidad de material a utilizar, del volumen gastado en el grupo y el gran espacio que se requiere para su almacenamiento e incubación.

Los micrométodos comerciales son costosos por lo que se propone como alternativa el implementar un micrométodo que se adapte a la docencia.

El Micrométodo propuesto (MIMITEC) consta de una batería de 29 pruebas bioquímicas, que consiste en medios de cultivo liofilizados distribuidos por duplicado en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La diferenciación de bacterias se basa principalmente en su comportamiento bioquímico de acuerdo a la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético

de los cromosomas bacterianos. Este comportamiento se detecta empleando medios de cultivos, junto con un indicador que detecta la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos.

Este micrométodo utiliza 100 μL de cada sustrato para 29 pruebas en una placa. Para la identificación de una cepa se gastan 2900 μL que es igual a 2.90 mL de medios de cultivo, por tres cepas a identificar son 8.7 mL de medios de cultivo en 3 placas, para un grupo de 20 alumnos son necesarias 60 placas con 522 mL de medios de cultivo y 6 placas caben en una gradilla, por tanto se requieren 10 gradillas, se observa claramente la reducción del volumen a utilizar de los medios de cultivo, del material y espacio durante la incubación y una número de pruebas para realizar la identificación. Con todas estas ventajas, el micrométodo constituye una opción para la identificación de bacterias Gram negativas en docencia, en el ceparío de la Facultad de Química y en un futuro en investigación.

Además se pretende que el micrométodo MIMITEC resulte confiable, reproducible, económico y ser realizado con tecnología nacional.

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método miniaturizado, con equipo y material de uso común, en laboratorios de microbiología, para la identificación de Enterobacterias y Pseudomonas.

Objetivos Particulares:

- Comparar el método miniaturizado con el método convencional.
- Encontrar en cada uno de los sustratos la concentración y pH adecuados para ser utilizados en la adaptación del método miniaturizado.
- Desarrollar un método miniaturizado con equipo y material que se usa regularmente en un laboratorio de microbiología, y que resulte de bajo costo.
- Desarrollar un sistema para identificar Enterobacterias y Pseudomonas, que sea confiable y reproducible.
- Desarrollar un método miniaturizado que a futuro sea útil en docencia e investigación.

4. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

- ❖ Equipos:
 - Congelador REVCO (EQUIPAR S.A de C.V)
 - Autoclave (Hirayama)
 - Balanza analítica analytical Plus (OHAUS)
 - Congelador REVCO (EQUIPAR S.A de C.V)
 - Campana de flujo laminar (VECO)
 - Horno de microondas (Panasonic)
 - Incubadora a 35 C (Riossa)
 - Liofilizadora Freeze Dryer 3 (LABCONCO)
 - Potenciómetro pHmeter 320 (CORNIG)
 - Refrigerador (American)
- ❖ Material:
 - Placas de ELISA (Nung Denmark)
 - Filtros y membranas de 0,45 µm (Millipore)
 - Puntas de polietileno color amarillo esteriles (Rainin Instrument C.A.INC)
 - Porta puntas (Rainin Instrument C.A.INC)
 - Micropipeta 4-200 µL Finnpiquette (Labsystems)
 - Microplaca (Maxi Sorp NUNC DENMARK)
 - Tubos de vidrio de 16 x 100, 14 x 100
 - Cajas petri de plástico 100 x 15 mm
 - Papel de estrasa
 - Caja de polietileno de alta densidad
 - Vaso de vidrio Pyrex de 150 mL
 - Gradillas
 - Guantes de latex
 - Jeringas de 20 mL
 - Asa
 - Pipetas pasterur
 - Bulbos de plástico
 - Equipo de filtración Swinnex (Millipore)

- ❖ Reactivos: L(+)**Ramnosa monohidratada (Merck)**
- Raffiosa pentahidratada (Merck)
- Maltosa monohidratada (Merck)
- Melibiosa monohidratada (Merck)
- Dulcitol (Merck)
- L -arabinosa (Difco)
- Salicina (Merck)
- D(+)**Xilosa (Sigma)**
- Lactosa (Bioxon Méx.)
- Sacarosa (Bioxon Méx.)
- D-Dextrosa (glu)anhidar (Q.Industrial Carmona)
- Manitol (Bioxon Méx.)
- Inocitol (Sigma)
- Malonato (Merck)
- Caldo nutritivo (Bioxon Méx.)
- Fosfato de sodio dibásico (Laboratorio Cepario)
- Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker)
- Cloruro de sodio (Laboratorio Cepario)
- Fosfato de Potasio Dibásico (Técnica Química S.A)
- Sulfato de magnesio (monterrey)
- Tiosulfato de sodio (Lab. Microbiología experimental)
- Citrato de sodio (J.T.Baker)
- Fosfato de amonio (J.T. Baker)
- Urea (Merck)
- Nitrato de potasio (Tecn. Química)
- Tiosulfato de sodio anhidro (Reasol)
- Fosfato de potasio monhidratado (Baker Analyzed)
- L - Tryptofano (Sigma)
- Extracto de levadura (Bioxon)
- Sacarosa cristal (J.T.Baker)

Peptona de caseína (Bioxon)
Extracto de carne (Difco)
Azul de bromotimol (Técnica química)
Rojo de fenol (Merck)
DL-Fenilalanina (Sigma)
L-ornitina (Sigma)
L-Arginina (Mark Cambar)
Base Moeller (Becton Dickinson)
Lisina (Sigma)
Polipeptona (BBL)
Agar cistina tripticaseína (Bioxon)

5. METODOLOGÍA

Para poder caracterizar bioquímicamente a las bacterias Gram negativas, se cuenta en el laboratorio con métodos de identificación basados inicialmente en sus características morfológicas, tanto microscópicas como coloniales, que se realizan a partir de los aislamientos en los medios de cultivo. Siguiendo con las características fisiológicas y bioquímicas de los mismos, lo que requiere una serie de pruebas muy extensa para la caracterización de estas bacterias.

5.1 Pruebas convencionales

- 5.1.1 Se prepararon los sustratos de las pruebas bioquímicas de acuerdo a las marcas comerciales y metodologías del Mac Faddin, utilizando medios de cultivo sólidos, semisólidos y líquidos.
- 5.1.2 Los cultivos bacterianos empleados, pertenecen a la colección del Cepario, de la Facultad de Química, UNAM, los cuales se mencionan a continuación:

Nº	CEPAS	Nº	CEPAS
1	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	14	<i>P. rettgeri</i> P-17
2	<i>E. aerogenes</i> E-1	15	<i>P. mirabilis</i> C-57
3	<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	16	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14025
4	<i>E. coli</i> ATCC 25922	17	<i>S. enteritidis</i> S-16
5	<i>E. coli</i> ATCC 10536	18	<i>S. typhi</i> S-33
6	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	19	<i>S. paratyphi</i> AHA6 (S-24)
7	<i>S. marcescens</i> ATCC 13082	20	<i>S. typhosa</i> S7H901 (S-38)
8	<i>C. freundii</i> C-18	21	<i>S. typhosa</i> S8 (S-39)
9	<i>S. boydii</i> S-51	22	<i>Y. enterocolitica</i> Y-1
10	<i>S. sonnei</i> S-54	23	<i>Kluyvera</i> sp .
11	<i>P. mirabilis</i> P-14	24	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
12	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	25	<i>P. stutzerii</i>
13	<i>P.morganii</i> P-15		

- 5.1.3 Estas cepas se encontraban liofilizadas y se hidrataron en caldo nutritivo. Se incubaron a 37 ° C por 24 horas.
- 5.1.4 Se sembró cada una de las cepas en agar Mac Conkey.
- 5.1.5 Se incubó a 35 ° C, por 18 a 24 horas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1.6 Se verificó la pureza por medio de la morfología microscópica y morfología colonial.

5.1.7 De cada una de las cepas se tomó una colonia y se inocularon en los sustratos para las pruebas que a continuación se indican.

Prueba	Prueba	Prueba
Reducción de nitratos	Desaminación de Fenilalanina	Fermentación de Maltosa
Voges Proskauer	Fermentación de Glucosa	Fermentación de Ramnosa
Producción de Indol	Fermentación de Lactosa	Fermentación de Rafinosa
Producción de Ácido sulfhídrico	Fermentación de Adonitol	Fermentación de Sacarosa
Hidrólisis de la Urea	Fermentación de Arabinosa	Fermentación de Salicina
Utilización de Citrato	Fermentación de Dulcitol	Fermentación de Sorbitol
β -Galactosidasa	Fermentación de Inocitol	Fermentación de Trehalosa
Descarboxilación de Lisina	Fermentación de Manitol	Fermentación de Xilosa
Descarboxilación de Arginina	Fermentación de Melibiosa	Glucosa OF
Descarboxilación de Ornitina	Fermentación de Malonato	

5.1.8 Se adicionó una gota de aceite mineral a cada uno de los tubos que contenían sustrato de aminoácido (arginina, lisina, ornitina).

5.1.9 Se incubó a 35 °C por 18 a 24 horas.

5.1.10 Transcurrido el tiempo se realizó la lectura de los resultados.

5.1.11 Se revelaron los sustratos que lo requerían con los reactivos de acuerdo al Mac Faddin de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.

5.1.12 Los resultados obtenidos se compararon con tablas del Lennette Edwin H. Manual de microbiología clínica y con los resultados obtenidos en el cepario de la Facultad de Química, para verificar que correspondían con el microorganismo empleado.

5.1.13 Los resultados verificados se utilizaron como estándar para la adaptación del método miniaturizado.

Los sustratos de las pruebas bioquímicas utilizados en la identificación de las cepas en el método convencional fueron los mismos sustratos para el método miniaturizado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2 Preparación de sustratos del método miniaturizado MIMITEC

- 5.2.1 Se prepararon los sustratos de las pruebas bioquímicas de acuerdo al Anexo 1, donde se observan algunas modificaciones en cuanto a la concentración y ajuste de pH.
- 5.2.2 Se emplearon únicamente medios líquidos y un semisólido (OF Glucosa).
- 5.2.3 La preparación de los reveladores para los sustratos que lo requirieron lo indica el Anexo 2.

5.3 Control de Calidad de sustratos.

- 5.3.1 Una vez que se tenían elaborados y esterilizados los sustratos tanto para las pruebas convencionales como para el método miniaturizado MIMITEC, se colocó en control de esterilidad a 35 °C por 18 a 24 horas.
- 5.3.2 En el método miniaturizado se utilizaron microplacas y sustratos estériles, que se trabajaron en condiciones asépticas, para el llenado de la microplaca se adicionó 100 µL de cada medio por pozo, tapando la microplaca con papel de estrasa. Vea la Figura 5, Anexo 3.
- 5.3.3 Cada sustrato se adiciona a la microplaca por triplicado, el primero se destinó para control del medio de cultivo (esterilidad), el segundo para cepas positivas específicas para cada sustrato y el tercero para cepas negativas específicas para cada sustrato.
- 5.3.4 Una vez llenas las microplacas, se colocaron en el congelador a -70°C por una hora, transcurrido el tiempo se llevaron a la liofilizadora, para que se deshidraten al vacío (la liofilización permite una deshidratación completa a temperaturas bajas y presión reducida, sin variar la composición química del sustrato).
- 5.3.5 Se liofilizaron 3 microplacas en el compartimento adaptado al equipo de liofilización y en condiciones de -50 °C y 22 pulgadas de Hg de presión durante 5 horas. Vea la figura 6, Anexo 3.
- 5.3.6 Una vez liofilizadas, se almacenaron en un espacio libre de humedad, hasta por dos meses.

5.3.7 Para comprobar la efectividad de los sustratos utilizados en el método miniaturizado MIMITEC, se utilizaron cepas puras y que sirvieron como controles positivos (degradación del sustrato) y negativos (sustratos no degradados) para cada sustrato determinado. Las cepas empleadas fueron: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Shigella boydii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus. vulgaris*, *Moraxella catharralis*, de acuerdo a la tabla No. 1, Control de calidad de los sustratos.

Tabla No. 1 Control de calidad de los sustratos.

Control del Medio	Control Positivo	Control Negativo	Control del Medio	Control Positivo	Control Negativo	Control del Medio	Control Positivo	Control Negativo	Control del Medio	Control Positivo	Control Negativo
NO ₃	<i>E. cloacae</i>	<i>megaterium</i>	ADH	<i>E. cloacae</i>	<i>S. boydii</i>	DUL	<i>K. pneumoniae</i>	<i>megaterium</i>	RAF	<i>E. cloacae</i>	<i>S. boydii</i>
H ₂ S	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. cloacae</i>	LDC	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. boydii</i>	GLU	<i>P. vulgaris</i>	<i>megaterium</i>	SAL	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i>
V-P	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	ODC	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	IND	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	SAL	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. boydii</i>
IND	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. cloacae</i>	FDA	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. cloacae</i>	LAC	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	SOR	<i>E. cloacae</i>	<i>S. boydii</i>
URE	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. boydii</i>	ONPG	<i>E. cloacae</i>	<i>P. vulgaris</i>	MAN	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	TRE	<i>E. cloacae</i>	<i>M. catharralis</i>
CIT	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	MALO	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	MEL	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	XIL	<i>E. cloacae</i>	<i>S. boydii</i>
			ADO	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	RAM	<i>E. cloacae</i>	<i>P. vulgaris</i>			
			ARA	<i>E. cloacae</i>	<i>P. vulgaris</i>	MAL	<i>E. cloacae</i>	<i>S. boydii</i>	GLU _{OF}	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. catharralis</i>

5.3.8 Haciendo modificaciones en los medios y realizando la adaptación del método miniaturizado, se utilizaron los sustratos como lo indica el Anexo 1.

5.3.9 Obteniendo un parámetro indicativo de la reacción positiva y la reacción negativa, como lo indica la tabla No. 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla No. 2 Control de Colores

Medio	Control	Positivo	Positivo	Negativo	Medio	Control	Positivo	Positivo	Negativo
NO ₃					ADH				
H ₂ S					LDC				
V-P					ODC				
IND					FDA				
URE					ONPG				
CIT					MALO				

Medio	Control	Positivo	Positivo	Negativo	Medio	Control	Positivo	Positivo	Negativo
ADO					MAL				
ARA					RAF				
DUL					SAC				
GLU					SAL				
INO					SOR				
LAC					TRE				
MAN					XIL				
MEL					GLU _{OF}				
RAM									

**TESIS CON
FALLA LE ORIGEN**

5.4 Preparación de Cepas Bacterianas

5.4.1 Se emplearon 25 cepas que pertenecen a la colección del Ceparío, las cuales se mencionan a continuación:

Nº	CEPAS	Nº	CEPAS
1	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	14	<i>P. rettgeri</i> P-17
2	<i>E. aerogenes</i> E-1	15	<i>P. mirabilis</i> C-57
3	<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	16	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14025
4	<i>E. coli</i> ATCC 25922	17	<i>S. enteritidis</i> S-16
5	<i>E. coli</i> ATCC 10536	18	<i>S. typhi</i> S-33
6	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	19	<i>S. paratyphi</i> AHA6 (S-24)
7	<i>S. marcescens</i> ATCC 13082	20	<i>S. typhosa</i> S7H901 (S-38)
8	<i>C. freundii</i> C-18	21	<i>S. typhosa</i> S8 (S-39)
9	<i>S. boydii</i> S-51	22	<i>Y. enterocolitica</i> Y-1
10	<i>S. sonnei</i> S-54	23	<i>Kluyvera</i> sp .
11	<i>P. mirabilis</i> P-14	24	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
12	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	25	<i>P. stutzerii</i>
13	<i>P. morgani</i> P-15		

5.4.2 Cada cepa se inoculó en Agar Mac Conkey.

5.4.3 Se incubó a 35 °C, por 18 a 24 horas.

5.4.4 Se verificó pureza mediante la morfología microscópica y morfología macroscópica.

5.4.5 Se tomó una colonia y se inoculó en dos tubos de Agar Cistin Tripticasa (CTA), uno de ellos se destinó para las pruebas y el otro para la preservación.

5.4.6 Para la inoculación de los sustratos del método miniaturizado se realizó una suspensión tomando una colonia aislada y se suspendió en solución salina 0.85 % estéril, a pH 7, para obtener una turbidez de 0.5 de la curva de McFarland, que corresponde aproximadamente a 1.5×10^8 .

5.5 Preparación de las placas del método miniaturizado MIMITEC e inoculación.

5.5.1 Se utilizaron aproximadamente 100 microplacas de ELISA.

5.5.2 Se les realizó un tratamiento de lavado con Extrán al 10 %, se enjuagaron con agua potable, se dejaron secar y se taparon por la parte superficial de la microplaca con papel de estrasa (tapando los pozos).

5.5.3 Se esterilizaron en el horno de microondas mediante dos ciclos de esterilización, cada ciclo fue de dos minutos.

5.5.4 Después de haber elaborado los sustratos bioquímicos de acuerdo al Anexo 1, éstos se colocaron en tubos de ensaye de fondo plano, con tapón de rosca estériles.

5.5.5 Los sustratos empleados fueron:

Prueba	Prueba	Prueba
Reducción de nitratos	Desaminación de Fenilalanina	Fermentación de Maltosa
Voges Proskauer	Fermentación de Glucosa	Fermentación de Ramnosa
Producción de Indol	Fermentación de Lactosa	Fermentación de Rafinosa
Producción de Ácido sulfhídrico	Fermentación de Adonitol	Fermentación de Sacarosa
Hidrólisis de la Urea	Fermentación de Arabinosa	Fermentación de Salicina
Utilización de Citrato	Fermentación de Dulcitol	Fermentación de Sorbitol
β -Galactosidasa	Fermentación de Inocitol	Fermentación de Trehalosa
Descarboxilación de Lisina	Fermentación de Manitol	Fermentación de Xilosa
Descarboxilación de Arginina	Fermentación de Melibiosa	Glucosa OF
Descarboxilación de Ornitina	Fermentación de Malonato	

5.5.6 Se rotularon e identificaron con los datos: Nombre del sustrato, fecha y valor de pH. Vea figura No.1 del Anexo 3.

5.5.7 La microplaca y substratos estériles, trabajaron en la campana con flujo laminar y mechero prendido.

5.5.8 Se destapó la microplaca y se llenaron los pozos con 100 μ L del sustrato por duplicado, con la pipeta de 40 –200 μ L. Se modificó el llenado de la microplaca, utilizando sólo dos pozos, el primero sirvió de control de esterilidad y el segundo para indicar la reacción positiva o negativa de la cepa en estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 5.5.9 Se tapa la microplaca nuevamente.
- 5.5.10 Las microplacas llenas, se colocaron en el congelador a temperatura – 70 °C por una hora, transcurrido ese tiempo se liofilizaron 5 horas a –50°C y 22 pulgadas de Hg. Vea la figura 5, Anexo 3.
- 5.5.11 Las placas liofilizadas se inocularon con la suspensión de la cepa en estudio.
- 5.5.12 La suspensión bacteriana se preparó de acuerdo al punto 5.4.6.
- 5.5.13 De esta suspensión bacteriana, se adicionaron un volumen de 100 µL con una pipeta de 40-200 µL en cada pozo de una línea vertical de la microplaca. En los pozos de la otra línea vertical se adicionaron 100 µL de Solución Salina 0.85 % estéril , con la finalidad de obtener una referencia como control de color del medio y de la esterilidad del mismo. Vea la Figura 2, Anexo 3.
- 5.5.14 A las pozos que contenían los aminoácidos (arginina, lisina, ornitina) se adicionó una gota de aceite mineral.
- 5.5.15 Se cubrió con su tapa de papel de estrasa.
- 5.5.16 Se incubó a 37°C por 24 horas, en una cámara de humedad.

5.6 Lectura de resultados

- 5.6.1 En el método miniaturizado se realizó la lectura de algunos sustratos, a las 5 horas de haber empezado la incubación, estos sustratos son: ONPG, Malonato, Dulcitol, Adonitol, Arabinosa, Ramnosa, Melibiosa, Manitol.
- 5.6.2 Se continuó la incubación y se leyeron las pruebas restantes a las 18 a 24 horas, así mismo se corroboraron las pruebas que se leyeron inicialmente. Vea la figura 6, 7-A y 7-B, Anexo 3.
- 5.6.3 Para revelar resultados de los sustratos que lo requirieron, como la prueba de Indol, se adicionaron dos gotas del reactivo Erlich y la lectura se realizó a los tres minutos, para la prueba de V-P se adicionaron dos gotas de Hidróxido de potasio al 40 % más dos gotas de α-naftol al 5 % tomando un tiempo aproximado para su lectura de 8 a 10 minutos. Finalmente al pozo

de FDA se agregaron dos gotas de Cloruro férrico al 40 %. Los reactivos para revelar las pruebas bioquímicas se prepararon como lo indica el Anexo 2.

5.6.4 Con los resultados obtenidos, se determinaron la sensibilidad, especificidad, y exactitud, mediante las siguientes fórmulas:

La sensibilidad indica la frecuencia de los resultados positivos en ambos métodos (verdaderos positivos), esto es positividad expresada en por ciento.

$$S = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

VP = Verdadero Positivo

FN = Falso Negativo

La especificidad indica la frecuencia de resultados negativos para ambos métodos (verdaderos negativos):

$$Es = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

VN = Verdadero Negativo

FP = Falso Positivo

La exactitud de una prueba indica el porcentaje de los métodos que dan positivos y negativos las pruebas que son interpretados correctamente.

$$Ex = \frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN} \times 100$$

5.7 Prueba del micrométodo con un grupo de Bacteriología

5.7.1 Se realizó una suspensión microbiana en solución salina al 0,85 %, con una colonia aislada, a una concentración de 0.5 de la curva de McFarland.

5.7.2 Los cultivo que se utilizaron para cada suspensión fueron: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATC 13883, *Proteus mirabilis*.

5.7.3 Al grupo de bacteriología, se le dió una breve explicación sobre el micrométodo MIMITEC como trabajar con él y los cuidado que se deben

tener así como de la lectura e interpretación de MIMITEC, con ayuda de tablas que indican el porcentaje de positividad para las enterobacterias, y los colores que dan las prueba positivas o negativas los cuales se muestran en la tabla 2 .

5.7.4 A cada alumno se les proporcionó una placa del micrométodo MIMITEC, junto con una pipeta pasteur estéril, bulbo de plástico, y la cepa a identificar.

5.7.5 Una vez que los alumnos entregaron sus resultados se realizaron promedios de cada una de las pruebas determinadas para una misma cepa y obtener la concordancia entre sustratos y de las cepas.

6. RESULTADOS

6.1 Resultados de pruebas bioquímicas.

Se utilizaron 25 cultivos puros de acuerdo al siguiente listado:

1. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
2. *Enterobacter aerogenes* E-1
3. *Enterobacter cloacae* ATCC 23355
4. *Escherichia. coli* ATCC 25922
5. *Escherichia. coli* ATCC 10536
6. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
7. *Serratia marcescens* ATCC 13082
8. *Citrobacter freundii*
9. *Shigella boydii* S-51
10. *Shigella sonnei*
11. *Proteus mirabilis* P-14
12. *Proteus vulgaris* ATCC 13315
13. *Proteus morgani* P-15
14. *Proteus rettgeri* P-17
15. *Proteus mirabilis* C-57
16. *Salmonella tiphymurium* ATCC 14025
17. *Salmonella enteritidis* S-16
18. *Salmonella typhi* S-33
19. *Salmonella paratyphi* AHA6 (S-24)
20. *Salmonella typhosa* S7H901 (S-38)
21. *Salmonella typhosa* S8 (S-39)
22. *Yersinia enterocolitica* Y-1
23. *Kluyvera sp* .
24. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
25. *Pseudomonas stutzeri*

A los 25 cultivos se les realizó el mismo perfil bioquímico tanto por el método convencional como por el micrométodo, la identificación por ambos métodos fue aceptable. Por el convencional y el micrométodo sólo 5 cultivos (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus morgani*, *Proteus rettgeri*) dieron un perfil bioquímico idéntico entre sí. Los 20 cultivos restantes dieron diferencias en una o varias pruebas bioquímicas pero esto no evitó que se pudieran identificar de acuerdo a la literatura, ya que estas pruebas no son determinantes para su identificación.

Las diferencias en las pruebas bioquímicas para estas cepas por ambos métodos se observa en la Tabla I, donde podemos resaltar que en la descarboxilación de aminoácidos presenta una mayor discrepancia en la determinación, como es el caso de la Arginina descarboxilasa que da una reacción negativa en el método convencional para los cultivos de *Salmonella typhimurium* ATCC 14025, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* ATCC 13082, *Citrobacter freundii*, *Shigella boydii*, *Shigella enteritidis*, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella paratyphi* AHA6, *Shigella sonnei*, y por el micrométodo (MIMITEC) se observa una reacción positiva.

Con la determinación de lisina descarboxilasa que da la reacción negativa en el método convencional para los cultivos *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella paratyphi* AHA6, *Pseudomonas aeruginosa* y en el MIMITEC da reacción positiva, para esta prueba *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 se observó lo contrario.

En la determinación de Ornitina descarboxilasa las cepas que dan reacción positiva en el método convencional son *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922 y reacción negativa en el MIMITEC. Siendo lo contrario de la reacción negativa en el convencional para los cultivos de *C. freundii*, *Yersinia enterocolitica*, *Kluyvera sp.* y reacción positiva para el micrométodo.

La fenilalanina da reacción negativa en el método convencional para los cultivos de *Yersinia enterocolitica*, y *Pseudomonas aeruginosa* y reacción positiva para el MIMITEC.

La producción del ácido sulfhídrico da reacción positiva en el método convencional para las cepas *Salmonella typhi*, *Salmonella typhosa S8*, *Salmonella typhosa S7H901* y reacción negativa para el MIMITEC. Mientras que da una reacción negativa en el convencional para *Proteus mirabilis C-57* y reacción positiva para el MIMITEC.

En urea da reacción positiva en el método convencional con *E. aerogenes* y reacción negativa en el MIMITEC, pero reacción positiva en el convencional con *Pseudomonas aeruginosa* y reacción negativa en micrométodo

La prueba de malonato da reacción positiva en el método convencional con *Pseudomonas aeruginosa*, pero reacción negativa para el micrométodo, en Citrato es reacción positiva en el convencional con *Pseudomonas stutzeri* y reacción negativa en el MIMITEC; con arabinosa da una reacción negativa en el convencional para *S. enteritidis*, y reacción positiva en el micrométodo; en inositol da reacción positiva en convencional con *S. typhosa S8* y reacción negativa para MIMITEC; para dulcitol da reacción positiva en convencional con *Enterobacter cloacae ATCC 23355* y reacción negativa en micrométodo; en sacarosa la reacción se presentó negativa por el convencional con *Enterobacter aerogenes* y reacción positiva en micrométodo, para xilosa da reacción negativa por el convencional con *Shigella boydii* y reacción positiva en micrométodo. Estos resultados se pueden apreciar perfectamente en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferencias de pruebas bioquímicas con ambos métodos

CEPA	MÉTODO	H ₂ S	MALO	CIT.	URE.	ARA.	INO.	DUL.	SAC.	XIL.	ADH.	FDA.	LDC.	ODC.
E.aerogenes ATCC 13048	CONVEN.												+	+
	MIMITEC												-	-
S. typhimurium ATCC 14025	CONVEN.										-			
	MIMITEC										+			
E.coli ATCC 25922	CONVEN.										-			+
	MINITEC										+			-
S. marcescens ATCC 13082	CONVEN.										-			
	MINITEC										+			
E.cloacae ATCC 23355	CONVE.							+						
	MINITEC							-						
C.freundii C-18	CONVEN.										-		-	-
	MINITEC										+		+	+
S.boydii S-51	CONVEN.										+			
	MINITEC										+			
S.enteritidis S-16	CONVEN.										+			
	MINITEC										+			
S.typhi S-33	CONVEN.	+												
	MINITEC	-												
E.coli ATCC 10536	CONVEN.										-			
	MINITEC										+			
E.aerogenes E-1	CONVEN.				+								+	
	MINITEC										+		+	
S.paratyphi AHA6 (S-24)	CONVEN.										-		+	
	MIMITEC										+		+	
S.typhosa 57H901 (S-38)	CONVEN.	+												
	MIMITEC	-												
S.thyphosa S8 (S-39)	CONVEN.	+					+							
	MIMITEC	-												
Y. enterocolitica (Y-1)	CONVEN.										+			-
	MIMITEC										+			+
Kluyvera sp.	CONVEN.													+
	MIMITEC													+
P.mirabilis C-57	CONVEN.	-												
	MIMITEC	+												
P.aeruginosa	CONVEN.		+		-									
	MIMITEC		-		+							+	+	
P.stutzeri	CONVEN.			+										
	MIMITEC			-										
S.sonnei S-54	CONVEN.										-			
	MIMITEC										+			

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En la tabla No. 2, se aprecian completamente los resultados del perfil bioquímico para los 25 cultivos, por los dos métodos.

TABLA No. 2 Comparación Entre Método Convencional y MMTEC

CEPAS	Klebsiella AICC 1383		Escherichia AICC 1308		Styphium AICC 1425		E. Coli AICC 2592		Shigella AICC 1202		E. Coli AICC 1222		Citrus CS		Pseudomonas PM		Pulsifer AICC 516		Staphylococcus SS		Serratia SS		Bifidobacterium BS		E. Coli AICC 1223		
	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	
BD	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NOB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HIS	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
QT	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
LFE	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
LAC	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SAC	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MIN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
MPL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
APA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ADD	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAL	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
DLL	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
FRM	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RFI	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MLO	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ACH	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
FDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
ONFG	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CF ₁₀₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CF ₁₀₃	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NOAL	-	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	-	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
IRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA No 2 Comparación Entre Método Convencional y MMTEC

CERCA	Progral P-16		Estrategia E-1		Progral P-17		Sistema S-19		Sistema S-20		Sistema S-21		Yanapacocha Y-1		Ayacucho A-1		Puntalón P-1		Puntalón P-2		Puntalón P-3		Sistema S-22			
	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC	COMEN	MMTEC		
BD	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
NB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
OT	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
LRE	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
LAC	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MN	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
ML	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
ARA	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
MEL	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
ADD	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ND	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SA	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
DL	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
XL	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
RM	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
RF	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MLO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
ACH	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	
FDA	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	
LDC	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
CC	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
ONG	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
CF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
CF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
MM	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	-	ND	-	ND	+	ND	+	ND	+	ND	-	ND
SR	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TRE	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+

TESIS CON FALTA DE ORIGEN

6.2 Determinación de sensibilidad, especificidad y exactitud, en la identificación de los microorganismos prueba.

De acuerdo a la comparación de los métodos se determinó la eficiencia de ambos, donde se observan los diferentes porcentajes de sensibilidad, especificidad y exactitud para estos, métodos (método convencional y método MIMITEC), mostrados en la tabla 3, aquí se aprecia que la sensibilidad, especificidad y exactitud son mayores al 90 %.

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad y exactitud de los 25 cultivos

Nº	Cepa	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Exactitud (%)
1	E. aerogenes ATCC 13048	91.7	100	93.3
2	E. aerogenes E-1	95.2	77.8	90.0
3	E. cloacae ATCC 23355	95.7	100	96.7
4	E. coli ATCC 25922	94.1	92.3	93.3
5	E. coli ATCC 10536	100	88.9	96.7
6	K. pneumoniae ATCC 13883	100	100	100
7	S. marcescens ATCC 13082	93.8	92.9	93.3
8	C. freundii C-18	100	83.3	93.3
9	S. boydii S-51	100	92.0	93.3
10	S. sonnei S-54	100	94.7	96.7
11	P. mirabilis P-14	100	100	100
12	P. vulgaris ATCC 13315	100	100	100
13	P. morgani P-15	100	100	100
14	P. rettgeri P-17	100	100	100
15	P. mirabilis C-57	100	95.2	96.7
16	S. typhimurium ATCC 14025	100	91.7	96.7
17	S. enteritidis S-16	100	87.5	93.3
18	S. typhi S-33	90.9	100	96.7
19	S. paratyphi AHA6 (S-24)	100	88.2	93.3
20	S. typhosa S7H901 (S-38)	93.3	100	96.7
21	S. typhosa S8 (S-39)	86.7	100	93.3
22	Y. enterocolitica Y-1	100	88.2	93.3
23	Kluyvera sp.	94.1	92.3	93.3
24	P. aeruginosa ATCC 27853	83.3	87.5	86.7
25	P. stutzeri	80.0	100	96.7
-----	Promedio	95.95	94.10	95.29
-----	Desviación estándar	5.7456	6.3531	3.3416
-----	Coefficiente de variación	5.988	6.7514	3.5067

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.3 Determinación de reproducibilidad en un grupo de bacteriología.

La reproducibilidad encontrada en el grupo de bacteriología para cada prueba bioquímica se indica en la Tabla 4, donde se reporta el porcentaje de reproducibilidad de cada una de las pruebas.

Tabla 4. Porcentaje de reproducibilidad para cada sustrato bioquímico.

CEPA	NO ₃ (%)	H ₂ S(%)	V-P(%)	IND(%)	URE(%)	CIT(%)	ADH(%)	LDH(%)	ODC(%)	FDA(%)
E.aerogenes ATCC 13048	100	100	50	100	100	100	75	75	100	100
E.coli ATCC 25922	100	100	60	100	100	70	50	100	20	100
K.pneumoniae ATCC 13883	100	100	100	100	25	75	50	75	50	75
P.mirabilis	100	0	50	100	30	0	50	0	30	0
Promedio:	100	75.0	65.0	100	63.8	61.3	56.3	62.5	50.0	68.8

	ONPG(%)	MALO(%)	ADO(%)	ARA(%)	DUL(%)	GLU(%)	INO(%)	LAC(%)	MAN(%)	MEL(%)
E.aerogenes ATCC 13048	75	25	50	100	75	100	50	50	100	50
E.coli ATCC 25922	80	100	100	40	75	100	60	60	80	80
K.pneumoniae ATCC 13883	75	50	75	75	75	100	75	100	100	100
P.mirabilis	30	70	30	70	70	100	70	70	0	30
Promedio:	65.0	61.3	63.8	71.3	73.8	100	63.8	70.0	70.0	65.0

	RAM(%)	MAL(%)	RAF(%)	SAC(%)	SAL(%)	SOR(%)	TRE(%)	XIL(%)	GLUOF(%)
E.aerogenes ATCC 13048	75	75	25	75	75	50	75	75	75
E.coli ATCC 25922	80	75	60	60	60	60	80	100	100
K.pneumoniae ATCC 13883	100	100	75	75	75	75	100	100	100
P.mirabilis	30	0	100	30	70	0	100	100	100
Promedio:	71.3	62.5	65.0	60.0	70.0	46.3	88.8	93.8	93.8

Donde podemos resaltar que para Nitratos (NO₃), Indol (IND) y glucosa (GLU) es del 100 %, para xilosa (XIL), glucosa oxidofermentativa (GLU_{OF}) es de 93.8 %, para trehalosa (TRE) es de 88.8 %, para el ácido sulfhídrico (H₂S) es de 75.0 %, dulcitol (DUL) es de 73.8 %, arabinosa (ARA) y ramnosa (RAM) es de 71.3 %,

lactosa (LAC), manitol (MAN) y salicina (SAL) es de 70.0 %, Voges Proskauer (V-P), β -galactosidasa (ONPG), Rafinosa (RAF), melibiosa (MEL) es de 65.0 %, para urea, adonito (ADO) e inocitol (INO) es de 63.8 %, para lisina descarboxilasa (LDC) y maltosa (MAL) es de 62.5 %, para citrato (CIT) y malonato (MALO) es de 61.3 %, sacarosa (SAC) es de 60.0 %, arginina descarboxilasa (ADH) es de 56.3 % y ornitina descarboxilasa (ODC) es de 50.0 %, sorbitol (SOR) es de 41.3 %

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los ensayos tradicionales utilizados, (pruebas bioquímicas convencionales), generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en el medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no, lo que ayuda a una identificación.

Para llevar a cabo la identificación bioquímica de las cepas de referencia, fué necesario verificar la pureza de los mismos mediante la observación de la morfología microscópica y colonial.

En la práctica se encontró un gran número de ventajas que ofrece el método MIMITEC con respecto al método convencional; comúnmente los métodos convencionales se emplean tubos de vidrio de 13 x 100 mm a los que es necesario adicionar por lo menos 3 mL de medio de cultivo, para el MIMITEC se emplean microplacas de ELISA que constan de 96 pozos con capacidad de 250 μ L y se utilizan 100 μ L de medio de cultivo. Esto presenta una ventaja en cuanto a la disminución del tamaño del equipo y volumen de medio de cultivo empleados para las pruebas.

Otra de las ventajas es la lectura de algunas pruebas a menor tiempo (5 horas) de incubación tal es el caso para la hidrólisis de la ONPG o algunos carbohidratos (SOR, TRE, ARA, ADO). Si después de la interpretación a las 5 horas éstas se observan negativas; se tiene que revisar nuevamente a las 18 a 24 horas para corroborar que realmente son negativas o ya transformaron el sustrato, esto es para evitar falsos negativos, por que habrá algunas bacterias que su metabolismo es lento y transformarán el sustrato hasta las 24 horas.

La disposición de los pozos en la microplaca permite montar un número mayor de pruebas simultáneamente, ya que se pueden introducir diferentes pruebas y además realizarlas por duplicado, triplicado ó hasta donde permita el número de pozos.

Se observó que para llevar a cabo la identificación bioquímica de una cepa mediante los métodos convencionales se necesitaron 28 tubos y un total de 112 mL de medio de cultivo, en cambio en el MIMITEC se utilizó por duplicado 5.8 mL y por triplicado 8.7 mL del medio por cada microplaca.

El método MIMITEC resultó ser eficiente en la identificación de microorganismos (Enterobacterias y Pseudomonas), ya que en la comparación con el método convencional dió una sensibilidad de 95.95 %, especificidad 94.10 % y exactitud de 95.29 %, lo que indica que es confiable.

Durante el manejo de las microplacas se debe mantener la distancia entre los pozos, cuidar que el volumen del medio no sea excesivo y que la posición de las placas durante la incubación sea horizontal, también es muy importante mantenerlas dentro de una cámara húmeda puesto que el volumen con el que se hidrata es poco y fácilmente se puede secar con la incubación.

Los alumnos del grupo de bacteriología indicaron que fué un método rápido, preciso, que ayuda a realizar un análisis muy completo sobre la cepa a identificar, obteniendo resultados rápidos, es una técnica que les ayuda a disminuir la cantidad de reactivo utilizado, un costo menor, así como que fue una propuesta buena para innovar la enseñanza experimental.

8. CONCLUSIONES

- El MIMITEC puede ser empleado para la identificación bioquímica de Bacterias Gram negativas (*Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*), disminuyendo el material, tiempo de realización y por lo tanto resultando ser menos costosos que los métodos convencionales, además es posible introducir un número mayor de pruebas bioquímicas y llevarlas a cabo repetidas veces.
- El MIMITEC presenta grandes ventajas con respecto a los métodos convencionales por que disminuyen la cantidad de material, de medios y tiempo para llevar a cabo las pruebas, razón por la cual el costo resulta más bajo.
- Se controló la concentración y pH óptimos de para cada sustrato, para visualizar, diferenciar e interpretar las reacciones bioquímicas, del microorganismo en estudio, lo que permitió su identificación.
- Es necesario tener sumo cuidado con el manejo de las microplacas, debido al alto riesgo de contaminación que presenta el hecho de encontrarse los pozos tan cercanos, así como después para evitar la deshidratación del medio durante la incubación, por el volumen tan pequeño de inóculo.
- Se obtuvo una sensibilidad de 95.95 %, especificidad de 94.10 % y exactitud de 95.29 % para la identificación de las bacterias entéricas y pseudomonas, con respecto al método convencional.
- Para optimizar el método es necesario realizar un mayor estudio.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Ballows A., Hausler W. Et al. Manual of Clinical Microbiology American Society for Microbiology, 5ª. Ed.(1991).
2. Braude A.L. : Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1984.
3. Connolly P.f Sally. Et al. A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics. Journal of Applied Bacteriology 1997, Vol. 75, No. 5. Pág 456 – 462.
4. Contreras O.R., Roura G. Fernández D. Diagnóstico del urocultivo en 4 horas por el sistema Diramic 03. Latinoamericana de Microbiología Abril-junio 92 Vol. 34, No. 2 pág 83-86.
5. Fehilhaber k. And G. Krüger. The study of salmonella enteritidis growth kinetics using Rapid automated bacterial impedance Technique. Journal of Applied Microbiology 1998, Vol. 84, No. 6. June, pág 945 –949.
6. Garza Velasco Raúl.: Manual de Prácticas Bacteriología, (1994).
7. Hernández Gómez Luciano. Memorias del curso de Taxonomía Microbiana, llevado a cabo el 28 de febrero al 4 de marzo del año 2000. En la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez, Estado de Durango.
8. James B. Mycobacterium Tuberculosis in: Use and interpretation of tests in Infectious diseases. Speciality Laboratories. 4ª. Ed. CA, USA. 1996. p. 208-209.
9. Jawetz Ernest, L. Melnide Joseph, Adelberg Edward, Microbiología médica, Ed. El manual moderno S.A de C.V, México, D:F, 12ª. Edición. 1988. p. 185-255.
10. Klug W. & Cummings m. Recombinant DNA technology in: Concepts of Genetics. 5ª. Ed. Prentice-Hall. New Jersey. USA. 1997. p. 450-451.
11. Koneman W.E, Allen, D.S Dowell. Schereckenberger P.C. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas a color. Ed.Panamericana. 5ª. Ed. 1999. Buenos Aires.
12. Lehninger A. Et al. Tecnología del DNA recombinante. En. Principios de Bioquímica. 2ª. Ed. Editorial Omega. Barcelona, España. 1195. p. 996-998.

13. Lennette Edwin H. Balows Albert, et al. Manual of Clinical Microbiology, Editorial American Society for Microbiology, Washinton D.C. 1985. 4ª. Ed. p. 266-268.
14. Mac Faddin J.: Biochemical Test for Identificatium of Medical Bacteria., Lippincott Williams and Wilkins, Third edicion, 2000.
15. Murray P. R., Lawrence D.W, Kobayashi G.S. and Thompson J.H.: Microbiología Médica, Mosby C. 2ª Edición, Madrid, 1993.
16. Pajaro, M.C. L.I Barberis, I.A. Albesa. Utilización de medios diferenciales para la pigmentación de *Pseudomonas*. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 28: 1986.pag. 191-194.
17. Pereda Alardín Analilia, Salgado Vega Lilian, Mota de la Garza Lydia. Identificación de bacterias Láctica de interés industrial mediante micrométodos. Latinoamericana de Microbiologia. Enero-Marzo 40. Vol. 32. No. 1, pág. 24-29.
18. Perry j.D. Archerl, Joneses A.L et al. Detection of carboxy peptidases as taxonomic markers for Gram-negative bacteria. Letters in Applied Microbiology 1998, Vol. 26 No. 5 pág 359 – 362.
19. Ramirez Gama R.M, Luna Millán Velázquez Madrazo O. Vierna García L. Mejía Chávez A. Tsuzuki eyes G. Hernández Gómez L. Müggerburg I. Manual de Prácticas de Microbiología General 2001, México, D.F. 2001, Ed. Facultad de Química, pág. 165-195.
20. Renaud N.R. Francois, Freney Jean, Riegel Philippe. Multicenter Evaluation of the Update and Extended API (RAPID) Coryne Database 2.0. Journal of Clinical Microbiology. Dec, 1997, Vol. 35 No.12, pág 3122-3126.
21. Sonnenwith C.Alex; Jarett Leonanr. Gradwohl. Métodos y Diagnostico de laboratorio Clínico. 8ª. Ed. Editorial Panamericana. 1986. Pág. 1596.
22. Sydney m.finegold, Willpam J. Martin.: Diagnóstico Microbiológico; Panamericana, 6ª. Edición, 1982.
23. [http:// bilbo.edu.uv/microbio/identificacion.htm](http://bilbo.edu.uv/microbio/identificacion.htm)
24. <http://www.cl/diagnostics/tecnologia.htm>
25. http://www.encolombia.com/acovez24_reaccion21.htm.

26. <http://www.gomensoro.com/suelos.htm>.

27. <http://www.manaxx.com/lifili.htm>.

ANEXO 1.

ELABORACIÓN DE SUSTRATOS BIOQUÍMICOS EMPLEADOS EN MIMITEC.

Reducción de Nitrato:

Ingredientes:

- Extracto de carne	0.03 g
- Peptona	0.05 g
- Nitrato de potasio (KNO ₃)	0.01 g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 7.06 ± 0.01.

Esterilizar por autoclave a 121 °C, 15 libras, por 15 minutos, también puede esterilizarse por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reactivos para revelar la reacción

- 1) Reactivo A. (α-naftilamina 0.5 %).
- 2) Reactivo B (Acido Sulfanílico 0.8 %)

Adicionar una gotas del reactivo A y una gotas del reactivo B al pozo que contiene este medio.

Reacción positiva (+): color rojo en el medio o en la superficie (formación de un compuesto diazoico).

Reacción negativa (-): incoloro

Reacción negativa (-): una vez que fue incolora, adicionar polvo de Zinc, la coloración cambia a rojo.

Voges-Proskauer:

Ingredientes:

- Polipeptona	0.07 g
- Glucosa	0.05 g
- Fosfato Dipotásico (K_2HPO_4)	0.05 g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 6.89 ± 0.01 .

Esterilizar por filtración, mediante filtro milipore con membrana de $0.45 \mu m$ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación

Reactivos para revelar la reacción

1) α - naftol al 5 %

2) Hidróxido de potasio (KOH) al 40 %

Adicionar dos gotas de KOH y una gota de α -naftol.

Reacción positiva (+): color rojo en la superficie del medio o a sus orillas indicando presencia de acetoina.

Reacción negativa (-): no cambia de color la superficie del medio.

Producción de Indol:

Ingredientes:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - Peptona de caseína* | 0.2 g |
| - Cloruro de sodio (NaCl) | 0.5 g |
| - Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05 | 10.0 mL |

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 7.02 ± 0.01 .

Esterilizar por autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, o por filtración mediante un filtro millipore con membrana de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación

Reactivo para revelar la reacción

Reactivo de Ehrlich.

Adicionar dos gotas del reactivo al micropozo.

Reacción positiva (+): se observa rojo o un anillo rojo en la superficie del medio.

Reacción negativa (-): se observa incolora o ligeramente amarilla.

* La Caseína contiene 1.2 g de triptofano por cada 100 g.

Producción de Acido Sulfhídrico (Difco)

Ingredientes:

- Extracto de carne	0.03 g
- Extracto de levadura	0.03 g
- Peptona de caseína	2.00 g
- Lactosa	1.00 g
- Sacarosa	1.00 g
- Glucosa	0.10 g
- Tiosulfato de sodio	0.03 g
- Sulfato Ferrico	0.02 g
- Cloruro de sodio	0.01 g
- Rojo de fenol	0.0023 g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 7.10 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa ennegrecimiento dentro del micropozo

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio.

Reacción de la Ureasa de Christensen:

Ingredientes:

- Peptona	0.001 g
- Cloruro de sodio	0.005 g
- Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.002 g
- Glucosa (dextrosa)	0.001g
- Urea (20 %)	0.020 g
- Rojo de fenol	0.0013 g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada. No calentar por que se descompone la urea.

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 6.80 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 μ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa cambio de color del medio a un naranja intenso a rojo rosado intenso.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio naranja tenue.

Utilización de Citrato de Simmons:

Ingredientes:

- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	0.002 g
- Monofosfato de amonio $(NH_4)H_2PO_4$	0.01 g
- Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0.01 g
- Citrato de sodio	0.02 g
- Azul de bromotimol	0.0008 g

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 6.93 ± 0.0 .

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45μ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color verde bandera fuerte a un azul intenso.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio verde tenue.

Prueba de la β - galactosidasa (ONPG):

O-Nitrofenenil- β -D- Galactopiranosido.

Ingredientes:

- Agua peptonada		
Peptona (neopeptona)		0.1 g
Cloruro de sodio		0.05 g
Agua destilada		10.0 mL
- Solución ONPG		
ONPG		0.06 g
Buffer de fosfato de sodio 0.01 M pH = 7.5		10 mL

Preparación:

Buffer de fosfato de sodio 0.01 M pH 7.5: adicionar 1.38 g de Na_2HPO_4 , a 10 mL de agua destilada, disolver y mezclar. Ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 5 N.

Solución ONPG: se disuelve a temperatura ambiente y se esteriliza a por filtración con membrana millipore de 0.45 μm . Cubrir el tubo con papel aluminio, para evitar la exposición de la luz.

Agua peptonada: se colocan los ingredientes en un matraz erlenmeyer de 50 mL y se disuelve por calentamiento, se ajusta el pH = 8.0 a 8.4. Hervir 10 minutos aproximadamente, filtrar y reajustar el pH 7.40. Esterilizar por autoclave 115 ° C por 20 minutos.

Asépticamente se adiciona 1 parte de solución ONPG y 3 partes de agua peptonada, en un tubo estéril. Se cubre el tubo con papel aluminio.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C \pm 2 °C, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa una coloración de ligeramente amarilla a amarilla.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio incoloro.

Descarboxilación de aminoácidos:

Lisina Descarboxilasa (LDC).

Ingredientes:

- | | |
|-------------------------|---------|
| - L-Lisina (2%) | 0.2 g |
| - Base de Mouller (BBL) | 0.105 g |
| - Agua destilada | 10.0 mL |

Preparación:

Disolver la base de Mouller en el agua destilada, calentar si es necesario.

Dejar enfriar. Adicionar el aminoácido L-lisina.

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 5.93 ± 0.01 .

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45μ estéril y un tubo estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso ó violeta tenue.

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue.

Ornitina Descarboxilasa (ODC).

Ingredientes:

- | | |
|-------------------------|---------|
| - L-Ornitina (2%) | 0.2 g |
| - Base de Mouller (BBL) | 0.105 g |
| - Agua destilada | 10.0 mL |

Preparación:

Disolver la base de Mouller en el agua destilada, calentar si es necesario.

Dejar enfriar. Adicionar el aminoácido L-lisina.

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 5.95 ± 0.01 .

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45μ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso ó violeta tenue.

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue.

Arginina Deshidrolasa (ADH).

Ingredientes:

- | | |
|-------------------------|---------|
| - Arginina (2%) | 0.2 g |
| - Base de Mouller (BBL) | 0.105 g |
| - Agua destilada | 10.0 mL |

Preparación:

Disolver la base de Mouller en el agua destilada, calentar si es necesario.

Dejar enfriar. Adicionar el aminoácido L-lisina.

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 5.91 ± 0.01 .

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45μ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso ó violeta tenue.

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue.

Fenilalanina-Desaminasa (FDA):

Ingredientes:

- DL-Fenilalanina (2 %)	0.2 g
- Extracto de levadura	0.03 g
- Glucosa (Dextrosa)	0.01 g
- Rojo de fenol	0.0002 g
- Agua destilada	10.0 mL

Preparación.

Disolver los ingredientes con el agua destilada, calentar suavemente, hasta completa disolución

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 6.55 ± 0.01 .

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45μ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reactivo para revelar la reacción

Reactivo de Cloruro Férrico (FeCl_3) al 10 %.

Añadir dos gotas del reactivo al micropozo.

Reacción positiva (+): se observa un color verde a verde oscuro.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio o del reactivo, naranja ambos.

Utilización de Malonato (MALO):

Ingredientes:

- Malonato de sodio	0.03 g
- Extrato de levadura	0.01 g
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.02 g
- Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	0.006 g
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.004 g
- Cloruro de sodio (NaCl)	0.02 g
- Glucosa (dextrosa)	0.0025 g
- Azul de bromotimol	0.0003 g
- Agua destilada	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar a un pH de 6.80 ± 0.01 .

Esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos, o por filtración mediante un filtro millipore con membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por 18 a 24 horas.

Interpretación

Reacción positiva (+): se observa color verde tenue a azul fuerte.

Reacción negativa (-): no hay cambio en el color del medio (ligeramente amarillo).

Fermentación de Carbohidratos (GLU, ADO, ARA, DUL, INO, LAC, MAN, MEL, RAM, MAL, RAF, SAC, SAL, SOR, TRE, XIL, GLU_{OF}).

Ingredientes:

- Peptona de caseína	0.1 g
- Cloruro de sodio	0.5 g
- Carbohidrato (1.5 %)	0.15 g
- Rojo de fenol	0.0002 g
- Agua destilada	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y ajustar el pH con un potenciómetro.

Carbohidrato	pH	Carbohidrato	pH	Carbohidrato	pH
Glucosa (GLU)	7.42	Inocitol (INO)	7.25	Rafinosa (RAF)	7.36
Lactosa (LAC)	7.25	Manitol (MAN)	7.23	Sacarosa (SAC)	7.25
Adonitol (ADO)	7.25	Melibiosa (MEL)	7.25	Salicina (SAL)	7.41
Arabinosa (ARA)	7.29	Maltosa (MAL)	7.25	Trehalosa (TRE)	7.13
Dulcitol (DUL)	7.25	Ramnosa (RAM)	7.22	Xilosa (XIL)	7.23
Glucosa oxido Fermentativa (GLU OF)			7.21		

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 μm estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C \pm 2 °C, por 18 a 24 horas.

Interpretación

Reacción positiva (+): se observa un color amarillo tenue a amarillo fuerte.

Reacción negativa (-): no se observa cambio del medio o se observa un color rosa-rojizo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Solución salina 0.85 % estéril

Pesar 0.85 g de cloruro de sodio, disolver en agua y llevar a volumen de 100 mL, esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Cámara de humedad

Caja pequeña de polietileno de alta densidad, con un vaso de agua dentro de la caja.

ANEXO 2.

ELABORACIÓN DE REACTIVOS REVELADORES.

❖ **Determinación de Nitratos.**

Reactivo A: α -naftilamina 0.5 %

Disolver 0.5 g de α -naftilamina, en una solución de ácido acético 5 N y llevar a volumen en un matraz volumétrico de 100 mL, mezclar.

Reactivo B: Acido Sulfanílico 0.8 %

Disolver 0.8 g de ácido sulfanílico en una solución de ácido acético 5 N y aforar en un matraz volumétrico de 100 ml, mezclar.

Ambos reactivos conservarlos en recipiente de color ámbar, bien roturados.

❖ **Determinación de Voges Proskauer:**

Reactivo 1) α -naftol al 5 %.

Disolver 5 g de α -naftol en alcohol etílico absoluto, en un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con el mismo disolvente, mezclar.

Reactivo 2) Hidróxido de potasio (KOH), al 40 %, agente oxidante.

Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua destilada, y aforar a 100 mL en un matraz volumétrico.

❖ **Determinación de Indol:**

Reactivo de Ehrlich.

Disolver 2 g p-dimetilamino-benzaldehído en 140 mL de alcohol etílico absoluto, adicionar lentamente 40 mL de ácido clorhídrico concentrado.

❖ **Determinación de Fenilalanina.**

Reactivo de Cloruro Férrico (FeCl_3) al 10 %.

Adicionar 10 g de cloruro férrico, en un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con agua y llevar a volumen con el mismo disolvente, mezclar.

ANEXO 3.

FIGURAS.

Figura 1. Medios Esteriles.



Figura 2. Llenado de medios por duplicado



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 3. Llenado de Medio, con división de la placa.

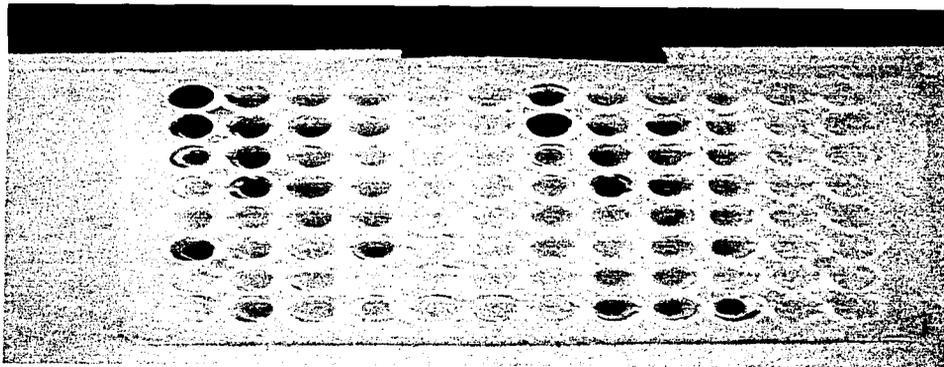
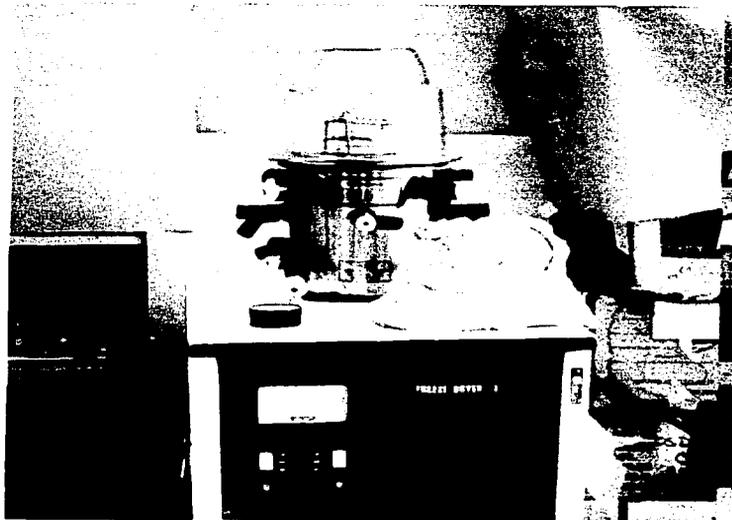


Figura 4. Liofilizadora



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 5-A. Llenado de medios por triplicado

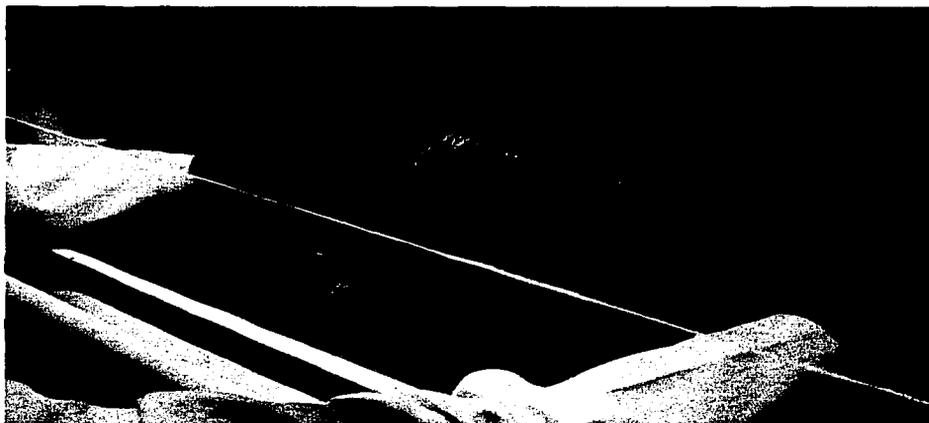
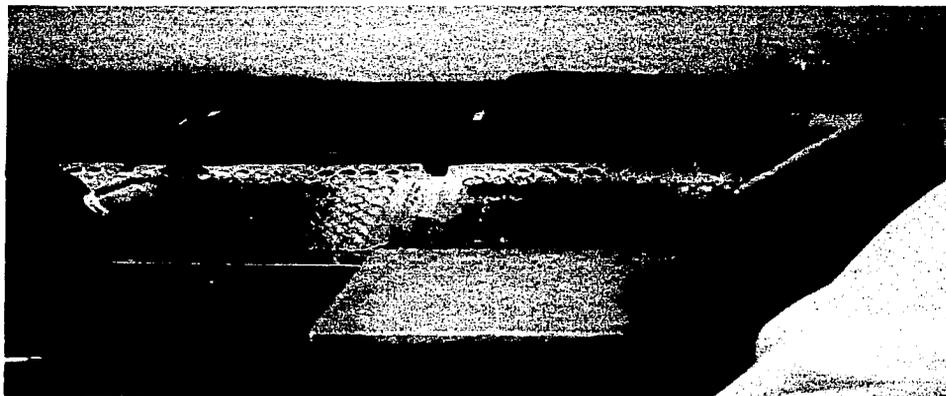


Figura 5-B. Llenado de microplaca.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 6. Liofilizadora



TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

Figura 7-A.

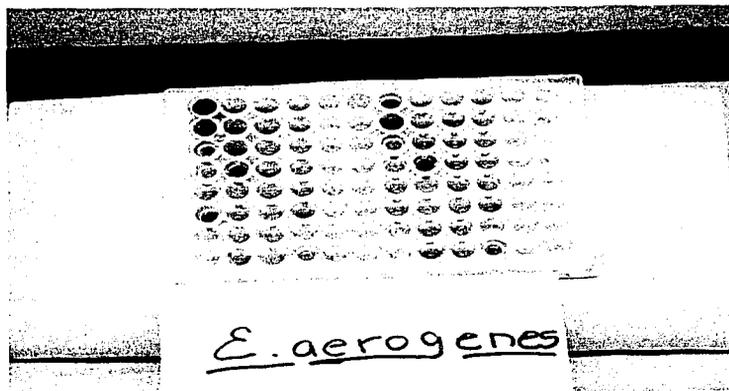


Figura 7-B.

