



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“COMPENDIO DE PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA APLICADO A LA DOCENCIA
PARA LA ASIGNATURA DE BACTERIOLOGÍA (LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

LAURA DIANA TAMEZ RÍOS

ASESORA: Q.F.B. LETICIA CUBILLO CARRILLO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
EXÁMENES PROFESIONALES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Compendio de pruebas para la identificación de bacterias de importancia clínica aplicado a la docencia para la asignatura de Bacteriología (Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica)

Que presenta la pasante: **Laura Diana Tamez Ríos**
Con número de cuenta: **406013688** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Septiembre de 2013

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Dulce Ma. Ruvalcaba Sil	
VOCAL	M. en C. Ma. Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
2do. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/mmgm

A mi madre.

"Un libro, como un viaje, se comienza con inquietud y se termina con melancolía."

José Vasconcelos.

“Todo va, todo vuelve, eternamente rueda la rueda del ser. Todo muere, todo vuelve a florecer, eternamente corre el año del ser. Todo se rompe, todo se recompone de nuevo, eternamente se construye a sí misma la casa del ser. Todo se separa, todo se encuentra de nuevo, eternamente permanece fiel a sí mismo el anillo del ser. ”

Friedrich Nietzsche.

DEDICATORIAS

Sé que faltaran palabras y páginas para poder plasmar el gran amor que siento por ellos. A esos seres que la vida o Dios colocan que nos darán forma, estructura, cimientos, protección, formación, enseñanzas y alegrías a ustedes van estas breves palabras.

En este camino llamado “vida” se necesita un maestro, esa persona que nos muestra los caminos y nos brinda la libertad de elección y ciertamente yo tuve una grande a mi Madre la Mtra. Lety Ríos, a ti madre que eres el punto de referencia a seguir y llegar, por brindarme esa libertad, confianza, respeto, pero sobre todo apoyo de ser lo que yo quiera. Por brindarme todo lo que eres, porque nada de esto sería posible sin ti. Porque este trabajo es de las dos y porque ¡LO LOGRAMOS! Te amo mamá.

Pero en este camino se necesitan compañeros, aliados que hagan más sobrellevadero el trayecto, que nos enseñan algo nuevo cada día, que sacan lo mejor y lo peor de cada uno, que hacen que seamos la mejor versión de nosotros mismo; y yo tuve la fortuna de tener dos, mis hermanos Luis y Lety.

Luis porque has sido mi compañero de muchas aventuras, sonrisas, tristezas, enojos, lágrimas, travesuras, alegrías, de tantas cosas que no terminaría de nombrarlas. Porque me has mostrado que no importa que tan grande sea la piedra que se nos imponga o que uno busque, siempre hay que levantarse, continuar y seguir luchando por llegar a la meta. Que cada decisión que tomemos nos traerá una consecuencia de la misma forma y de las decisiones buenas o malas uno debe aprender para continuar creciendo. Y que no hay mejor medicina en esta vida que reírse de uno mismo. Te quiero hermanito.

Lety tú representas un antes y un después en mi vida, por enseñarme a pensar antes de hacer, que no basta soñar para ver nuestros sueños realizados, éstos requieren trabajo, esfuerzo, dedicación, y perseverancia para lograrlos. Por hacerme mejor persona cada día y que cada día se aprende algo nuevo. Y que el niño interno que llevamos adentro no hay que dejarlo morir ¡eh!. Te quiero tiritita.

Pero nada de esto podría ser posible si alguien no llegara y limpiara el camino, pusiera la flecha a seguir, a ti Abuelita Graciela (Sra. U.U, abuelita Chinita) a ti que sigues endulzando mi vida con tu presencia y mis oídos con tus experiencias, conocimientos y vivencias; a ti que aunque no “fuiste estudiada, preparada y educada en escuela de paga”, jaja, nos superas a todos en conocimientos y formación, porque también representas la persona que deseo llegar a ser. Y porque para sonreír, divertirse, y seguirse asombrando ante las maravillas de la vida no hay edad. Te amo Abuelita.

Y a todos aquellos que la vida se los llevó, gracias porque sin muchos de ustedes no estaría presente y nada de esto sería posible. ¡Los extrañamos!.

AGRADECIMIENTOS

A la institución más emblemática del país por su historia, tradiciones y prestigio, que me permitió iniciar una de las más extraordinarias travesías de mi vida. A la que hoy por día me siento orgullosa de pertenecer, a la UNAM, por permitirme ser parte de su comunidad y de su historia; porque la formación de esta gran institución rebasa sus aulas e instalaciones porque el orgullo de ser PUMA se lleva hasta el fin de los días. Citando al rector José Narro “Ingresar a la UNAM es complicado, alejarse de ella resulta imposible”, y espero que el tiempo confirme este argumento.

A la FESC que hoy forma parte de mí persona, la que representa un antes y un después en mi vida, la que se convirtió en mi segunda casa, porque es sus aulas no sólo obtuve calidad educativa sino formación de pensamiento crítico, de análisis, valores laicos, pero sobre todo una formación integral. Y porque los conocimientos y formación que me dejan rebasan sus instalaciones.

A mi asesora Q.F.B. Leticia Cubillo, profesora gracias por el tiempo, dedicación, paciencia y confianza para poder realizar este trabajo.

A los profesores que dejaron una huella no sólo por ser los académicos que son, sino por rebasar esa barrera y brindarnos algo más, a la profesora Ma. Eugenia Posadas por escucharme, aconsejarme, orientarme y brindarme sus conocimientos, porque Usted deja una gran huella en mí y espero poder seguir contando con su presencia en mi vida.

Y aquellos que sin lugar a duda seguirán en mi memoria profesor Zambrano, José Juan, Arcadia, Ma. Esther, Ana Laura, Eva María, Botello, Rodolfo Cruz, Marina, Roberto Díaz, Adriana Ganem.

A todas esas personas que tengo la fortuna de llamar amigos, a los que conocí antes, durante mi travesía para ingresar y en mi permanencia en la UNAM, por

todos los momentos que me brindaron y me siguen brindando al día de hoy, por los que no tuve la fortuna de compartir clases o escuela, a todos ustedes por ser mis compañeros de risas, fiestas, exámenes, trabajos, por ofrecerme su hombro para llorar, sus oídos para escuchar, sus palabras para consolarme o brindarme otra perspectiva de las cosas, por hacer esta etapa tan feliz. Sé que no es fácil pero no desistan, sigan caminando conmigo, a todos ustedes gracias.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	VII
INDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	XIII
INDICE DE TABLAS	XIV
PRESENTACIÓN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
CAPITULO 1	
<i>Staphylococcus</i>	6
PRUEBA DE COAGULASA	7
PRUEBA DE RESISTENCIA A LA NOVOBIOCINA	12
AGAR SAL MANITOL	16
CAPITULO 2	
<i>Streptococcus</i>	18
PRUEBA DE CAMP	22
PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA	27
PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA OPTOQUINA	31
PRUEBA DE BILIS ESCULINA	34
PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE HIPURATO.....	38
PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL	42
CAPITULO 3	
<i>Listeria</i>	45
PRUEBA DE CAMP	46
CAPITULO 4	
BACIOS ESPORULADOS (<i>Clostridium</i> y <i>Bacillus</i>)	48
PRUEBA DE LECHE TORNASOL.....	52
TINCIÓN SHAEFFER Y FULTON.....	58
CAPITULO 5	
<i>Brucella</i>	61
PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO	64

CAPITULO 6	
<i>Vibrio cholerae</i>	69
PRUEBA DE HILO MUCOIDE	71
AGAR TCBS	73
CAPITULO 7	
<i>Haemophilus</i>	77
PRUEBA DE SATELITISMO	80
CAPITULO 8	
<i>Enterobacteriaceae</i>	85
AGAR MACCONKEY	89
AGAR EMB	92
AGAR SALMONELLA-SHIGELLA	94
AGAR SULFITO DE BISMUTO	98
AGAR VERDE BRILLANTE	100
CAPITULO 9	
<i>Pseudomonas</i>	104
AGAR CETRIMIDA	106
AGAR P	107
AGAR F	108
CONCLUSIONES	111
REFERENCIAS	112

ABREVIATURAS

%	Por ciento
BHI	Agar infusión cerebro corazón
CAMP	Fenómeno lítico, se denomina prueba o reacción descrito por Christie, Atkins y Much-Petersen cuyos nombres proporcionan el acrónimo.
CFR	Factor de reacción de la coagulasa
CHCl ₃	Cloroformo
col.	Colaboradores
cm	Centímetro
CNA	Agar Columbia con colistina y ácido nalidíxico
CO ₂	Dióxido de carbono
E _h	Potencial oxido-reducción
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB	Agar eosina azul de metileno
Fe ³⁺	Hierro III
FeC ₆ H ₅ O ₇	Citrato férrico
FeCl ₃	Cloruro férrico
g	Gramo
h	Hora
H ₂	Hidrogeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
KIA	Agar Hierro de Kligler's
LIA	Agar Lisina Hierro
LPS	Lipopolisacárido
M	Concentración Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros

NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
PbAc	Acetato de plomo
PEA	Agar con alcohol feniletílico
Ph	Potencial hidrógeno
PLET	Medio polimixina-lisozima-EDTA-acetato de talio
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SS	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>
SPE	Exotoxinas estreptocócicas pirógenas
TCBS	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
UFC	Unidad formadora de colonias
XLD	Agar xilosa-lisina-desoxicolato
µg	Picogramos

INDICE DE FIGURAS

No. de figura	Título de figura	Página
Figura 1.1	Resultado negativo sin formación de coágulo para la prueba de coagulasa.	11
Figura 1.2	Resultado positivo formación de coágulo para la prueba de coagulasa.	12
Figura 1.3	Resistente a la novobiocina no presenta inhibición.	15
Figura 1.4	Sensible a la novobiocina halo de inhibición ≤ 16 mm.	15
Figura 1.5	Crecimiento de <i>S. epidermidis</i> colonias rojas sin fermentación del manitol y Colonias amarillas, fermentación del manitol por <i>S. aureus</i> en agar Sal Manitol.	17
Figura 2.1	Producción de punta de flecha hemólisis completa para la prueba de CAMP para <i>Streptococcus</i> .	27
Figura 2.2	Resistente a la bacitracina.	31
Figura 2.3	Sensible a la bacitracina.	31
Figura 2.4	Prueba de Optoquina. Resistente, crecimiento no inhibido alrededor del disco.	34
Figura 2.5	Prueba de Optoquina. Sensible halo de ≥ 14 mm.	34
Figura 2.6	Prueba de Bilis Esculina. Resultado negativo ausencia de ennegrecimiento del medio.	37
Figura 2.7	Prueba de Bilis Esculina. Resultado positivo ennegrecimiento del medio.	38

Figura 2.8	Prueba de Hidrólisis de Hipurato. Resultado negativo no hay precipitado.	41
Figura 2.9	Prueba de Hidrólisis de Hipurato. Resultado positivo precipitado de color castaño, nubloso, insoluble.	42
Figura 2.10	Prueba de Tolerancia a la sal. Resultado negativo sin cambios en el caldo.	44
Figura 2.11	Prueba de Tolerancia a la sal. Resultado positivo turbidez y cambio de color.	44
Figura 3.1	Producción de una de raqueta de hemólisis completa para la prueba de CAMP en <i>Listeria</i> .	47
Figura 4.1	Prueba de Leche Tornasol. Resultado negativo sin cambios en el tubo.	57
Figura 4.2	Prueba de Leche Tornasol. Reducción del tornasol.	57
Figura 4.3	Prueba de Leche Tornasol. Fermentación tormentosa.	57
Figura 4.4	Prueba de Leche Tornasol. Producción de ácido.	58
Figura 4.5	Prueba de Leche Tornasol. Alcalinización.	58
Figura 4.6	Endoesporas de <i>Bacillus</i> ssp. por la técnica de Shaeffer y Fulton.	60
Figura 5.1	Prueba de producción de H ₂ S. Resultado negativo sin cambios.	68
Figura 5.2	Prueba de producción de H ₂ S. Resultado positivo color negro en la tira de PbAc.	68
Figura 6.1	Resultado positivo formación del hilo mucoide.	73
Figura 6.2	Agar TCBS sin inocular.	75

Figura 6.3	Crecimiento de <i>V. cholerae</i> en agar TCBS.	75
Figura 6.4	Crecimiento de <i>V. cholerae</i> en agar TCBS inverso de la placa.	76
Figura 7.1	Resultado positivo para la prueba de “Satelitismo”	82
Figura 8.1	Agar MacConkey sin inocular.	90
Figura 8.2	<i>Pseudomonas</i> ssp. no fermentador de lactosa.	91
Figura 8.3	<i>E.coli</i> fermentador de lactosa.	91
Figura 8.4	Agar EMB sin inocular.	93
Figura 8.5.	Colonias de <i>Proteus mirabilis</i> no fermentadoras de lactosa	93
Figura 8.6	Colonias de <i>E. coli</i> con presencia de brillo verde metálico debido a la fermentación de lactosa.	94
Figura 8.7	Agar SS sin inocular.	96
Figura 8.8	Colonias de <i>Enterobacter aerogenes</i> fermentador de lactosa.	96
Figura 8.9	Colonias de <i>Salmonella typhimurium</i> , producción de H ₂ S.	97
Figura 8.10	Colonias de <i>Shigella sonnei</i> no fermentador de lactosa.	97
Figura 8.11	Agar Sulfito de Bismuto sin inocular.	99
Figura 8.12	Colonias de <i>Pseudomonas</i> ssp.	99
Figura 8.13	Colonias de <i>Salmonella typhimurium</i> con reducción del bismuto producción de brillo metálico y producción de H ₂ S.	100

Figura 8.14	Agar Verde Brillante sin inocular.	102
Figura 8.15	Colonias de <i>Enterobacter aerogenes</i> .	102
Figura 8.16	Colonias de rosa a blanco de <i>Salmonella typhimurium</i> .	103
Figura 9.1	Colonias de <i>Pseudomonas</i> ssp. en agar Cetrimida.	109
Figura 9.2	Producción del pigmento piocianina en agar P.	109
Figura 9.3	Producción de fluoresceína en agar F bajo la luz UV.	110

INDICE DE ILUSTRACIONES

No. de ilustración	Título de la ilustración	Página
Ilustración 2.1	Modelo esquematizado de la realización de la prueba CAMP para <i>Sreptococcus agalactiae</i> .	26
Ilustración 2.2.	Reacción de la esculina con la sal Fe^{3+} para formar un complejo de color negro.	35
Ilustración 3.1.	Modelo esquematizado de la realización de la prueba CAMP para <i>Listeria</i> .	46
Ilustración 3.2.	Modelo esquematizado de la realización de la prueba CAMP para <i>Listeria</i> .	46

INDICE DE TABLAS

No. de la Tabla	Título de la Tabla	Página
Tabla 2.1	Clasificación de los estreptococos betahemolíticos de acuerdo al sistema de agrupación de Lancefield.	20
Tabla 8.1	Aspecto y características de las colonias en Agar MacConkey y XLD.	86

PRESENTACIÓN

La Microbiología es una ciencia que a través de la observación y la experimentación distingue las formas biológicas microscópicas y que en el caso de la Microbiología médica o clínica (Ibarra Arias, 2008) se ocupa fundamentalmente del estudio de los microorganismos que producen enfermedad, y se define como la ciencia que estudia las relaciones de morfología-estructura-composición y función microbiana, así como las alteraciones que producen los microorganismos en el hospedero humano. (De la Rosa Frailé & Prieto Prieto, 2003)

El diagnóstico microbiológico se fundamenta en la observación microscópica, el cultivo, el aislamiento y la identificación de los microorganismos patógenos presentes en una muestra obtenida de un determinado foco infeccioso.

El presente compendio comprende la identificación del agente infeccioso fuera del organismo, su caracterización en base a su morfología y su actividad bioquímica. (García Martos, Fernández del Barrio, & Paredes Salido, 1997)

Este compendio ha sido elaborado para que los estudiantes cuenten con una herramienta más de consulta y puedan encontrar la información de manera concentrada y adaptada a los materiales, métodos y técnicas realizados en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo I.

La elaboración de este trabajo está basada en los temas contemplados en la asignatura de Bacteriología para la carrera de Bioquímica Diagnóstica. Estos temas se organizan en 9 capítulos; éstos están ordenados por el nombre del género bacteriano; y cada capítulo comienza con una breve descripción de los microorganismos y de sus rasgos más sobresalientes como: caracterización en base a su morfología, proliferación en medios de cultivo, propiedades metabólicas y finaliza con las pruebas de identificación en el laboratorio.

Dentro de cada capítulo se presenta una investigación biblio-hemerográfica del tema en cuestión, para que el estudiante obtenga un panorama más amplio sobre el por qué de lo que se realiza.

Los procedimientos descritos en estos capítulos incluyen fotografías tomadas en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo I y en el laboratorio 10 del área de Posgrado, así como imágenes tomadas de diversas fuentes electrónicas, de los resultados positivos y negativos de cada una de las pruebas para que la información expuesta pueda visualizarse con facilidad y sea acorde a los procedimientos que se realizan en la Facultad.

Por último, se proporciona una serie de referencias en las que se fundamenta cada capítulo y que sirve para que el estudiante profundice más en los temas.

INTRODUCCIÓN

Para que una célula viva, crezca y se reproduzca, debe ser capaz de incorporar y transformar (mediante el metabolismo) los compuestos químicos que necesita para obtener energía (catabolismo), así como las moléculas que pasarán a formar parte de su material celular (anabolismo). Todas las reacciones químicas que se llevan a cabo son catalizadas por enzimas (catalizadores biológicos de naturaleza proteica y actividad específica), las cuales se clasifican, de acuerdo al lugar del ambiente celular donde actúan, en exoenzimas y endoenzimas. Las pruebas bioquímicas se emplean para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. (UNAM; Facultad de Química)

Una de la tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre.

Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso se utiliza una amplia variedad de métodos y criterios para establecer la identidad de un microorganismo. Estos métodos por lo común se pueden separar en dos categorías generales:

- ◆ Características genotípicas
- ◆ Características fenotípicas (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010)

Las características genotípicas se relacionan con la composición genética del microorganismo (naturaleza de sus genes y los ácidos nucleicos constitutivos). (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009) Las características fenotípicas se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010)

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos “fenotípicos o tradicionales”, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costo los hace más asequibles.

Todas las características fenotípicas conocidas son importantes, hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación bacteriana; en esta identificación fenotípica se establecen dos niveles de identificación:

En principio se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias, con las cuales se puede situar a las bacterias de manera provisional, en un género.

Por último, se realiza la identificación a nivel de especie. El empleo de las pruebas secundarias permite esta identificación. (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010).

En el compendio no se hace mención de la realización de las pruebas bioquímicas primarias y de pruebas secundarias, ya que este trabajo está enfocado en las pruebas y medios de cultivos no tratados en la asignatura previa (Microbiología General).

OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la búsqueda, recopilación, selección e integración de información mediante una revisión biblio-hemerográfica para desarrollar una herramienta de consulta de pruebas en complemento a la identificación bacteriana en microbiología que sea útil para el Licenciado en Bioquímica Diagnóstica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Elaborar una herramienta de consulta de diversas pruebas para la identificación de bacterias de relevancia clínica en el área hospitalaria, que facilite al estudiante adquirir los conocimientos teóricos y habilidades necesarias para tener un desarrollo profesional competitivo.
- Simplificar la obtención de conocimientos teóricos, previos a la realización de las prácticas en el laboratorio que sirva de marco de referencia.
- Desarrollar los métodos que se ajusten a las condiciones de material, equipo y tiempo requerido por el laboratorio de Microbiología.
- Describir los fundamentos de las pruebas de laboratorio para identificar a las bacterias de importancia en salud pública.

CAPÍTULO 1

Staphylococcus

El género *Staphylococcus* se compone actualmente de 33 especies, los *Staphylococcus* se hallan normalmente en la nariz, boca, garganta, en la saliva, sobre la piel, en el contenido intestinal y en las heces. (Divo, 1990)

A continuación se describen las especies que con mayor frecuencia se asocian con la patología humana: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* diferenciadas básicamente por la producción de coagulasa, la capacidad fermentativa del manitol y la resistencia a la novobiocina.

CARACTERES MORFOLOGICOS

Son cocos grampositivos, inmóviles, no esporulados, típicamente agrupados en racimos, aunque en muestras clínicas pueden verse aislados, en diplococos o cadenas. (Chans) Producen colonias características en agar sangre de carnero; las colonias habitualmente son lisas, mantecosas y ligeramente convexas con bordes enteros. Las colonias de algunas cepas de *S. aureus* pueden ser pigmentadas de amarillo o amarillo-naranja. Algunos *S. aureus* y algunas especies coagulasa-negativas pueden tener una zona evidente o difusa de β -hemólisis alrededor de las colonias. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

CARACTERES DE CULTIVO

En caldo nutritivo en 24 h a 37°C, se observa una densa turbidez; en agar nutritivo produce colonias redondas circulares, de borde continuo, consistencia cremosa y fácilmente emulsionables. El color varía con la especie. (Divo, 1990) El agar sal manitol es considerado el medio selectivo para la identificación de las especies *Staphylococcus* (Mac Faddin J. F., 2003) así como el agar sangre de carnero para observar el tipo de hemólisis que presente. (Divo, 1990)

El agar sal manitol contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7,5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los

Staphylococcus. La fermentación de manitol, indicada por el cambio del indicador de rojo fenol, facilita la diferenciación de la especie de *Staphylococcus*. Los *Staphylococcus* positivos a la coagulasa (*S. aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los *Staphylococcus* negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol. (BD, 2011)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Son aerobios y anaerobios facultativos, cuya temperatura óptima es de 37°C, y se desarrollan mejor en un pH ligeramente alcalino 7,6 (Divo, 1990), mesófilos con un amplio rango de tolerancia, y tolerantes a concentraciones medianas de sal (NaCl 7,5%). (Chans) Elaboran proteasas, lipasa, fosfatasa, gelatinasa. Produce hemolisina filtrable, en especial *S. aureus*. (Divo, 1990)

Es básicamente fermentativo, sin embargo, la presencia de enzimas desdobladoras de peróxidos como la catalasa, le permite desarrollarse en presencia de oxígeno y utilizar la cadena respiratoria como fuente de energía. (Chans)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Se disponen de varios métodos para la diferenciación de especies de *Staphylococcus* en el laboratorio de Microbiología se utiliza la capacidad fermentativa del microorganismo en agar sal manitol y las siguientes pruebas para hacer la distinción de especies de este género las cuales son:

- ◆ Coagulasa
- ◆ Susceptibilidad a la Novobiocina de 5µg.

PRUEBA DE COAGULASA

OBJETIVOS

Probar la capacidad del microorganismo de coagular el plasma por la acción de la enzima estafilo-coagulasa (coagulasa).

Identificar *Staphylococcus aureus* y diferenciarlo de otras especies dentro del género *Staphylococcus*.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

La coagulasa (estafilo-coagulasa) enzima producida por *S. aureus*, es relativamente estable al calor y resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 min. Esta proteína es excretada al medio extracelular por las cepas humanas de *S. aureus* y se inactiva con facilidad por las enzimas proteolíticas (proteasas).

Se desconoce la estructura química así como el mecanismo de acción de la estafilo-coagulasa, sin embargo algunos investigadores establecieron que la coagulación del plasma ocurre en dos pasos:

1. una reacción entre la enzima bacteriana, una procoagulasa, con un factor activador presente en el plasma para formar la coagulasa; y
2. la real coagulación del plasma activada por la coagulasa.

El factor bacteriano real es la procoagulasa y el factor del plasma es una fracción de la globulina similar pero no idéntica a la protrombina. Después se demostró que la coagulasa está presente en dos formas: la coagulasa ligada (unida a la célula) y la coagulasa libre. (Mac Faddin J. F., 2003)

Coagulasa ligada

La coagulasa ligada se detecta por el procedimiento en portaobjeto; esta enzima es conocida como factor de agregación, factor de afinidad o factor de aglutinación actúa sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina. (Alonso-Urmenta, y otros, 1999)

Se encuentra unida a la pared celular bacteriana y reacciona en forma directa con el fibrinógeno. Esta reacción determina que el fibrinógeno se altere, se precipite sobre la célula estafilocócica y genere la agrupación de las células cuando una suspensión bacteriana se mezcla con el plasma. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009) Su actividad no es inhibida por anticuerpos formados contra la coagulasa libre. (Mac Faddin J. F., 2003)

Coagulasa libre

La prueba de coagulasa en tubo detecta ambas coagulasas, la libre y la ligada. La coagulasa libre extracelular reacciona con una sustancia en el plasma denominada factor de reacción de la coagulasa o CFR. El CFR es un activador, una molécula modificada o derivada de la trombina. La coagulasa libre extracelular reacciona con el CFR para formar un complejo coagulasa-CFR; este complejo actúa de manera indirecta para convertir el fibrinógeno en un coágulo de fibrina.

En la prueba de coagulasa, el plasma es la fuente de protrombina (CFR) y fibrinógeno y el procedimiento se basa en la hipótesis de que la formación del coágulo es sólo debida a la estafilocagulasa. (Mac Faddin J. F., 2003)

PRECAUCIONES

Se recomienda el uso de plasma de conejo con EDTA, ya que no es degradado por las bacterias que utilizan el citrato, y que el plasma tenga la temperatura ambiente (22-25°C) antes de su uso para la prueba en tubo debido a que la reacción es más rápida. (Mac Faddin J. F., 2003)

Los estafilococos producen proteasas que pueden disolver el coágulo de fibrina (Sperber & Tatini, 1975), para determinar la verdadera actividad de la estafilocagulasa a fin de evitar posibles resultados falsos positivos (coágulos) y falsos negativos (lisis), se recomienda el agregado de inhibidores de proteasas al plasma de prueba para bloquear la acción de las proteasas. Los inhibidores son inactivos contra la verdadera estafilocagulasa o sustrato, pero bloquean las proteasas. La estafilocagulasa podrá coagular el plasma sin tener en cuenta cuál es el anticoagulante presente oxalato, citrato, heparina, etc. (Mac Faddin J. F., 2003) La prueba debe leerse periódicamente de modo que se eviten las reacciones de falsos negativos. Se recomienda que la prueba no sufra agitado excesivo durante este tiempo debido a que este puede causar que el coágulo se encoja, dando un falso negativo (lisis). (Sperber & Tatini, 1975)

Qian Qinfang y col. encontraron que el aumento del período de incubación de 2 a 4 h brinda una sensibilidad mucho mayor con una especificidad del 100% (Qian, Echelberger,

& Kirby, 2007) en caso de encontrarse un resultado negativo debe mantenerse a 37°C y leído de nuevo a las 24 h. (Mac Faddin J. F., 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Plasma de humano o de conejo con EDTA, o plasma fresco proveniente de sangre entera
- B. Escala de turbidez 0,5 de McFarland
- C. Caldo nutritivo

II. Cepas

- D. *Staphylococcus aureus*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- E. Positivo (+): *Staphylococcus aureus*.
- F. Negativo (-): *Staphylococcus epidermidis*.

IV. Fundamento

La estafiloagulasina (coagulasina), es una proteína capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, lo que resulta en la formación de un coágulo. La coagulasina produce una barrera de fibrina en el sitio de la infección estafilocócica.

V. Procedimiento

1. En un tubo de vidrio estéril agregar 0,5ml de plasma humano o de conejo.
2. Agregar 0,5 ml de suspensión bacteriana (ajustada a la escala de turbidez 0,5 de McFarland).
3. Rotar el tubo suavemente para lograr homogenización.
4. Incubar a 37°C de 2 a 4 h.
5. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Positivo: si se detecta cualquier grado de formación de coágulo.
- Negativo: si no hay formación de coágulo.

NOTA:

Cuando se realiza la prueba en tubo **no agitar el tubo** cuando se extrae de la incubadora. Puede ocurrir un resultado dudoso o falso negativo (lisis) debido a la

desintegración temprana del coágulo en la etapa de coagulación; **el coágulo no se vuelve a formar con la incubación adicional.**

Un resultado en tubo que muestra ser negativo después de 4 h a 37°C debe ser mantenido a temperatura ambiente (22-25°C) y leído de nuevo a las 18-24 h, debido a que algunas cepas producen fibrinolisinias con la incubación prolongada a 37°C, la cual provoca la disolución del coágulo; o porque producen una cantidad pequeña de estafilocagulasa con lo cual la actividad de coagulación sólo se observa después de 24 h de incubación. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999), (Mac Faddin J. F., 2003), (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009), (Álvarez Manrique & Mendoza, 1994)

RESULTADOS



Figura 1.1 Resultado negativo sin formación de coágulo.



Figura 1.2 Resultado positivo formación de coágulo.

Fotos tomadas en el Laboratorio de Microbiología L-513.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA

OBJETIVO

Diferenciación de los estafilococos coagulasa negativos (*Staphylococcus saprophyticus*) en base a su resistencia a la novobiocina de 5µg.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

La novobiocina es un antibiótico de uso restringido debido a su toxicidad, su uso se encuentra como herramienta experimental en la identificación de *S. saprophyticus* en base a la resistencia que presenta con otros *Staphylococcus* coagulasa negativos. Es un antibiótico que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, inhiben la actividad de la DNA girasa, involucrada en el rompimiento y reunión de tiras de DNA. (Molina López, 2012)

Alemida & Jorgensen desarrollaron un método para determinar la susceptibilidad o resistencia del antibiótico novobiocina de 5 µg en agar Mueller-Hinton. Tomaron de cuatro a cinco colonias de crecimiento proveniente de agar soya tripticasa con 5% de sangre de oveja, y posteriormente se inocularon en 5ml de caldo soya tripticasa. Los caldos se incubaron a 35°C durante 2 a 5 h, hasta que una turbidez visible apareció. La turbidez del caldo se ajustó con caldo estéril para obtener una densidad visualmente comparable a la de un estándar de 0,5 de McFarland.

Esta suspensión bacteriana se inoculó en placas con agar Mueller-Hinton; 3 a 5 min después se aplicó un disco de novobiocina de 5µg. A continuación las placas se colocaron en una incubadora a 35°C por un periodo de 16 a 18 h con las tapas invertidas.

Las placas se examinaron y se midió en milímetros el diámetro de la zona de inhibición con vernier calibrado. Un diámetro de la zona de inhibición de 16 mm parecía representar un punto de ruptura entre novobiocina sensibles y *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes.

Los aislamientos con un diámetro mayor de 16 mm fueron considerados susceptibles (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* y *S. capitis*), mientras que aquellos con un diámetro de 16 mm o menos se consideraron resistentes (*S. saprophyticus*). (Almeida & Jorgensen, 1982)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Discos de novobiocina de 5µg
- B. Placa de agar Mueller-Hinton
- C. Escala 0,5 de McFarland
- D. Solución salina o caldos estériles

II. Cepa

- E. *Staphylococcus saprophyticus*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- F. Positivo (+): *Staphylococcus saprophyticus*.
- G. Negativo (-): *Staphylococcus epidermidis*.

IV. Fundamento

La resistencia a la novobiocina es el parámetro que diferencia los estafilococos coagulasa negativos (*S. saprophyticus*) que tienen relevancia clínica de las especies menos relevantes. El método se fundamenta en la prueba de difusión de un antibiótico en disco de Kirby-Bauer.

V. Procedimiento

1. Usando un hisopo estéril o asa de inoculación, transfiera una muestra del crecimiento obtenido en un cultivo puro, coagulasa negativo de *Staphylococcus* a un tubo con solución salina o caldo estériles. Ajuste la turbidez para formar una suspensión cuya turbidez sea equivalente al patrón de 0,5 de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/ml). Agite bien la suspensión.
2. Introduzca un hisopo estéril en la suspensión y exprima el líquido sobrante presionando el hisopo contra la pared interior del tubo de ensayo y haciéndola girar.
3. Inocule la totalidad de la placa (sembrado masivo) de Mueller-Hinton.
4. Deje secar el inóculo durante unos 5 min con la tapa colocada.
5. Usando pinzas esterilizadas con una llama y enfriadas coloque un disco de novobiocina, presione suavemente sobre el disco para asegurar que entre en contacto completamente con el agar. **No cambiar el disco de posición una vez que se haya puesto en contacto con el agar** debido a que la novobiocina se difunde casi inmediatamente.
6. Incubar las placas en forma invertida (tapa hacia abajo) a 37°C durante 24 h.
7. Mida la zona de inhibición (desde el borde del disco), utilizando un vernier calibrado o regla.
8. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Sensible: una zona de inhibición de ≤ 16 mm.
- Resistente: una zona de inhibición de >16 mm. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999), (Sacsquispe Contreras Rosa, 2001)

RESULTADOS



Figura 1.3 Resistente a la novobiocina no presenta inhibición.

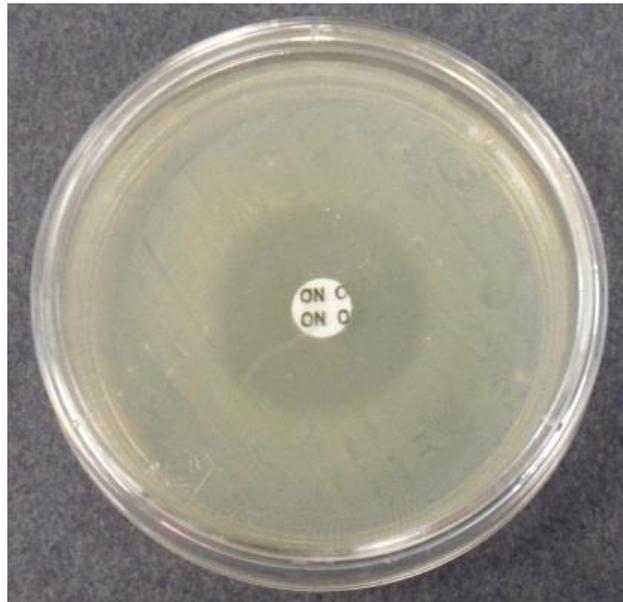


Figura 1.4 Sensible a la novobiocina halo de inhibición ≤ 16 mm.

Fotos tomadas en el Laboratorio de Microbiología L-513.

AGAR SAL MANITOL

USO

Agar sal manitol es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y el recuento de *Staphylococcus* a partir de muestras clínicas y no clínicas y su diferenciación según la fermentación de manitol.

PRINCIPIO

El agar sal manitol es una fórmula diseñada por Chapman para la diferenciación de estafilococos positivos a la coagulasa (*S. aureus*) de los estafilococos negativos a la coagulasa.

El agar sal manitol contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7,5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los *Staphylococcus*. La fermentación de manitol, se muestra por el cambio del indicador de rojo fenol, los estafilococos positivos a la coagulasa (*S. aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no producen cambio de color en el indicador de rojo fenol. (BD, 2011)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Agar Sal Manitol

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

B. Positivo (+): *Staphylococcus aureus*

C. Negativo (-): *S. epidermidis* y *Staphylococcus* diferentes de *S. aureus*

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba e inocular por técnica de dilución en la placa.
2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento.

RESULTADOS



Figura 1.5 Crecimiento de *S. epidermidis* colonias rojas sin fermentación del manitol y colonias amarillas, fermentación del manitol por *S. aureus* en agar Sal Manitol.

Foto tomada en el Laboratorio de Microbiología L-513.

CAPÍTULO 2

Streptococcus

Los *Streptococcus* pertenecen a la familia *Streptococcaceae*. Estos microorganismos son bacterias grampositivas, catalasa negativas, que tienden a desarrollarse en pares y cadenas. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999) De los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia en las infecciones humanas son *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* y los *Enterococcus*.

Los *Streptococcus* pueden clasificarse con base en su acción sobre el agar sangre, sus propiedades metabólicas y por reacciones serológicas de aglutinación y precipitación. (Divo, 1990)

HEMÓLISIS EN AGAR SANGRE

Los *Streptococcus* pueden producir en agar sangre de carnero tres tipos de hemólisis:

- ◆ α -hemólisis: lisis parcial de los eritrocitos que rodean una colonia, que produce un cambio de color gris-verdoso o amarronado del medio de cultivo. La coloración se debe a una alteración de la hemoglobina ocasionada por un sistema oxidoreductor de la célula bacteriana.
- ◆ β -hemólisis: lisis completa de los glóbulos rojos que rodean una colonia, que produce la eliminación total de la sangre del medio de cultivo.
- ◆ γ -hemólisis: ausencia de hemólisis y, en consecuencia, ninguna alteración del color del medio que rodea a una colonia. Los microorganismos que no producen hemólisis se denominan habitualmente “no hemolíticos”. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999)

Su crecimiento en agar sangre presenta los siguientes aspectos de las colonias:

- ◆ *S. pyogenes*: sus colonias suelen ser compactas, pequeñas, blanco grisáceas, transparentes a traslúcidas, mate o brillantes, rodeadas por un halo de betahemólisis que se ve con facilidad.

- ◆ *S. agalactiae*: sus colonias son más grandes que la de los *Streptococcus* grupo A (*S. pyogenes*); traslucidas a opacas, planas de superficie brillante, halo estrecho de betahemólisis; algunas cepas no son hemolíticas.
- ◆ *S. pneumoniae*: son colonias pequeñas, grisáceas, brillantes, las colonias tienden a ser deprimidas en el centro y se asemejan a una rosquilla (umbilicadas) cuando envejecen, esto es causado por la autólisis que se produce en la colonia; si el microorganismo tiene una cápsula de polisacárido, la colonia puede ser mucoide, son alfa hemolíticas.
- ◆ *S. viridans*: son colonias de diminutas a pequeñas, grises, borde elevado, lisas a mate, alfa hemolíticas o no hemolíticas.
- ◆ *Enterococcus*: presenta colonias pequeñas, de color crema a blanco, lisas, de borde uniforme, son alfa hemolíticas, beta hemolíticas o no hemolíticas. (Kenneth J. & C. George, 2004), (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

POR SU ACTIVIDAD FISIOLÓGICA Y PROPIEDADES METABÓLICAS

Los *Streptococcus* se han agrupado en cuatro grupos:

- ◆ Piógeno, que incluye *Streptococcus* grupo A (*S. pyogenes*), *Streptococcus* grupo B (*S. agalactiae*) y otros agentes causantes de infecciones agudas y mortales.
- ◆ Viridans, que incluye agentes como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, que son causantes de infecciones como endocarditis bacteriana subaguda.
- ◆ Enterococo, que incluye *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, que son agentes de infecciones genitourinarias, tracto respiratorio, endocarditis subagudas y peritonitis.
- ◆ Láctico, que incluye *Streptococcus lactis* y *S. cremoris*, no patógenos, pero de importancia industrial. (Divo, 1990)

REACCIONES SEROLÓGICAS DE AGLUTINACIÓN Y PRECIPITACIÓN

Algunas especies de *Streptococcus* se pueden clasificar serológicamente en función de los antígenos de hidratos de carbono no superficiales. El trabajo pionero de Rebecca Lancefield estableció el sistema de agrupación de Lancefield para los *Streptococcus* beta hemolíticos. Los antígenos detectados por el sistema de agrupación de Lancefield son polisacáridos de

pared celular (como en los *Streptococcus* grupos A, B, C, F y G) o son ácidos lipoteicoicos de pared celular (*Streptococcus* grupo D y especies de *Enterococcus*). Otros *Streptococcus* en particular los del miembro del grupo *viridans*, no poseen ninguno de los antígenos de pared celular de Lancefield conocidos. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999)

Tabla 2.1 Clasificación de los estreptococos beta hemolíticos de acuerdo al sistema de agrupación de Lancefield.

GRUPO DE LANCEFIELD	ESPECIE
A	<i>S. pyogenes</i>
B	<i>S. agalactiae</i>
C	<i>S. equi, S. dysgalactiae</i>
D	<i>S. bovis, S. equinus</i>
F	<i>S. milleri</i>

CARACTERES MORFOLOGICOS

Son cocos gram positivos o gram variables. Suelen estar agrupados en cadenas en las que las células ovoides se unen por sus extremos. La longitud de estas formaciones puede variar desde un solo par hasta cadenas continuas. Los *Streptococcus viridans* tienden a presentar células más alargadas. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999), (Kenneth J. & C. George, 2004)

Streptococcus pneumoniae son cocos de forma oval o lanceolada agrupados típicamente en pares y en ocasiones en cadenas cortas, la forma típica es un diplococo cuyos lados adyacentes son redondos y los extremos distales más agudos mostrando apariencia lanceolada, de bala o de llama de bujía. Presentan una cápsula bien definida; cuando forman cadenas poseen una cápsula común. (Divo, 1990)

CARACTERES DE CULTIVO

Crecen poco o no lo hacen en medios simples, pero se desarrollan bien en medios enriquecidos con suero hemático, sangre completa, líquido ascítico y pleural. (Divo, 1990) Deben cultivarse en placas de un medio adecuado con sangre para soportar el desarrollo de estos microorganismos exigentes como agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate, agar

soya triptica, proteosa peptona, caldo Todd-Hewitt, caldo tioglicolato o infusión cerebro corazón, agar CNA (agar Columbia con colistina y ácido nalidíxico) y PEA (agar alcohol feniletílico). (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009), (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999)

Las especies de *Enterococcus* crecen a una temperatura óptima de 35°C, pero la mayoría de las especies pueden crecer entre 10°C y 45°C, crecen en caldo soya triptica conteniendo 6,5% de NaCl e hidrolizan la esculina en presencia de sales biliares. (Norman, Chaves, & Garcia, 2006)

En agar sangre de carnero los *Streptococcus* pertenecientes a los grupos A, B, C, F y G son beta hemolíticos, en tanto que la mayoría de las especies de *Enterococcus* y los estreptococos del grupo D son alfa hemolíticos o no hemolíticos. El agar sangre de carnero no soporta el crecimiento de *Haemophilus haemolyticus* o de *Haemophilus parahaemolyticus*; por lo tanto, las pequeñas colonias beta hemolíticas obtenidas en agar sangre de carnero a partir de muestras clínicas son en general *Streptococcus*. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999)

Algunas cepas requieren de atmósferas elevadas en CO₂ (5-10%), lo cual incrementa el crecimiento y la actividad hemolítica. (Norman, Chaves, & Garcia, 2006)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Los *Streptococcus* son inmóviles, no esporulados, son anaerobios facultativos, oxidasa negativos, catalasa negativos, y los de importancia médica son homofermentadores, lo que significa que el único producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999) Crecen bien en un pH ligeramente alcalino y la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. No forman pigmentos. Los *Enterococcus* tiene la capacidad de hidrolizar la esculina, en presencia de bilis. (Divo, 1990)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Para poder apreciar en su totalidad el espectro de enfermedades producidas por este grupo de microorganismos, a continuación se expondrá los métodos de identificación que se utilizan en el laboratorio.

CAMP

- ◆ Sensibilidad a la Bacitracina
- ◆ Sensibilidad a la Optoquina
- ◆ Hidrólisis de Bilis y Esculina
- ◆ Hidrólisis de Hipurato
- ◆ Tolerancia a la sal

PRUEBA DE CAMP

OBJETIVOS

Determinar la capacidad de los *Streptococcus* del grupo B de producir y elaborar el factor CAMP, que actúa de manera sinérgica con la β -hemolisina estafilocócica (β -lisina) sobre eritrocitos ovinos o bovinos para producir un fenómeno lítico en la unión de los dos microorganismos.

Diferenciar e identificar de manera presuntiva cepas humanas o animales de *S. agalactiae* de otras especies de *Streptococcus* cuando se incuban en aerobiosis o en condiciones reducidas de oxígeno (gas pack).

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

El fenómeno lítico se denomina prueba o reacción CAMP que fue descrito por primera vez en 1944 por Christie, Atkins y Munch-Petersen, cuyos nombres proporcionan el acrónimo (CAMP) de la prueba. (Álvarez Manrique & Mendoza, 1994), (Mac Faddin J. F., 2003)

La prueba de CAMP es ampliamente utilizada para la identificación presuntiva de *S. agalactiae*. La reacción de la prueba consiste en la lisis, por el factor CAMP de los *Streptococcus* del grupo B, de eritrocitos de oveja, previamente expuestos a la toxina β -lisina. Un nutriente de la placa de agar sangre de oveja se emplea en la prueba de CAMP. Una cepa de *S. aureus* productora de β -lisina se raya diametralmente a través de la placa y, a continuación el *Streptococcus* a ensayar se inocula en ángulo recto con, pero sin tocar, el inóculo de *Staphylococcus*, y la placa se incuba durante la noche a 37°C. La producción del factor CAMP se manifiesta por una zona de hemólisis clara vidriosa en la zona oscura de

agar sangre al lado del *Staphylococcus* que produce β -lisina. La mayoría de los investigadores han encontrado pocas dificultades en la producción de una prueba de CAMP positiva con *Streptococcus* grupo B. (Phillips, Tapsall, & Smith, 1980)

La prueba CAMP se basa en el hecho de que los *Streptococcus* del grupo B producen un factor (factor CAMP) que actúa de manera sinérgica con la β -hemolisina de *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* en un medio de agar sangre ovina o bovina. El sinergismo es una acción coordinada o correlacionada por dos o más microorganismos; el sinergista, factor CAMP, es un adyuvante de la acción de otro microorganismo.

Ciertas cepas de *S. aureus* subesp. *aureus* produce una β -hemolisina difusible (también denominada β -toxina, β -lisina o β -estafilolisina). La β -lisina posee actividad (hemólisis, lisis) de fosfolipasa C (esfingomielinasa) frente a eritrocitos ovinos o bovinos e hidroliza la esfingomielina producida por los eritrocitos.

La β -hemolisina de *S. aureus* subesp. *aureus* es una hemolisina calor-frío para las células de oveja; la extensa lisis de eritrocitos no ocurre durante la incubación primaria a 37°C, si bien el posterior enfriamiento a temperatura ambiente o a 4°C revela la lisis por una zona clara de hemólisis central en el área oscurecida. La reacción lisina-sustrato tiene lugar a 37°C sin lisis; el shock frío a 25°C o menos precipita la lisis visible.

El factor CAMP es una proteína difusible, extracelular, termoestable, producida por los *Streptococcus* del grupo B que lisa los eritrocitos de rumiantes tratados con β -hemolisina estafilocócica manifiesta sinergismo específico con la esfingomielinasa C sobre la sangre de oveja y de buey. Es más eficaz cuando se presenta antes o casi simultáneamente con la hidrólisis enzimática de la esfingomielina. Su acción depende de una concentración relativamente alta de factor y de una velocidad más lenta de degradación del sustrato causada por la dilución de la esfingomielinasa. (Mac Faddin J. F., 2003)

Cuando los *Streptococcus* se desarrollan cerca del borde de una de las zonas oscuras uniformes de la β -lisina estafilocócica, el medio se aclara en el punto más cercano a las colonias de *Streptococcus*, lo que sugiere que un agente invisible o productos de ese agente han alcanzado los glóbulos rojos ya alterados por la β -lisina estafilocócica. La hemólisis de los eritrocitos se debe sin duda a la ruptura de las lipoproteínas. (Mac Faddin J. F., 2003)

PRECAUCIONES

La reacción de CAMP es una prueba confiable para la pronta identificación, de un presunto *Streptococcus* del grupo B. Sin embargo, hay varios factores importantes que se deben considerar cuando se realiza y evalúa los resultados de esta prueba. Resultados rápidos se obtienen cuando los inóculos de *Staphylococcus* y *Streptococcus* están en una etapa temprana del crecimiento y la placa de agar sangre de oveja y jarra de anaerobiosis es precalentada a 37°C. Bajo estas condiciones, puntas de flecha discernibles de la hemólisis, un resultado positivo, se ven generalmente después de 5 a 6 h de incubación. Un largo periodo de tiempo puede ser necesario para un resultado positivo cuando la prueba se realiza bajo condiciones aeróbicas. (Darling, 1975)

La superficie de las placas de agar debe estar completamente seca; cualquier condensación facilitará diseminación, el escurrimiento y la mezcla del inóculo. Debe utilizarse sangre citrada o defibrinada de oveja o de buey (Mac Faddin J. F., 2003); no se puede obtener lisis con sangre de caballo, conejo, humano, y cobayo. (Esseveld, Daniëls-Bosman, & Leijnse, 1958)

La reacción sólo es positiva si la hemólisis sinérgica en la zona de la β -lisina se extiende en toda la profundidad del agar sangre.

Esta prueba se utiliza para ayudar en la identificación de *Streptococcus* del grupo B. No debe confiarse en una única prueba para la identificación presuntiva de los microorganismos humanos o bovinos del grupo B; una reacción CAMP positiva debe utilizarse en combinación con otras pruebas y criterios (morfología colonial, bacitracina, PYR).

La prueba CAMP se utiliza sobre todo para la identificación dentro del género *Streptococcus*; sin embargo, el fenómeno hemolítico sinérgico también se encuentra entre algunas especies de otros géneros y se utiliza para diferenciar especies: *Pasteurella haemolytica* (+) de *P. multocida* (-) en agar sangre de oveja. Otros microorganismos CAMP positivos son *Burkholderia pseudomallei*, *Corynebacterium renale*.

El inóculo debe ser suficiente como para producir un crecimiento confluyente; la magnitud y la intensidad de la lisis depende del tamaño del inóculo estafilocócico; si los inóculos no

son perpendiculares entre sí, no ocurrirá la hemólisis en punta de flecha y se producirán falsos positivos si la cepa desconocida no es una especie de *Streptococcus*.

No incubar más de 24 h; con la incubación más prolongada las zonas reactivas son tan grandes que es imposible leer las reacciones vecinas. (Mac Faddin J. F., 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Placa de Agar Sangre de Ovino

II. Cepas

B. *Staphylococcus aureus* (productora de β -hemolisina)

C. *Streptococcus agalactiae*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

D. Positivo (+): *Streptococcus agalactiae*.

E. Negativo (-): *Streptococcus pyogenes*.

IV. Fundamento

La identificación presuntiva de los *Streptococcus* β -hemolíticos del grupo B pueden hacerse por medio de la prueba CAMP. La actividad hemolítica de β -hemolisina producida por la mayoría de las cepas *S. aureus* es intensificada por una proteína extracelular producida por los *Streptococcus* del grupo B. La interacción de la β -hemolisina con ese factor produce “hemólisis sinérgica” que, puede observarse fácilmente en una placa de agar sangre. Este fenómeno se observa tanto con los aislamientos hemolíticos como con los no hemolíticos de los *Streptococcus* del grupo B.

V. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar un inóculo denso de *S. agalactiae*, realizar un sembrado masivo solo a un cuarto de la placa de agar sangre y hacer una estría a la mitad.
2. Tomar el asa bacteriológica y enterrar el asa con el inóculo de *S. agalactiae* (pecas).
3. Tomar con pinzas esterilizadas con una llama y enfriadas, un disco de optoquina y un disco de bacitracina y colocarlos en la parte donde se realizó el

sembrado masivo en la placa de agar sangre. * **No colocar cerca de los bordes de la placa.**

4. Con un asa bacteriológica tomar un inculo denso de *S. aureus* y realizar una estría perpendicular a la de *S. agalactiae*, de 2 a 3 cm de longitud dejando un pequeño espacio entre ellas.
5. Incubar la placa de forma invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18 a 24 h sin CO₂.
6. Interpretar resultados.

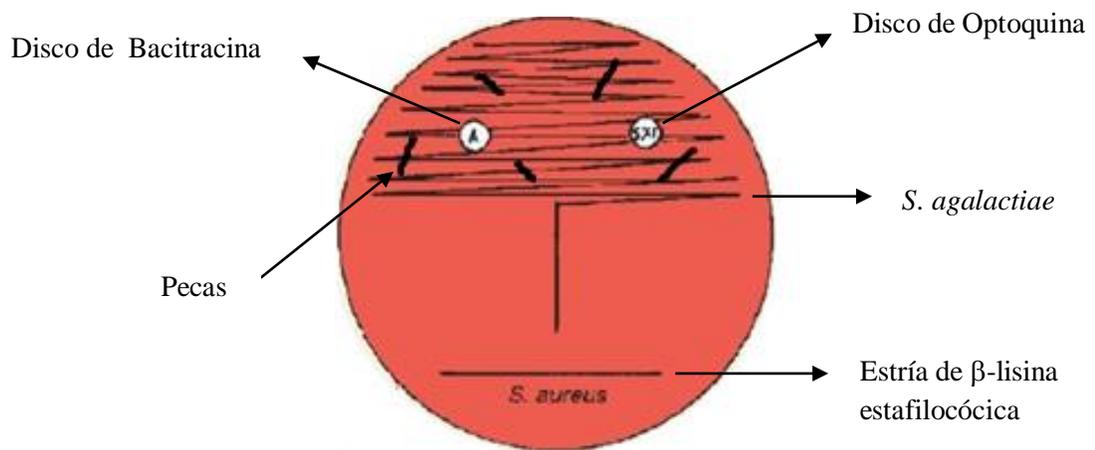


Ilustración 2.1 Modelo esquematizado de la realización de la prueba.

VI. Interpretación

- Positivo:
 - Producción de una punta de flecha de hemólisis completa.
- Negativo:
 - No existe formación de una punta de flecha. (BD, 2010), (Mac Faddin J. F., 2003)

RESULTADOS



Figura 2.1 Producción de punta de flecha hemólisis completa.

Foto tomada en el Laboratorio de Microbiología L-513.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA

OBJETIVOS

Determinar la sensibilidad de un microorganismo a la bacitracina Taxo A (0,04 unidades/disco).

Diferenciar *Streptococcus* β -hemolíticos del grupo A de otros *Streptococcus* β -hemolíticos.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

La bacitracina, un antibiótico polipeptídico aislado de *Bacillus subtilis*, activo por vía tópica y parenteral, está compuesto por tres componentes, denominados bacitracina A (el

más importante), B, y C. La bacitracina es activa sobre todo frente a bacterias grampositivas, por lo que a menudo se utiliza asociado a neomicina y a polimixinas (VADEMECUM, 2013), esta combinación de antibióticos se usa para tratar las infecciones en los ojos y en infecciones localizadas en la piel. (Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU, 2013)

Dependiendo de su concentración, la bacitracina puede ser bacteriostática o bactericida. Actúa inhibiendo la incorporación de aminoácidos y nucleótidos en la pared celular, pero también es capaz de dañar las membranas ya formadas produciendo la lisis y la muerte de la bacteria. La bacitracina es activa frente a un gran número de bacterias grampositivas como *Staphylococcus* (incluyendo cepas resistentes a las penicilinas), *Streptococcus*, cocos anaerobios, *Clostridium* y *Corynebacterium*. Algunas especies de gramnegativos, como los *Gonococcus*, *Meningococcus* y *Fusobacterium* son también sensibles a la bacitracina. (VADEMECUM, 2013)

La bacitracina es bactericida durante el crecimiento, ya que las enzimas líticas ubicadas en la parte interna de la pared celular abren las cadenas de peptidoglicano para formar “extremos libres”. La pared celular luego se rompe y el citoplasma fluye hacia el exterior.

La bacitracina es inactiva contra las células en reposo o cuando se encuentra en fase estacionaria. La bacitracina no es específica. (Mac Faddin J. F., 2003)

El método descrito por primera vez por Maxted reportó el uso de un antibiótico que es más inhibitorio para el grupo A que para los otros *Streptococcus* hemolíticos. La experimentación consistió en papel filtro sumergido en una solución de 5 unidades/ml, se secaron y se cortaron en pequeños cuadrados y se colocaron en placas con agar sangre previamente inoculadas. Las placas se incubaron durante 24 h. Algunas cepas fueron inhibidas por un área de 2 cm de diámetro, algunos mostraron sólo una ligera inhibición, y otros ninguna. Aquellos que muestran inhibición desde el borde del papel fueron considerados como sensibles y aquellos que no mostraron ninguna se registraron como bacitracina resistente. Las cepas que crecen bien hasta el borde del papel, pero no debajo de él se consideran también como resistentes.

Streptococcus del grupo A de Lancefield son más sensibles a la bacitracina que las cepas de otros grupos y bacitracina por lo tanto puede ser utilizado como un agente de diagnóstico rápido para estreptococos del grupo A en el laboratorio. A partir de ese momento Maxted estableció lo que conocemos hoy como la prueba de Bacitracina. (Maxted, 1953)

El uso comercial de los discos de bacitracina difiere en la concentración variando desde 0,02, 0,04, 0,01 unidades por ml por lo que los resultados de pruebas de bacitracina se interpretan de la siguiente manera: presencia o ausencia de una zona de inhibición o la elección de un tamaño de la zona específica como un punto de corte. (Coleman, Mcghie, & Tebbutt, 1977)

PRECAUCIONES

La precisión de la prueba de la bacitracina se mejora por el uso de la sensibilidad a un disco de SXT (sulfametoxazol-trimetoprima) en combinación con bacitracina aumenta la sensibilidad y el valor predictivo de la prueba de la bacitracina.

La prueba de la bacitracina es bastante exacta como una prueba presuntiva pero no es altamente específica. Solo deben ser investigados los *Streptococcus* β -hemolíticos (incluso *S. pneumoniae*) son sensibles a concentraciones bajas de bacitracina.

El inóculo bacteriano debe ser confluyente; un inóculo demasiado escaso producirá que los *Streptococcus* que no son del grupo A parezcan sensibles a la bacitracina. Las sensibilidades de bacitracina/SXT todavía se emplean en laboratorios donde no se cuenta con pruebas confiables para la agrupación serológica. (Mac Faddin J. F., 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Discos diferenciales de bacitracina Taxo A (0,04 unidades/ disco)
- B. Placa de Agar Sangre de Carnero

II. Cepa

- C. *Streptococcus* grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- D. Bacitracina sensible (S): *Streptococcus pyogenes* grupo A.

E. Bacitracina resistente (R): *Streptococcus agalactiae* grupo B.

IV. Fundamento

La bacitracina es un antibiótico que interfiere con la síntesis de peptidoglicano, un componente principal de las paredes celulares bacterianas. Esta prueba determina si el microorganismo es bien sensible o resistente. El conocimiento acerca de la susceptibilidad a bacitracina es valioso en la identificación de los cocos grampositivos.

V. Procedimiento

1. Seleccionar y tomar 3 ó 4 colonias con un asa bacteriológica del microorganismo de prueba *Streptococcus* β -hemolíticos.
2. Estriar el inóculo hacia abajo en el centro de una mitad de una placa con agar sangre de carnero.
3. Con un asa bacteriológica, diseminar el inóculo sobre la totalidad de la placa (sembrado masivo).
4. Con la ayuda de unas pinzas esterilizadas con una llama y enfriadas, colocar el disco de bacitracina Taxo A (0.04 unidades/disco) en el centro de la placa y presionar con suavidad para que el disco se adhiera al agar.
5. Incubar las placas en forma invertida (tapa hacia abajo) 24 h a 37°C.
6. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Sensible: cualquier tamaño de halo alrededor del disco.
 - **Reportar:** *Streptococcus* β -hemolíticos presuntivamente del grupo A por la prueba de bacitracina.
- Resistente: crecimiento no inhibido alrededor del disco.
 - **Reportar:** *Streptococcus* β -hemolíticos que presuntivamente no son del grupo A por la prueba de bacitracina.

NOTA: Si los resultados son negativos, volver a incubar 24 h. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999), (Mac Faddin J. F., 2003), (Virtual Unknown Microbiology)

RESULTADOS

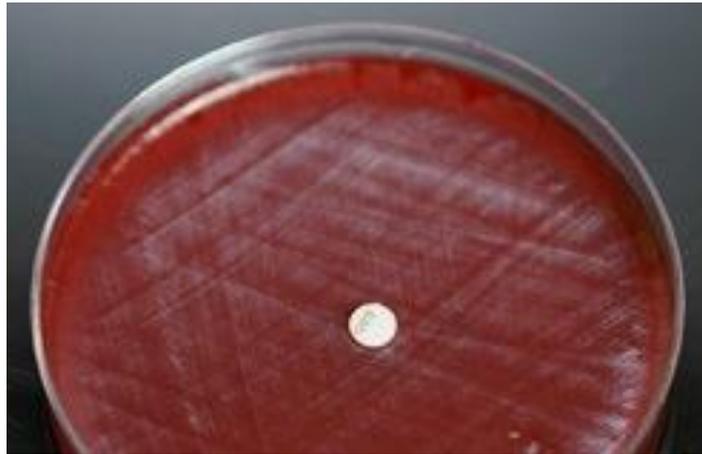


Figura 2.2 Resistente a la bacitracina.

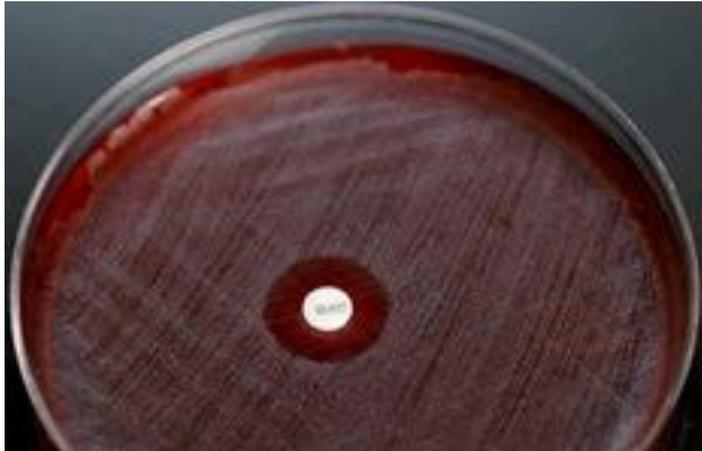


Figura 2.3 Sensible a la bacitracina.

Fotos tomadas de (Hardy Diagnostics).

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA OPTOQUINA

OBJETIVOS

Determinar la sensibilidad de un microorganismo a la sustancia química optoquina.

Mediante el disco de optoquina de 5µg diferenciar entre *Streptococcus pneumoniae* de otras especies de *Streptococcus α* hemolítico (viridans).

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

La optoquina es una sustancia química llamada, clorhidrato de etilhidrocupreína. La etilhidrocupreína, la base del disco de optoquina, es insoluble en agua. Sin embargo, clorhidrato de etilhidrocupreína es completamente hidrosoluble. La optoquina es un derivado del alcaloide hidroquinina. (Mac Faddin J. F., 2003)

La optoquina es ampliamente utilizado como un medio barato y fiable para identificar presuntivamente *S. pneumoniae*. Se conoció, cuando fue sintetizado por primera vez, para inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae*. Los estudios iniciales de Moore en 1915 mostraron que mientras optoquina fue ineficaz como agente terapéutico, inhibía el crecimiento de *S. pneumoniae* en caldo de cultivo. En 1955, Bowers y Jeffries mostraron que el papel filtro saturado de optoquina colocado sobre la superficie del medio de agar sangre de caballo no especificado sobre el que *S. pneumoniae* había sido inoculado con fiabilidad produjo una zona de inhibición. Esta sencilla prueba ha hecho posible distinguir *S. pneumoniae* de *S. viridans*, que era constantemente optoquina resistente. Bowen y col. posteriormente demostraron que la inhibición de optoquina fue independiente del tipo capsular cuando las pruebas de inhibición se realizaron en agar soya tripticasa suplementado con sangre humana. (Gardam & Miller, 1998)

Cada disco de papel filtro está impregnado con alrededor de 0,02 ml de una dilución acuosa 1:4,000 de la sustancia química secada a 37°C. Ésta es la concentración óptima de optoquina para la diferenciación de *S. pneumoniae*. (Mac Faddin J. F., 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Agar sangre de carnero
- B. Disco de optoquina 5µg

II. Cepa

- C. *Streptococcus pneumoniae*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- D. Positivo (+): *Streptococcus pneumoniae*.

E. Negativo (-): *Enterococcus faecalis*.

IV. Fundamento

La optoquina es una sustancia química, clorhidrato de etilhidrocupreína, un derivado de la quinina, inhibe en forma selectiva el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* a muy bajas concentraciones (5µg/ml o menores) y es bacteriostática a una concentración 1:500,000 a 1:100,000.

V. Procedimiento

1. Tomar una colonia aislada del microorganismo a estudiar con un asa bacteriológica o un hisopo estéril y estriar toda la placa por técnica masivo.
2. Extraer con pinzas esterilizadas con una llama y enfriadas, un disco de optoquina y aplicar en el centro de la placa.
3. Aplicar una suave presión sobre el disco con las pinzas estériles de modo tal que se adhiera a la superficie de la placa.
4. Incubar la placa invertida (tapa hacia abajo) a 37°C por 18 a 24 h en jarra con vela o en estufa con 5 a 7% de CO₂.
5. Medir con un vernier calibrado o regla el halo de inhibición (desde el borde del disco).
6. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Sensible (S): crecimiento inhibido alrededor del disco. Halo de 14 mm o mayor.
- Resistente (R): crecimiento no inhibido alrededor del disco. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999), (Mac Faddin J. F., 2003)

RESULTADOS

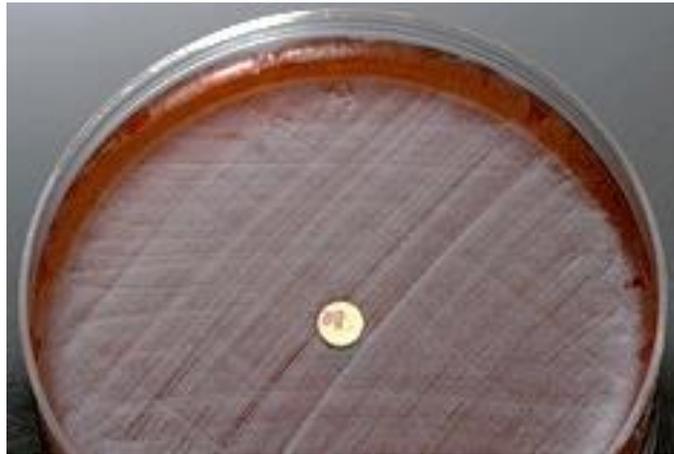


Figura 2.4 Resistente, crecimiento no inhibido alrededor del disco.

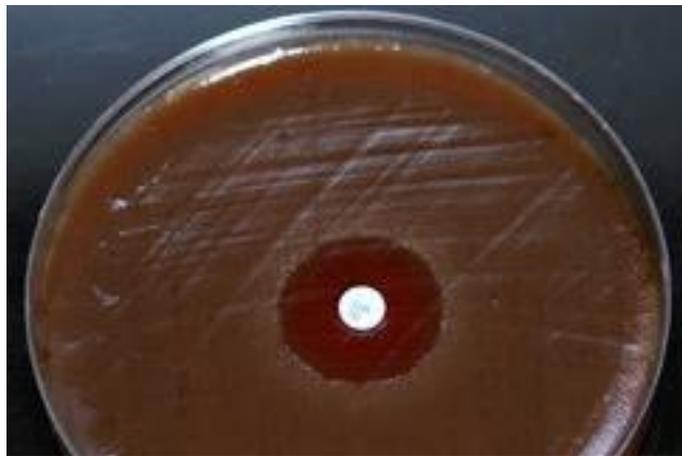


Figura 2.5 Sensible halo de ≥ 14 mm.

Fotos tomadas de (Hardy Diagnostics).

PRUEBA DE BILIS ESCULINA

OBJETIVOS

Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido esculina a esculetina y glucosa en presencia de bilis.

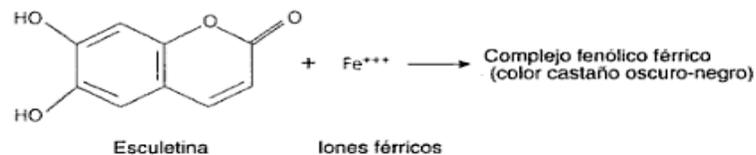
Identificar y diferenciar las especies de *Enterococcus* del grupo D de otros *Streptococcus* que no son del grupo D.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

La base de la prueba de esculina es la hidrolisis en la ligadura β de la esculina a esculetina por una β -glucosidasa constitutiva (la enzima esculinasa), la cual libera la molécula de glucosa. La esculina, un derivado de la cumarina (6- β -glucósido-7-hidroxycumarina), es hidrolizada a 6,7-dihidroxycumarina y glucosa.

La esculetina reacciona con una sal de hierro III (férrica; Fe^{3+}) para formar un complejo fenólico de color castaño oscuro o negro. El citrato férrico ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$) o el citrato férrico y de amonio es incorporado en el medio de bilis y esculina a una concentración de 0,05% como indicador de la hidrolisis de la esculina y produce la formación de esculetina. La hidrolisis habitual de la esculina es un procedimiento que ocurre en dos pasos: la cepa bacteriana debe:

- ◆ crecer en presencia de una concentración particular de bilis
- ◆ producir esculinasa para hidrolizar la esculina. (Mac Faddin J. F., 2003)



Aún se desconoce el mecanismo exacto, pero la hipótesis es

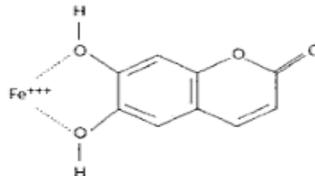


Ilustración 2.2. Reacción de la esculina con la sal de Fe^{3+} para formar un complejo de color negro. Tomada de (Mac Faddin J. F., 2003).

Con los *Enterococcus*, los resultados están disponibles en 4 h, utilizando un inóculo denso. Generalmente, la incubación durante la noche es requerida. (Edberg, Gam, Bottenbley, & Singer, 1976)

La bilis inhibe el crecimiento de la mayoría de los cocos grampositivos distintos de las especies de *Enterococcus* y a una concentración de 20% inhibe las bacterias anaerobias

facultativas. También inhibe los *Streptococcus* que no son del grupo D que hidrolizan la esculina.

PRECAUCIONES

Se recomienda finalizar la prueba a las 4 h para que se evite cualquier reacción falsa positiva por otros *Streptococcus*; un pH menor de 5,4 retardará la reacción y un pH mayor de 5,8 causará un cambio de color del medio amarillo que interfiere con la interpretación de los resultados.

La prueba de bilis y esculina sola no puede utilizarse para identificar los *Enterococcus*, pero una reacción positiva puede ser utilizada en combinación con otras pruebas para identificar de manera presuntiva las especies de *Enterococcus*; recomiendan una combinación de bilis y esculina y tolerancia a la sal (crecimiento en presencia de NaCl al 6,5%). (Mac Faddin J. F., 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Medio de bilis y esculina

II. Cepa

B. *Enterococcus faecalis*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

C. Positivo (+): *Enterococcus faecalis*.

D. Negativo (-): *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*.

IV. Fundamento

Los *Enterococcus* y algunos *Streptococcus* hidrolizan el glucósido y la esculina para producir esculetina y glucosa. La esculetina reacciona con la sal férrica para formar un complejo entre marrón oscuro y negro. El citrato férrico se incorpora en el medio como indicador de hidrólisis de la esculina y la formación resultante de esculetina. Se utiliza bilis para inhibir las bacterias grampositivas diferentes de los *Enterococcus*.

V. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar un inóculo denso de *Streptococcus* grupo D o *Enterococcus* y estriar el pico de flauta con un movimiento en forma de S.
2. Incubar en aerobiosis a 37°C; para *Streptococcus/Enterococcus* de 48 a 72 h y para *Enterobacteriaceae* de 18 a 24 h.
3. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Positivo:
 - Presencia de un color castaño oscuro a negro que difunde hacia el pico de flauta y hacia las colonias translúcidas a blancas.
 - La mitad o más del medio se tiñe de negro.
- Negativo:
 - No existe ennegrecimiento del medio.
 - Ennegrecimiento de menos de la mitad en los tubos después de una incubación de 72 h. (Mac Faddin J. F., 2003), (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009), (BBL, 2011)

RESULTADOS



Figura 2.6 Resultado negativo ausencia de ennegrecimiento del medio.



Figura 2.7 Resultado positivo ennegrecimiento del medio

Fotos tomadas en el Laboratorio de Microbiología L-513.

PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE HIPURATO

OBJETIVOS

Determinar la capacidad enzimática de un microorganismo para hidrolizar el hipurato de sodio (ácido hipúrico) a ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hipurato hidrolasa (hipuricasa). La actividad enzimática se determina por detección de cualquier producto final, ácido benzoico o glicina.

Diferenciar *Streptococcus* β -hemolítico del grupo B de β -hemolítico de los grupos A y D no enterococos y de especies de *Enterococcus* β -hemolítico.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

En el medio de prueba se usa una sal de hipurato, que forma benzoato de sodio y glicinato de sodio por hidrólisis. Los productos finales de la hidrólisis del ácido hipúrico, ácido benzoico y glicina, son insolubles en agua; sus sales son solubles en agua. La hipuricasa

produce hidrólisis en la unión peptídica del ácido hipúrico; la evidencia sugiere que la combinación de la enzima con el sustrato tiene lugar a través de la glicina. (Mac Faddin J. F., 2003) El producto de hidrólisis de hipurato, ácido benzoico, se detecta por su precipitación en un exceso de cloruro férrico (FeCl_3). Aunque la mayor parte de *Streptococcus* hidrolizan hipurato de sodio en 20 h, para aquellos aislados que son negativos, la incubación debe ser continuada durante otras 24 h a 46 h.

Para reducir el tiempo necesario para detectar la actividad hipuricasa, los investigadores Hwang y Ederer idearon una prueba rápida en la que el producto final, glicina, se detectó en 2 h utilizando ninhidrina. (Ederer & Lee, 1977)

Cuando el ácido hipúrico es degradado a ácido benzoico y glicina, el contenido de nitrógeno de aminos en el medio debe aumentar, a menos que la glicina sea usada por las bacterias. Un aumento grande en el nitrógeno de aminos constituye otra prueba de la hidrólisis.

La proteína (glicina), el hipurato residual y el benzoato son precipitados por el reactivo; sin embargo, los precipitados de proteína e hipurato son más solubles y se redisolven por agitación o en presencia de un exceso de FeCl_3 , mientras el benzoato permanece como precipitado insoluble. El benzoato férrico se separa del agua como una capa líquida o, en este caso, como un precipitado insoluble que es permanente. (Mac Faddin J. F., 2003)

PRECAUCIONES

La prueba no debe aplicarse indiscriminadamente a todos los grupos de *Streptococcus*; solo es útil para los *Streptococcus* β -hemolíticos de origen humano o bovino.

Después de agregar el reactivo de FeCl_3 , deben agitarse los tubos antes de interpretar los resultados, porque tanto la agitación como el exceso de FeCl_3 , ayudan a redisolver los precipitados solubles de hipurato y glicinato para dar resultados negativos. La omisión de agitar los tubos puede dar resultados falsos positivos si el hipurato no está hidrolizado.

No puede usarse ninhidrina para la prueba de hidrólisis de hipurato en medios de cultivo que contienen proteínas. La prueba debe contener sólo hipurato, ya que la ninhidrina puede reaccionar con cualquier aminoácido libre en el medio de desarrollo.

Un tiempo de reacción superior a los 10 min dará resultados positivos no deseados con los *Streptococcus* del grupo D o no enterococos. (Mac Faddin J. F., 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Caldo de Hipurato de Sodio
- B. Cloruro férrico acidificado (FeCl_3)

II. Cepa

- C. *Streptococcus agalactiae*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- D. Positivo (+): *Streptococcus agalactiae*, *Campylobacter jejuni*.
- E. Negativo (-): *Streptococcus salivarius*, *Campylobacter coli*.

IV. Fundamento

El hipurato es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando benzoato y glicina. La enzima hipuricasa y el agregado de agua produce hidrólisis en la unión peptídica del ácido hipúrico (hipurato) dando como productos finales ácido benzoico el cual va a reaccionar con el agregado de cloruro férrico acidificado y la glicina que va a ser detectada por el método de la ninhidrina.

V. Procedimiento

1. Inocular los tubos con una o dos gotas de desarrollo de 18 a 24 h de un cultivo puro confirmado de *Streptococcus* β -hemolítico; o con una a dos colonias aisladas de una placa de aislamiento original.
2. Incluir un tubo sin inocular como un control negativo y un control positivo (*S. agalactiae*).
3. Incubar a 37°C por 24 h.
4. Después de la incubación, centrifugar todos los cultivos turbios a 2500 rpm durante 10 min y usar el sobrenadante en el ensayo.
5. Transferir asépticamente una alícuota de 0,8 ml del sobrenadante a tubos de ensayo pequeños.
6. Añadir 0,2 ml de la solución de cloruro férrico a todos los tubos que contienen sobrenadante.

7. Inmediatamente agite suavemente. Dejar reposar 10 a 15 min con agitación ocasional.

8. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Positivo:

- Precipitado de color castaño, nubloso, insoluble que persiste después de 10 min.

Reportar: “*Streptococcus* del grupo B presuntivo por hidrólisis de hipurato”

- Negativo:

- El precipitado, si existe, se disuelve al agitar. El precipitado inicial desaparece los primeros 10 min.

Reportar: “*Streptococcus* que no son del grupo B por hidrólisis de hipurato”. (Mac Faddin J. F., 2003), (BBL, 2006)

RESULTADOS



Figura 2.8 Resultado negativo no hay precipitado.

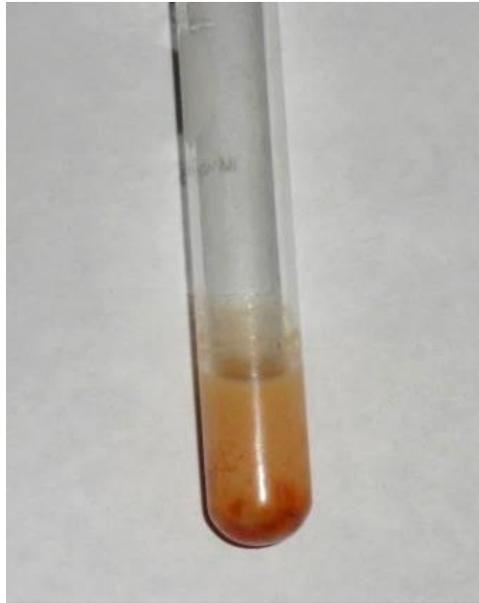


Figura 2.9 Resultado positivo precipitado de color castaño, nubloso, insoluble.

Fotos tomadas en el Laboratorio de Microbiología L-513.

PRUEBA DE TOLERANCIA A LA SAL

OBJETIVOS

Determinar la capacidad de un microorganismo de crecer en concentraciones altas de sal.

Diferenciar especies de *Enterococcus* de *Streptococcus* del grupo D (*Streptococcus bovis*).

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

Los *Enterococcus* se diferencian por su capacidad para crecer en presencia de 6,5% de NaCl, una prueba rápida que distingue *Enterococcus* de otros *Streptococcus* grupo D en un periodo de 8 a 24 h mediante el uso de un medio que contiene agar infusión cerebro corazón, NaCl, dextrosa, y púrpura de bromocresol. (Hussain Qadri, Nichols, & Qadri, 1978)

La digestión del tejido animal proporciona compuestos de nitrógeno y de carbono esenciales para el crecimiento bacteriano. La dextrosa es una fuente de energía. Púrpura de bromocresol es un indicador de la producción de ácido durante el metabolismo bacteriano; cambio de color de púrpura a amarillo. El cloruro de sodio sirve como agente selectivo y diferencial. Los *Enterococcus* son resistentes al alto contenido de sal (NaCl), que en las cepas sensibles interfiere con la permeabilidad de la membrana, y el equilibrio osmótico y electrocinético. (BBL, 2011)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Caldo con NaCl 6,5%

II. Cepa

B. *Enterococcus faecalis*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

C. Positivo (+): *Enterococcus faecalis*.

D. Negativo (-): *Streptococcus bovis*.

IV. Fundamento

Determinar la capacidad de un microorganismo de crecer en concentraciones altas de sal. Se utiliza para la identificación presuntiva de los microorganismos pertenecientes a los *Enterococcus* del grupo D, que poseen la capacidad específica de desarrollarse en presencia de NaCl al 6,5%. Como medio de prueba se utiliza caldo de infusión cerebro corazón con NaCl al 6,5% con esta concentración de sal el medio se hace semiselectivo para el desarrollo de *Enterococcus*.

V. Procedimiento

1. Tomar un inóculo denso del microorganismo de prueba con la ayuda de un asa bacteriológica y homogeneizar la muestra.
2. Incubar a 37°C por 24 h.
3. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Positivo: turbidez visible en el caldo, con o sin cambio de color, de púrpura a amarillo.

- Negativo: ausencia de turbidez y sin cambio de color. (BBL, 2011), (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Winn, 1999), (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

RESULTADOS

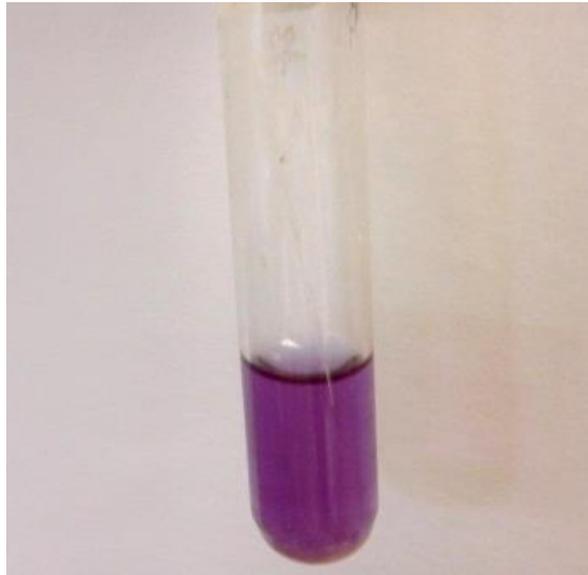


Figura 2.10 Resultado negativo sin cambios en el caldo.

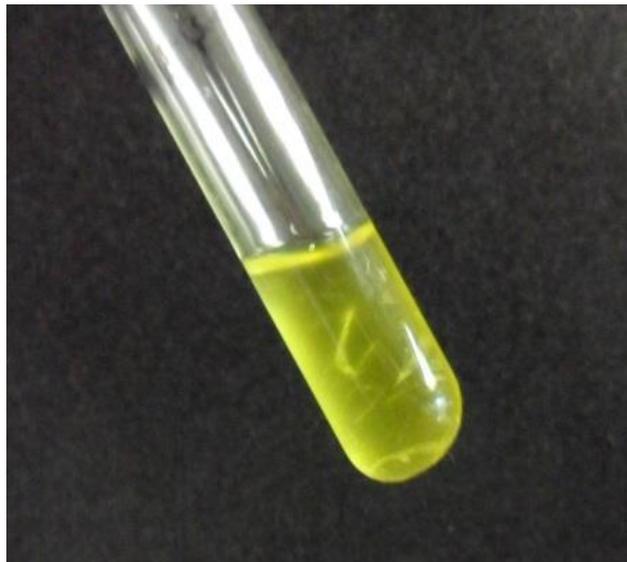


Figura 2.11 Resultado positivo turbidez y cambio de color.

Fotos tomadas en el Laboratorio de Microbiología L-513.

CAPÍTULO 3

Listeria

El género *Listeria* está formado por bacilos grampositivos. *Listeria* se ha dividido en seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovvi* subespecie *ivanovvi*, *L. ivanovvi* subespecie *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi* y *L. welshimeri*. (Koneman, y otros, 2008) De ellas, *L. monocytogenes* es la de mayor importancia en microbiología clínica.

CARACTERES MORFOLOGICOS

Es un bacilo grampositivo corto y regulares o coco bacilos que se halla en forma aislada o en cadenas cortas o en pares (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009) El microorganismo es móvil y muestra unos movimientos “tambaleantes”, sobre todo en frotis de “gota gruesa” en preparados de cultivos de caldo, también es evidente en un medio semisólido para motilidad, donde el microorganismo muestra un “paraguas” que se desarrolla en la superficie del medio en agar semisólido en tubo. (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009), (Koneman, y otros, 2008)

En agar sangre da origen a colonias puntiformes, circulares, lisas y translúcidas de color azul grisáceo o blanco grisáceo con una zona discreta de β -hemólisis. (Secretaría de Salud, 1995)

CARACTERES DE CULTIVO

Crece bien en agar sangre de carnero o conejo, agar triptosa y en agar chocolate; crece bien en los medio líquidos comunes. (Divo, 1990)

PROPIEDADES METABÓLICAS

El microorganismo crece en presencia de bilis al 40% e hidroliza la esculina, la glucosa y otros carbohidratos son fermentados sin producción de gas y produce acetoína, lo que conduce a una reacción de Voges-Proskauer positiva, presenta una reacción de catalasa positiva y oxidasa negativa. Todas las cepas de *L. monocytogenes* fermentan el α -metil-D-manósido y no fermentan la D-xilosa. La prueba CAMP está indicada positiva para *L. monocytogenes*. (Koneman, y otros, 2008) Es un microorganismo aerobio o microaerófilo, cuyo crecimiento se incrementa cuando se incuban en una concentración de

5 a 10% de CO₂. La temperatura óptima para su crecimiento es 37°C, pero obtienen buen crecimiento con temperaturas hasta de 25°C. La tinción Gram, prueba de catalasa y la movilidad, son pruebas que permiten diferenciar esta especie de *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Corynebacterium*. (Divo, 1990)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

En el Laboratorio de Microbiología se utiliza la prueba de CAMP para la identificación presuntiva de este microorganismo y para diferenciarla de otras especies de *Listeria*. Se utilizan dos métodos para realizar la prueba; se puede utilizar el procedimiento mencionado en el capítulo 2 únicamente que sin los discos de bacitracina y optoquina. En la ilustración 3.1 se muestra su realización.

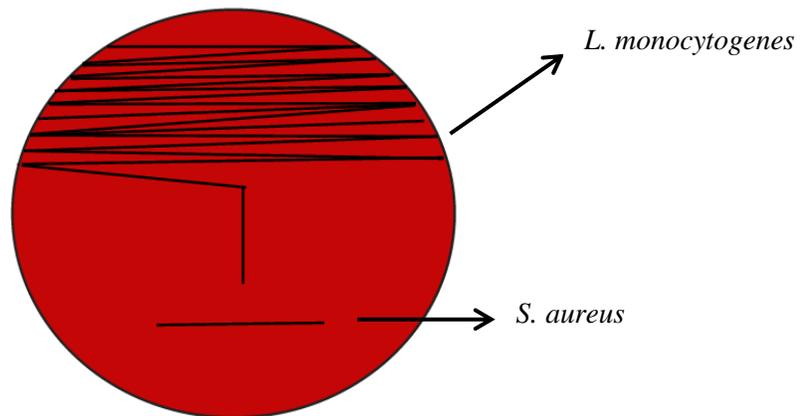


Ilustración 3.1 Modelo esquematizado de la realización de la prueba

Y también se puede utilizar el método que se muestra en la ilustración 3.2.

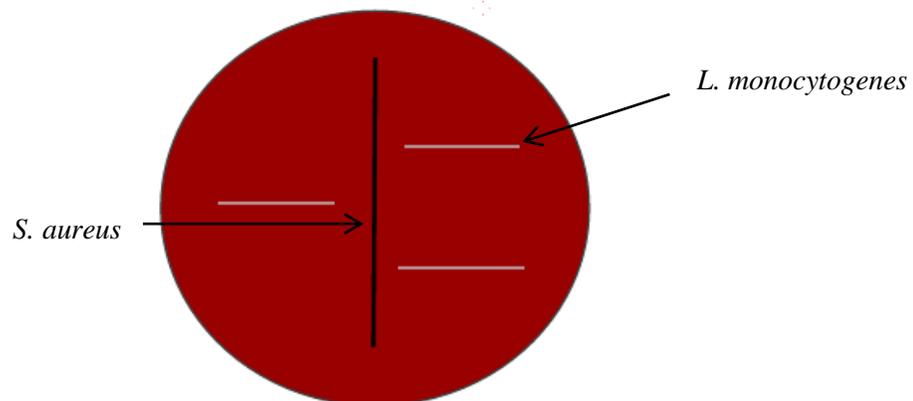


Ilustración 3.2 Modelo esquematizado de la realización de la prueba

RESULTADOS

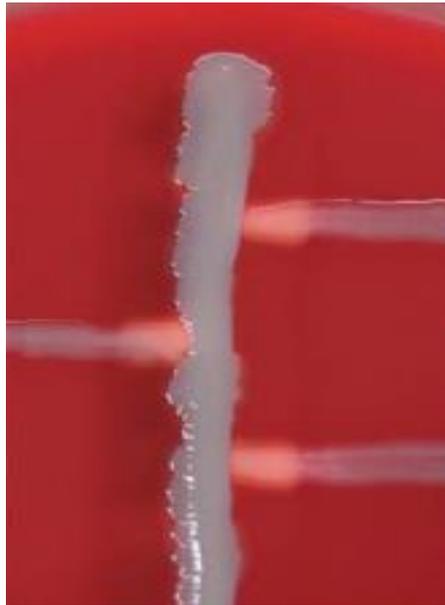


Figura 3.1 Producción de una de raqueta de hemólisis completa.

Foto tomada en el Laboratorio de Microbiología L-513.

CAPÍTULO 4

BACILOS ESPORULADOS

(*Clostridium* y *Bacillus*)

El género *Bacillus* junto con el género *Clostridium* forman parte de la familia *Bacillaceae*, de organismos bacilares esporulados, aerobios los primeros y anaerobios los segundos. (Divo, 1990)

Clostridium

Los bacilos grampositivos anaerobios esporulados que se encuentran en las infecciones en seres humanos son miembros del género *Clostridium*. (Koneman, y otros, 2008) Su distribución en la naturaleza es amplia, comúnmente se encuentran como saprófitos en el suelo, agua y vegetación; algunos también pueden encontrarse en el tracto gastrointestinal de animales y del hombre. (García del Valle & Zamudio Durán, 1998)

Los clostridios involucrados con mayor frecuencia en infecciones en el ser humano son:

- ◆ *C. botulinum*
- ◆ *C. difficile*
- ◆ *C. perfringens*
- ◆ *C. tetani*

C. perfringens es por mucho la especie de *Clostridium* de origen humano aislada con mayor frecuencia. (Koneman, y otros, 2008)

CARACTERES MORFOLOGICOS

El género *Clostridium* está formado por bacilos grampositivos, pleomórficos, que se presentan solos, en parejas o en cadenas cortas, forman esporas que pueden tener forma oval o esférica y aparecer en situación terminal o subterminal, móviles por flagelos peritricos, con la excepción de *C. perfringens*. (Divo, 1990)

Aunque los *Clostridium* se consideran grampositivos, muchos son gramnegativos cuando se preparan en frotis de las colonias en desarrollo. Por ejemplo, *Clostridium ramosum* y *Clostridium clostridioforme* son por lo común gramnegativos. (Koneman, y otros, 2008)

CARACTERES DE CULTIVO

Para la recuperación de bacterias del género *Clostridium* a partir de muestras clínicas, se pueden utilizar los siguientes medios: agar sangre para anaerobios, agar sangre PEA, agar Schaedler, agar sangre para anaerobios CDC, etc. Es conveniente incluir un medio con yema de huevo para investigar la producción de lipasa y lecitinasa y un medio líquido de enriquecimiento, como el tioglicolato. (Miranda & Rojo)

La mejor forma para demostrar la producción de esporas por parte de *Clostridium* es inocular un tubo con medio Cooked Meat, este medio proporciona un entorno favorable para el crecimiento de anaerobios obligados formadores y no formadores de esporas; dado que la proteína muscular en los gránulos del tejido cardíaco constituye una fuente de aminoácidos y otros nutrientes. Además sirve como medio de subcultivo para la determinación de proteólisis (digestión de carne). (BBL, 2006)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Anaerobios estrictos, con temperatura óptima de crecimiento de 37°C, requieren un pH de 7 a 7,4. Fermentan diversos azúcares, lo que permite diferenciar las especies entre sí, con producción de ácido y de gas (fermentación butírica). Otras características bioquímicas son: su acción proteolítica (algunas especies son sacarolíticas) y producción de indol. (BD, 2010)

C. perfringens produce una doble zona de hemólisis en agar sangre, producción de lecitinasa en agar yema de huevo. (Koneman, y otros, 2008) En leche fermenta, con una característica evolución “tormentosa” de gas, seguida de coagulación de la caseína, debido a la formación de ácido, y el cuajo rápidamente se desmenuza por la continua evolución del gas que contiene. El coágulo no se digiere; la producción de gas puede ser lenta, y el coágulo sólido no se rompe o con lentitud. (Burrows, 1974)

C. botulinum los tipos A y B digieren carne, leche y albúmina de huevo; licúan rápidamente el suero coagulado y la gelatina. Los tipos C, D y E se comportan de manera contraria. (Divo, 1990) Peptonizan la leche. (Burrows, 1974)

C. difficile es un microorganismo no proteolítico, no hidroliza la caseína de la leche. Es débilmente sacarolítico. Carece de efectos en medios con yema de huevo. (Berbabeu Esclapez & Martín Luengo, 1992)

C. tetani es moderadamente proteolítico. Licua lentamente la albúmina coagulada y también la gelatina. (Divo, 1990)

Bacillus

El género *Bacillus* está formado por un grupo grande de bacilos grampositivos, caracterizados por la capacidad para formar esporas en condiciones aerobias. (Koneman, y otros, 2008) El género comprende muchas especies, en el Laboratorio de Microbiología sólo se considera la que con mayor frecuencia causa infección en los seres humanos es *Bacillus anthracis*; otras tiene interés por ser productoras de sustancias antibióticas y de vitaminas, en bioensayos y como microorganismos indicadores para la monitorización de la eficacia de desinfectantes y procedimientos de esterilización. (Koneman, y otros, 2008)

B. anthracis, el patógeno más destacado de este género, habita en el suelo. Los seres humanos adquieren las infecciones a partir de las esporas. Todas las especies de *Bacillus* en general se consideran patógenos oportunistas de virulencia baja y suelen asociarse sólo con pacientes inmunocomprometidos. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

B. anthracis pertenece al grupo *B. cereus*, que incluye *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*. La mayoría de las especies distintas de *B. anthracis* son ubicuas en el medioambiente (polvo, suelo, agua, materiales de origen vegetal y animal). (Koneman, y otros, 2008)

CARACTERES MORFOLOGICOS

En los frotis teñidos con Gram, las células del grupo de *B. cereus* (incluido *B. anthracis*) son bacilos grampositivos, que se presentan solos o en cadenas. Las células individuales tienen extremos cuadrados o cóncavos. Se pueden observar esporas ovaladas central o subterminal, y las células no están tumefactas en las áreas donde se localiza la espora. (Koneman, y otros, 2008)

Las especies de *Bacillus* son grampositivos cuando se tiñen a partir de cultivos jóvenes pero se tornan gram variables o gramnegativos con el envejecimiento. (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009)

Una característica de las especies de *Bacillus* es la capacidad de producir esporas en presencia de oxígeno. Si bien las esporas no se visualizan con facilidad en todos los frotis que contiene especies de *Bacillus*, su presencia confirma la identificación del género. (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009) Las esporas intracelulares y libres de células no se tiñen con la técnica Gram, pueden visualizarse con la tinción verde de malaquita (tinción de Shaeffer y Fulton). (Koneman, y otros, 2008)

CARACTERES DE CULTIVO

Todos los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* suelen crecer bien y esporular en agar sangre de carnero al 5% y agar chocolate incubados a 37°C en condiciones aerobias. La esporulación puede ser estimulada mediante el subcultivo en agar TSI, agar urea o agar nutritivo con suplemento de MnSO₄ (concentración final de 5µg/ml) y también en agar nutritivo que contiene NaHCO₃ al 0,7%. (Koneman, y otros, 2008), (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009)

Crecen bien en medios de rutina para hemocultivos y los caldos nutritivos usados con frecuencia. No crecen en agar MacConkey; el medio PEA (agar con alcohol feniletílico) es útil para el aislamiento de especies de *Bacillus* provenientes de muestras contaminadas. Se utilizan dos medios para el aislamiento y la identificación de *B. anthracis*, el medio PLET (polimixina-lisozima-EDTA-acetato de talio) puede utilizarse para la selección y el aislamiento de esta especie a partir de muestras contaminadas. Como medio de identificación se utiliza el agar bicarbonato para inducir la formación de la cápsula de *B. anthracis*.

En la mayoría de las especies el crecimiento se puede observar dentro de las 24 h posteriores a la incubación en medios incubados a 35°C, en aerobiosis o en atmósfera con CO₂ al 5%. El agar bicarbonato debe incubarse en CO₂. (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009) En caldo simple no enturbia el medio sino que produce un depósito floculoso formado por cadenas bacilares de fácil desintegración. La película es gruesa. (Divo, 1990)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Son aerobios, catalasa positivos, con temperatura óptima de 35°C a 37°C; pH 7,2; no forma pigmentos. (Divo, 1990) Todos los miembros del grupo *B. cereus* producen lecitinasa en agar yema de huevo e hidrolizan la caseína, el almidón y la gelatina. No producen indol y la mayoría de las cepas reducen nitrato a nitrito. (Koneman, y otros, 2008) *B. anthracis* coagula, decolora y peptoniza lentamente la leche tornasol. (Divo, 1990)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La prueba que se realiza en el laboratorio para diferenciar especies del genero *Clostridium* es leche tornasol y para poder observar sus esporas se utiliza la técnica de tinción de Shaeffer y Fulton.

PRUEBA DE LECHE TORNASOL

OBJETIVOS

Diferenciar los microorganismos a través de sus reacciones metabólicas en un medio con leche.

Ayudar a la diferenciación de las especies del género *Clostridium*.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

La leche tornasolada es un medio diferencial utilizado para determinar diversas funciones metabólicas de un microorganismo:

- ◆ Fermentación de la lactosa
- ◆ Caseolisis
- ◆ Coagulación de la caseína

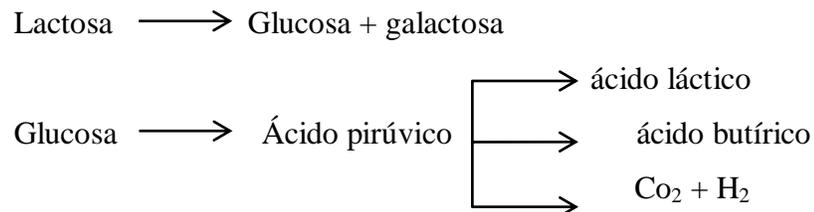
El tornasol incorporado en la leche indica tanto pH como oxido-reducción (E_h), debido a esto, el medio puede detonar diversas funciones metabólicas. La leche sola contiene exclusivamente el hidrato de carbono lactosa junto con tres proteínas: caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina. Es por esto que, un microorganismo puede exhibir una o

varias propiedades metabólicas en la leche tornasolada, cada una específica para una especie en particular, hecho que ayuda a la identificación bacteriana:

- ◆ Fermentación de lactosa
- ◆ Reducción de tornasol
- ◆ Formación de un coágulo ácido
- ◆ Formación de un coágulo y peptonización (digestión)
- ◆ Alcalinización
- ◆ Formación de gas. (Mac Faddin J. F., 2003)

FERMENTACIÓN DE LACTOSA

El tornasol como indicador de pH es rojo en solución ácida (pH 4,5) y azul en condiciones alcalinas (pH 8,3). Cuando el microorganismo fermenta la lactosa produce diversos ácidos pero principalmente ácido láctico y es así como el medio vira al rosa-rojo. (Álvarez Manrique & Mendoza, 1994), (Mac Faddin J. F., 2003)



REDUCCIÓN TORNASOL

El tornasol también es un indicador de reacciones oxido-reducción y algunas bacterias son capaces de reducir el tornasol a una leucobase (blanca). (Álvarez Manrique & Mendoza, 1994)

FORMACIÓN DE COÁGULO ÁCIDO

La precipitación de la caseína por los ácidos orgánicos a partir de la lactosa en condiciones ácidas produce un coágulo firme, gelatinoso, que no se retrae de los lados del tubo y que se disuelve con facilidad en medios alcalinos. (Mac Faddin J. F., 2003)

FORMACIÓN DE COÁGULO Y PEPTONIZACIÓN

La formación del coágulo se lleva a cabo por la precipitación de la caseína con la formación de ácidos o por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina, pepsina o

quimotripsina. Los ácidos producidos por la fermentación de la lactosa se combinan con el caseinato de calcio, para dar un caseinógeno insoluble que es el cuajo o coágulo. La hidrólisis de la caseína, por la actividad enzimática, produce una conversión final del precipitado caseinógeno a un líquido claro, el proceso se denomina peptonización o digestión. (Álvarez Manrique & Mendoza, 1994)

ALCALINIZACIÓN

La moderada actividad sobre la caseína puede producir productos alcalinos. La alcalinización se observa en la superficie de la leche como un anillo pupúreo debido a una desviación hacia el lado básico en el pH del tornasol en presencia del cuajo. (Mac Faddin J. F., 2003)

FORMACIÓN DE GAS Y FERMENTACIÓN TORMENTOSA

Los gases CO₂ e H₂ pueden formarse como resultado final de la fermentación de la lactosa. La fermentación tormentosa o turbulenta resulta cuando hay abundancia de gases que rompen un coágulo ácido. (Álvarez Manrique & Mendoza, 1994) Esto ocurre con ciertas especies de *Clostridium* anaerobias como: *C. perfringens* y *C. butyricum*. (Mac Faddin J. F., 2003)

Para registrar todas las reacciones metabólicas que ocurren en la leche tornasolada se utilizan símbolos o abreviaturas estándar como:

- ◆ (A): ácido
- ◆ (Alc o K): alcalino
- ◆ (C): coágulo
- ◆ (D): digestión
- ◆ (G): gas
- ◆ (S): fermentación tormentosa
- ◆ (R): reducción
- ◆ (NC, -, neg): sin cambios

PRECAUCIONES

El indicador tornasol (liquen azul) es un indicador vegetal, un producto no sintético; el límite de pH del tornasol es 4,8-8,3.

Las reacciones observadas en la leche tornasolada no son suficientes para determinar las especies; deben llevarse a cabo pruebas bioquímicas y serológicas adicionales.

Los *Streptococcus* del grupo *viridans* pueden reducir la leche tornasolada durante una incubación prolongada; una prueba para *Enterococcus* no debe leerse después de las 4 h. (Mac Faddin J. F., 2003)

El medio de leche tornasol también es de valor en el mantenimiento y la propagación de bacterias ácido lácticas. (BBL, 2006)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Medio de Leche Tornasolada
- B. Aceite mineral estéril

II. Cepas

- C. *Clostridium ssp.*
- D. *Proteus vulgaris*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- E. Positivo (+): *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*.
- F. Negativo (-): *Proteus vulgaris*.

IV. Fundamento

La leche tornasol es un medio que se ha utilizado durante muchos años para la determinación de las actividades metabólicas de los microorganismos en la leche como una ayuda para la identificación de especies bacterianas. Es especialmente útil en la diferenciación de las especies dentro del género *Clostridium*.

La leche desnatada es el sustrato que determinadas especies de bacterias atacan en distintas maneras para producir diferentes productos metabólicos.

V. Procedimiento

1. Inocular los tubos de leche tornasol con crecimiento de un cultivo puro (agar KIA, agar Cooked Meat u otro medio apropiado).
2. Inmediatamente después de la inoculación con *Clostridium*, recubra con 1 ml de aceite mineral.
3. Incubar a 37°C por 18 a 24 h.

4. Interpretar resultados

VI. Interpretación

- Positivo:
 - **Rojo rosado (A)**
 - * Un cambio de color azul purpúreo a rosa-rojo indica un resultado positivo a la fermentación de la lactosa.
 - * Puede haber fermentación tormentosa; intensa evolución de gas por ciertas cepas de *Clostridium*. A medida que la lactosa es convertida a ácido láctico, la superficie cambia primero a un color rosa pálido, mientras que la capa superficial permanece de color rosa-púrpura. Cuando se produce más ácido, la capa superior se torna rosa claro y la porción rosa del fondo se decolora a blanco. A medida que sigue produciendo ácido, aparece la formación de cuajos (coagulación ácida), lo que se manifiesta por una banda angosta color rosa en la parte superior debido a la disminución de la oxidación.
 - **Azul (Alc/K)**
 - * Acción de las enzimas proteolíticas en lactoalbúmina con la producción de amoníaco o aminas básicas resultantes en una reacción alcalina.
 - **Blanco (R)**
 - * Reducción del tornasol debido a la acción de las enzimas reductasa con la eliminación resultante de oxígeno para formar el compuesto leucobase.
 - **Formación del coágulo o cuajo (C)**
 - * La coagulación de la caseína como se evidencia por la formación de un coágulo o cuajo. Si la caseína se convierte en paracaseína por la enzima renina, produce un líquido claro, acuoso “suero de leche” que se produce en la parte superior de un tubo completamente coagulado.

- **Digestión (peptonización) (D)**
 - * Peptonización debido a la digestión de la proteína de la leche como se evidencia por un aclaramiento del medio y la disolución del coágulo.
- **Gas (CO₂ e H₂) (G)**
 - * Burbujas en el medio, el coágulo puede romperse.
- **Fermentación tormentosa (S)**
 - * El coágulo ácido se rompe por una producción abundante de gas.
- **Negativo:**
 - **Azul purpúreo (NC/-)**
 - * Sin fermentación de la lactosa, no hay cambio en el tubo ni en el indicador. (BBL, 2006), (Mac Faddin J. F., 2003), (Álvarez Manrique & Mendoza, 1994)

RESULTADOS



Figura 4.1 Resultado negativo sin cambios en el tubo.



Figura 4.2 Reducción del tornasol.



Figura 4.3 Fermentación tormentosa.



Figura 4.4 Producción de ácido.



Figura 4.5 Alcalinización.

Fotos tomadas de (Blinn College).

TINCIÓN SHAEFFER Y FULTON

OBJETIVO

Localizar y describir las endosporas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

PRINCIPIO

Para aumentar el contraste de los microorganismos y lograr una mejor observación de los mismos, se emplean diferentes técnicas de tinción, las cuales se basan en la capacidad de los microorganismos para retener (o no) ciertos colorantes lo que depende de la carga de la célula y del colorante. Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir endosporas y cápsulas. Los primeros son organelos de resistencia que se caracterizan por presentar una capa externa formada por un complejo de calcio, ácido dipicolínico y peptidoglicano. Debido a esta composición, es muy difícil que los colorantes penetren, por lo que al aplicar una tinción simple, estas aparecen como cuerpos incoloros (dentro o fuera

de la célula). No obstante es posible teñirlas mediante la aplicación de métodos drásticos. (Facultad de Química, 2012)

Una tinción selectiva tiene por objetivo poner de manifiesto algunas estructuras de la célula bacteriana. Las endosporas son impermeables a los colorantes, por lo que a veces se ven como regiones sin teñir dentro de las células que han sido teñidas. (Instituto Politécnico Nacional, 2013)

El verde de malaquita es un colorante débilmente básico (tiene una carga positiva débil) y por tanto, se une débilmente a la bacteria, penetra en las células vegetativas. Cuando se calienta la preparación también penetra las endosporas. Durante el lavado con agua, el verde de malaquita se elimina de las células vegetativas, pero no de la endospora. El colorante de contraste (safranina) solo puede teñir a las células vegetativas (decoloradas por el agua). (Universidad de Granada, 2013)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Aceite de inmersión
- B. Frascos goteros con verde de malaquita y safranina al 0,5%

II. Cepas

- C. *Bacillus subtilis*
- D. *Bacillus cereus*

III. Procedimiento

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 a 3 veces.

1. Preparar frotis bacteriano y cubrir con papel filtro y saturarlo con verde de malaquita.
2. Calentar la preparación sobre un vaso de precipitados con emisión de vapores de agua durante 10 min, cuidando que el colorante no hierva y mantener la preparación húmeda.

3. Retirar el papel filtro con unas pinzas y colocarlo en un frasco para su posterior desecho.
4. Lavar con el mínimo de agua.
5. Agregar 3 gotas de una solución de safranina al 0,5% y dejarla reaccionar durante 30 segundos.
6. Lavar, dejar secar a temperatura ambiente y observar al microscopio con el objetivo de 100x. (Facultad de Química, 2012)

RESULTADOS



Figura 4.6 Endoesporas de *Bacillus* ssp. por la técnica de Shaeffer y Fulton.

Foto tomada de (Instituto Politécnico Nacional, 2013).

CAPÍTULO 5

Brucella

El género *Brucella* está integrado por seis especies diferentes: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris*. De ellas, solo cuatro se asocian con enfermedades en el hombre, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*.

Las bacterias del genero *Brucella* no son de vida libre y su hábitat son los animales, tanto silvestres como domésticos, en tanto que el hombre es sólo un hospedero accidental. (Hernández Monroy, Peña Flores, & Betancourt Morillo, 1996)

CARACTERES MORFOLOGICOS

Son pequeños bacilos o cocobacilos gramnegativos, se presentan solos, en parejas, agrupados y a veces en cadenas cortas. Inmóviles, no esporulan y algunas cepas forman cápsula. Con la tinción Ziehl-Neelsen modificada, las brucelas se tiñen de color rojo y se observa la misma morfología que en la tinción Gram. (Hernández Monroy, Peña Flores, & Betancourt Morillo, 1996) *B. melitensis* es el más cococide y *B. abortus* la más larga. (Divo, 1990)

En agar simple forma colonias pequeñas, redondas convexas, brillantes, de borde continuo, blanco grisáceas de consistencia cremosa, que a los pocos días presentan una coloración gris amarillenta. (Divo, 1990)

En medio agar soya tripticasa con suero:

- ◆ Cepas lisas (S): producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, transparentes y de color ámbar, que a la luz reflejada son brillantes de aspecto húmedo. Las colonias son suaves, se emulsifican fácilmente y forman suspensiones estables en solución salina.
- ◆ Cepas rugosas (R): producen colonias semejantes en forma pero varían considerablemente en tamaño, color, consistencia y textura; son ligeramente opacas con superficie granular y color que va de blanco mate al amarillo o amarillo café. Las colonias son frecuentemente viscosas y difíciles de desprender del agar, no forman

suspensiones homogéneas en solución salina y producen agregados granulares o filamentosos.

- ◆ Colonias mucoides (M): son similares a las R en color y en opacidad, pero presentan textura mucoide.
- ◆ En agar gelosa sangre: forman colonias pequeñas y hemolíticas.
- ◆ En agar MacConkey: no todas las cepas crecen. Si crecen, no fermentan la lactosa. (Hernández Monroy, Peña Flores, & Betancourt Morillo, 1996)

CARACTERES DE CULTIVO

Tienen necesidades nutritivas complejas; su crecimiento por lo general es lento: pobre en los medios ordinarios y bueno en los enriquecidos con proteínas animales, extracto de hígado o factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos y otros). (Divo, 1990) Muchos aislamientos requieren el agregado de dióxido de carbono (CO₂) para crecer, en especial en los aislamiento primarios. Crecen bien en agar sangre de carnero al 10%, agar soya tripticasa con suero (libre de anticuerpos *Brucella*) al 5%, caldo y agar infusión cerebro corazón, agar chocolate. El agregado de suero calentado de caballo o de conejo al 5% potencia el crecimiento de todos los medios. Los cultivos deben incubarse en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5-10%; las placas se incuban durante 3 semanas antes de descartarlas como negativas. (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009)

El hemocultivo de muestras humanas se realiza en medio bifásico modificado de Ruiz Castañeda también se recomienda para el aislamiento a partir de muestras de médula ósea u otros órganos; en caso de no poseer medio bifásico se utiliza caldo de soya tripticasa adicionado con polianetol sulfonato de sodio al 0,05% o algún otro anticoagulante como citrato de sodio. (Hernández Monroy, Peña Flores, & Betancourt Morillo, 1996)

En caldo simple a las 24 h se aprecia un ligero enturbiamiento, a los 10 días el crecimiento es más abundante observándose un depósito pulvurulento que más tarde se hace viscoso. Los alcaliniza a un pH 8,0 o más. (Divo, 1990)

Como el crecimiento puede ser lento, los medios se mantienen en la estufa durante 30 días antes de descartarlos como negativos. La mayoría de cepas de *B. abortus* no crecen en

aerobiosis pero sí en un atmósfera dotada de CO₂ de 5 al 10% o en la jarra con vela. (Divo, 1990)

Debido a que el género *Brucella* se encuentra en los microorganismos de nivel 3 de Bioseguridad se deberán tomar las siguientes medidas de Bioseguridad.

Medidas de bioseguridad en el laboratorio

Las medidas de bioseguridad en el trabajo de diagnóstico de brucelosis son un conjunto de prácticas que deben ser realizadas rutinariamente por el personal.

- 1) Siempre que se pueda, los materiales potencialmente infecciosos deben manipularse bajo cabinas de bioseguridad clase II o clase III.
- 2) Es imprescindible el uso de ropa de protección, guantes, mascarillas o lentes y cubrebocas, bata sanitaria y gorro, especialmente si no se cuenta con cabinas de seguridad.
- 3) Las superficies y mesas de trabajo contaminadas deberán desinfectarse y lavarse.
- 4) El material metálico o de cristal deberá ponerse en un desinfectante adecuado mientras no se meta a esterilizar a la autoclave.
- 5) Se debe contar con un número suficiente de asas bacteriológicas, ya que una vez utilizadas deben permanecer en alcohol al 70% por un periodo mínimo de 20 min antes de que se puedan flamear para su nueva utilización.
- 6) Debe prevenirse la formación de aerosoles o procesos que originen espuma.
- 7) Las muestras para cultivo, deberán trabajarse con guantes y deben colocarse o tomarse en recipientes a prueba de filtración o escurrimientos. Los recipientes siempre deben identificarse, señalando la naturaleza del contenido.
- 8) Si algún envase con material infeccioso se rompe en el área de trabajo, se deberá evitar inhalar al momento, cubrirse la boca y la nariz con un cubrebocas o máscaras y proceder a cubrir la zona expuesta con desinfectantes como fenoles o cresoles, que sí destruyen a *Brucella*.
- 9) No se debe comer, fumar o conversar en las áreas donde se manipule material infeccioso.
- 10) No se permitirá la circulación libre de personal por la zona de trabajo.
- 11) Nunca debe pipetearse con la boca material potencialmente infeccioso. (Hernández Monroy, Peña Flores, & Betancourt Morillo, 1996)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Las especies de *Brucella* se identifican por el requerimiento de CO₂ para su desarrollo, producen catalasa y oxidasa, reducen los nitratos a nitritos, no utilizan citrato, Voges Proskauer e indol negativos, no licuan la gelatina.

Son aerobios estrictas, temperatura óptima de crecimiento a 37°C y pH adecuado 7,0 a 7,2. No producen hemolisina. La actividad sobre la urea ha servido en la diferenciación de especies por la rapidez con la que la hidrolizan, la capacidad relativa de producir H₂S. La identificación de especies es por medio de la sensibilidad que presentan a los colorantes fucsina básica (20µg y 10µg), tionina (40µg, 20µg y 10µg) y azul de tionina (2µg/ml). En general *B. melitensis* crece en presencia de tionina y fucsina, *B. abortus* en el de fucsina y azul tionina y *B. suis* en el de tionina. La fermentación de los azúcares no ocurre en medios ordinarios, pero si posee capacidad oxidativa sobre algunos carbohidratos y aminoácidos. (Mac Faddin J. F., 2003), (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009), (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El método de diagnóstico del laboratorio para la identificación del género *Brucella* es la producción de ácido sulfhídrico (H₂S).

PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SULFHÍDRICO

OBJETIVOS

Determinar si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico (H₂S) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados para producir una reacción coloreada visible, negra, en presencia de un sistema indicador de H₂S.

Mediante la producción de H₂S identificar las especies de *Brucella*.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

Los numerosos métodos utilizados para detectar la producción de H₂S por microorganismos varían con la fuente de azufre y las sales metálicas utilizadas para indicar la formación de H₂S. Las sales de metal se pueden utilizar en tiras de papel por encima del cultivo en crecimiento y acetato de plomo es la elección habitual. (Clarke, 1953)

La proteólisis de las proteínas produce aminoácidos individuales; ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente el azufre de los diversos aminoácidos

azufrados (-SH), produciendo H₂S gaseoso. Peptona, cisteína, cistina, metionina y tiosulfato son fuentes de azufre, pero diferentes especies usan diferentes compuestos o aminoácidos azufrados para producir H₂S.

En el laboratorio se utiliza agar BHI, *Brucella* obtiene los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. (BD, 2012)

El microorganismo productor de H₂S cultivado en un medio orgánico como la peptona reduce el azufre por hidrogenación produciendo H₂S gaseoso. El H₂S es un gas incoloro; por consiguiente, es necesario un segundo indicador para visualizar la producción de H₂S. La producción de H₂S se detecta cuando el gas entra en contacto con ciertos metales, como plomo, hierro o bismuto, y forma sulfuros de estos metales. Por lo tanto, el H₂S gaseoso puede ser producido por la reducción del azufre orgánico proporcionado por el grupo funcional R₁-SH del aminoácido que está presente en la peptona.

El acetato de plomo, Pb (C₂H₃O₂)₂ • 3H₂O (PbAc), la sal del metal, también es un indicador de producción de H₂S. Al entrar en contacto con el acetato de plomo (PbAc), el H₂S produce sulfuro de plomo, un precipitado negro, en una reacción de color negro visible. (Mac Faddin J. F., 2003)

La producción de H₂S depende de:

- ◆ el contenido y la disponibilidad de la fuente de azufre,
- ◆ la sensibilidad del método utilizado para detectar H₂S,
- ◆ el crecimiento del microorganismo en el medio,
- ◆ la capacidad del microorganismo para la elaboración de enzimas productoras de H₂S. (Clarke, 1953)

La importancia de la extrema sensibilidad de la prueba para la producción de H₂S se aprecia cuando uno observa la pequeña cantidad de azufre reducido en la mayoría de las peptonas, y la pequeña cantidad de H₂S producido por algunas bacterias, incluso de una fuente adecuada. (ZoBell & Feltham, 1934)

PRECAUCIONES

Es esencial un inóculo abundante del microorganismo de prueba, porque la cantidad de H₂S producida y el tiempo transcurrido hasta la detección depende de la concentración de la suspensión. Cuando se usa un inóculo abundante, puede haber una reacción positiva.

El PbAc es tóxico para el desarrollo bacteriano y muestra una acción bacteriostática que inhibe la liberación de H₂S a partir de la peptona; por lo tanto, no permita que las tiras toquen el medio.

La sensibilidad extrema de las tiras de PbAc hace posible fijar la tira de papel filtro impregnada con el tapón de un tubo BHI, KIA o TSI sin incorporarlo directamente en el medio. (Mac Faddin J. F., 2003)

Las ventajas de esta técnica son el aumento de la sensibilidad y reproducibilidad de los resultados además de la prevención de los efectos tóxicos de sales metálicas en el medio. (Clarke, 1953) Asimismo, es más fácil detectar H₂S en las tiras de PbAc que observar una reacción de color en el medio. (Mac Faddin J. F., 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Agar BHI
- B. Tiras de acetato de plomo (PbAc)

II. Cepa

- C. *Brucella abortus*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- D. Positivo (+): *Brucella abortus*.
- E. Negativo (-): *Brucella melitensis*.

IV. Fundamento

Las especies de *Brucella* son capaces de reducir aminoácidos que contienen azufre a H₂S, mediante el uso de tiras de acetato de plomo se visualiza la producción de H₂S, el cual es un gas incoloro que en contacto con acetato de plomo produce sulfuro de plomo, un precipitado negro, indicado por una reacción visible de color negra en la tira de papel de acetato de plomo.

V. Procedimiento

1. A partir de un aislamiento primario obtenido en los medios enriquecidos se procede a tomar con una asa bacteriológica un inóculo abundante de *B. abortus*.
2. En un tubo inclinado con agar BHI se siembra la superficie por estría.
3. De manera aséptica, suspender una tira de acetato de plomo estéril aproximadamente a 10 mm sobre el nivel del agar.
4. Doblar un extremo de la tira sobre el borde del tubo.
5. Colocar nuevamente el tapón para sostener la tira.
*La tira **NO DEBE** tocar la superficie del agar.
6. Incubar a 37°C por 24 h con tensión de CO₂.
*Para obtener una atmósfera adecuada de CO₂ (5%) se puede emplear un desecador o un frasco de boca ancha que cierre herméticamente. Se introducen las placas y una vela encendida, se cierra el recipiente y la llama de la vela se extinguirá, la concentración de CO₂ generado será suficiente para permitir el crecimiento de *Brucella*.
7. Interpretar resultados.

VI. Interpretación

- Positivo: color negro pardusco de la tira de acetato de plomo.
- Negativo: ningún cambio, no hay color en la tira. (BD, 2010), (Hernández Monroy, Peña Flores, & Betancourt Morillo, 1996), (HIMEDIA, 2011)

RESULTADOS



Figura 5.1 Resultado negativo sin cambios.



Figura 5.2 Resultado positivo color negro en la tira de PbAc.

Fotos tomadas de (INDRE, 2011), (López Merino, 2013).

CAPÍTULO 6

Vibrio cholerae

Vibrio es un género de la familia *Vibrionaceae* que incluye 36 especies, doce de las cuales son patógenas potenciales para el hombre y dentro de las cuales se encuentra *Vibrio cholerae*. (Secretaría de Salud, 2001)

Vibrio cholerae es el agente etiológico del cólera, enfermedad diarreica potencialmente grave. Con base en su antígeno somático más importante, el lipopolisacárido (LPS), actualmente se conocen 198 serogrupos de *V. cholerae*. Cada serogrupo se define por un suero monoespecífico; el *V. cholerae* O1 se define con ese nombre ya que aglutina con el suero O1 mientras que a los 198 restantes serogrupos se les denomina genéricamente como NO O1. Todos comparten un antígeno flagelar común H.

Con base en sus características fenotípicas, propiedades metabólicas, susceptibilidad a bacteriófagos y a antimicrobianos, *V. cholerae* O1 se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor. Estos biotipos se dividen de acuerdo a diversos antígenos somáticos en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima. (Secretaría de Salud, 2001) El biotipo Clásico apareció en Asia y es raro en el resto del mundo, mientras que el biotipo El Tor es el más frecuente. (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 1994)

Los antígenos somáticos O1 y O139 asociados con la envoltura celular son marcadores positivos de las cepas capaces de producir epidemias y diseminación pandémica del cólera. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

CARACTERES MORFOLOGICOS

Comprende bacilos curvos gramnegativos, con aspecto de una coma, se pueden presentar solos, en parejas o en cadenas cortas formando una S o asemejan espirilos. (Divo, 1990)

En cultivos viejos o en condiciones adversas se observan formas involucionadas: cocoides, cortas y gruesas como cocobacilos, largas y delgadas de aspecto bacilar recto. (Divo, 1990)

En medio líquido son móviles por flagelos polares. No forman endoesporas, ni microquistes. (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 1994)

En agar TCBS produce colonias amarillas o verdes, lo que depende de su capacidad para fermentar la sacarosa (y producir colonias amarillas) (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009); *V. cholerae* presenta colonias amarillas, lisas, con centro opaco y periferia transparente. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999), mientras que las colonias azul-verdosas, grandes, planas son de *V. parahaemolyticus*. Hay que enfatizar que no todas las colonias amarillas en TCBS son de *V. cholerae* y también son así las de *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis* y *V. furnissi*. En agar sangre se presentan colonias de medianas a grandes, lisas, opacas, iridiscentes con un tinte verdoso. En agar MacConkey crecen colonias pálidas no fermentadoras de lactosa. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

En agar simple forma colonias pequeñas circulares, aplanadas, de borde continuo, brillantes, translúcidas, ligeramente granulosa y de color gris amarillento, que parecen irisadas a la luz directa. (Divo, 1990)

CARACTERES DE CULTIVO

Crecen bien en los medios comunes de laboratorio, y de manera muy favorable y rápida en agua peptonada alcalina. En caldo simple producen ligera turbidez, con depósito pulvulento y gruesa película blanquecina que se rompe en fragmentos al agitar. En agua peptonada alcalina (1% peptona y 1% de NaCl, pH 8,4) tiene un rápido crecimiento, forma película superficial constituida por vibriones fuertemente aerobios. (Divo, 1990)

Se utiliza el agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) que es un medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de *V. cholerae* y otras especies *Vibrio* a partir de muestras clínicas y de otras clases. (BD, 2003) El agua peptonada alcalina (pH 8,4) puede usarse como caldo de enriquecimiento para obtener el crecimiento de vibriones a partir de las heces, crecen bien en agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate y agar MacConkey. También crecen bien en el caldo de los sistemas de hemocultivo y en caldo tioglicolato o infusión cerebro corazón. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

V. cholerae el biotipo El Tor, puede diferenciarse de la cepa clásica de *V. cholerae* por las siguientes características:

- ◆ Activamente betahemolítica en agar sangre.
- ◆ Capacidad de aglutinar eritrocitos de pollo.

- ◆ Resistencia a la polimixina B.
- ◆ Voges Proskauer positivo.
- ◆ Reacción CAMP positiva al igual que las cepas O139.
- ◆ Resistentes a la prueba de susceptibilidad del fago IV. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La técnica de identificación para las especies de *Vibrio* que se realiza en el laboratorio es la prueba de hilo perlado y el crecimiento en agar TCBS.

PRUEBA DE HILO PERLADO

OBJETIVO

Diferenciar *V. cholerae* biotipo El Tor de otras especies de *Vibrio* ssp. y *Aeromonas*.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

La prueba de la cadena (hilo perlado, hilo mucoide o filamentoso) tiene algún valor diferencial ya que muchas especies de *Vibrio* ssp. (en particular *V. cholerae*) son prueba de cadena positiva, pero muchas otras especies, incluidas *Aeromonas*, son negativas. Desoxicolato de sodio es un detergente que lisa organismos gramnegativos. Cuando las células se lisan, el ADN se libera en el medio de suspensión, lo que hace muy viscoso y capaz de formar “cadenas de ADN” cuando se toca con un asa bacteriológica, que se levanta de la superficie del líquido. (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006)

Todas las cepas de *V. cholerae*, según se determine por aglutinación con grupo y tipo específico de sueros, dieron positivo a la prueba de “cadena”. Estas cepas incluyen organismos designados *V. cholerae* “Clásica” y “El Tor”. Colonias de *V. cholerae* rugosas dieron reacciones más débiles que las colonias positivas lisas. (Smith, 1970)

PRECAUCIONES

La prueba no es específica para *V. cholerae*, todos los vibrios probados, excepto cepas de *V. parahaemolyticus*, dieron un resultado positivo. (Smith, 1970) Tanto los resultados

positivos y negativos pueden ser confirmados por otros ensayos adecuados, tales como actividad de la descarboxilasa, la producción de la citocromo oxidasa y tolerancia a la sal. Los resultados de la prueba de la cadena pueden ser afectados por el medio de cultivo utilizado. (Keast & Riley, 1997)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Agar Nutritivo
- B. Desoxicolato de sodio al 0,5%

II. Cepa

- C. *Vibrio cholerae*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- D. Positivo (+): *Vibrio cholerae*.
- E. Negativo (-): *Aeromonas hydrophila*.

IV. Fundamento

Los microorganismos se emulsionan con el desoxicolato de sodio al 0,5%, que lisa los vibriones pero no las especies de *Aeromonas*. Con la lisis de las células hay liberación de DNA, que puede extraerse de la solución filamentosa con un asa bacteriológica.

V. Procedimiento

1. Tomar con un palillo estéril o asa bacteriológica una colonia de *V. cholerae* de agar nutritivo de 18-24 h.
2. Agregar 1 gota (0,1 ml) de desoxicolato de sodio al 0,5% en el portaobjetos.
3. Suspender la colonia tomada en el portaobjetos y homogeneizar con la solución de desoxicolato de sodio al 0,5%.
4. Con un asa bacteriológica o palillo levantar con cuidado la suspensión.
5. Observar resultados.

VI. Interpretación

- Positivo: al levantar la suspensión se vuelve viscosa y una cadena de ADN (hilo perlado, hilo mucoide o filamentoso o prueba de la cadena) es evidente dentro de los 60 segundos.

- Negativo: No hay cadena de ADN (hilo perlado, hilo mucoide o filamentoso) formado dentro de los 60 segundos. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009), (Smith, 1970), (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006), (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 1994), (Secretaria de Salud, 1991)

RESULTADOS

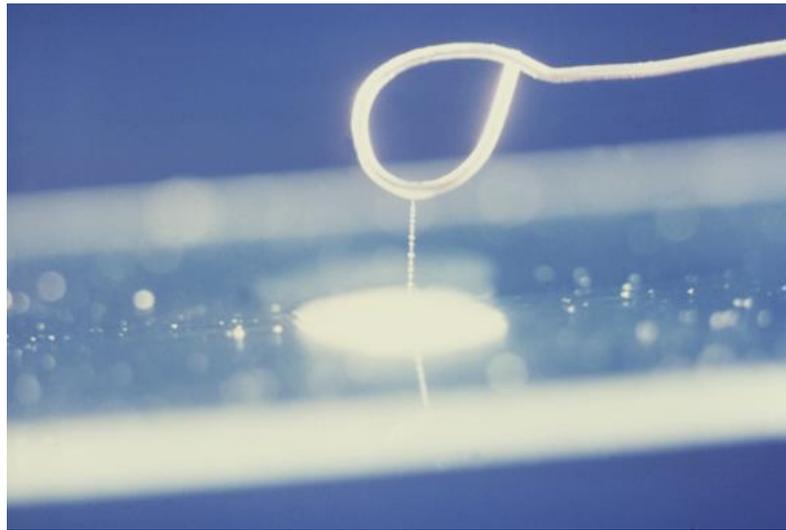


Figura 6.1 Resultado positivo formación del hilo mucoide.

Tomada de (Centers for Disease Control and Prevention, 2005).

AGAR TCBS

(Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa)

USO

Agar TCBS es un medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de *Vibrio cholerae* y otras especies *Vibrio* a partir de muestras clínicas y de otras clases.

PRINCIPIO

Todas las especies de *Vibrio* patógenas para los seres humanos, excepto *V. hollisae*, crecen en este medio. Es altamente selectivo, cumple con los requisitos nutritivos de las especies de *Vibrio* y permite que los vibrios compitan con la flora intestinal.

En Agar TCBS, el extracto de levadura y la peptona proporcionan el nitrógeno y las vitaminas. El citrato sódico, el tiosulfato sódico, la bilis de buey y el colato son agentes selectivos que proporcionan un pH alcalino para inhibir los organismos grampositivos y suprimir los organismos coliformes. El pH del medio se incrementa para favorecer el crecimiento de *V. cholerae* porque este organismo es sensible a los entornos ácidos. La alta concentración de sodio favorece el crecimiento de *V. cholerae* que es halotolerante y de otras especies de *Vibrio*, cuya mayoría es halofílica. La sacarosa es un carbohidrato fermentable, y el cloruro sódico estimula el crecimiento. El tiosulfato sódico es una fuente de azufre y actúa con el citrato férrico como indicador para detectar la producción de ácido sulfhídrico. El azul de bromotimol y el azul de timol son indicadores de pH. (BD, 2003)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Agar TCBS

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

B. Positivo (+): *Vibrio cholerae*.

C. Negativo (-): *Vibrio parahaemolyticus*.

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba e inocular por técnica de dilución en la placa.
2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento. (BD, 2003)

RESULTADOS



Figura 6.2 Agar TCBS sin inocular.



Figura 6.3 Crecimiento de *V. cholerae* en agar TCBS.
frente de la tapa.



Figura 6.4 Crecimiento de *V. cholerae* en agar TCBS
inverso de la placa.

Fotos tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado.

CAPÍTULO 7

Haemophilus

Todas las especies de *Haemophilus* son habitantes normales de las vías respiratorias superiores de los seres humanos, con la excepción de *Haemophilus ducreyi* que presenta la singularidad de ser el agente de una enfermedad de transmisión sexual. (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009)

El género *Haemophilus* se clasifica actualmente dentro de la familia *Pasteurellaceae*; en la actualidad se ubica dentro del género a nueve especies que colonizan a los seres humanos:

- | | |
|---------------------------------------|---|
| ◆ <i>Haemophilus influenzae</i> | ◆ <i>Haemophilus paraphrophilus</i> |
| ◆ <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | ◆ <i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i> |
| ◆ <i>Haemophilus haemolyticus</i> | ◆ <i>Haemophilus segnis</i> |
| ◆ <i>Haemophilus parahaemolyticus</i> | ◆ <i>Haemophilus ducreyi</i> |
| ◆ <i>Haemophilus aphrophilus</i> | |

Las especies que pueden estar asociadas a infecciones en el ser humano incluye *H. ducreyi*, *H. parainfluenzae*, *H. aphrophilus*. Sin embargo la especie más importante desde el punto de vista de las infecciones en el ser humano es *H. influenzae*. (Norman, Chaves, & Garcia, 2006), (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

Las cepas de *H. influenzae* pertenecen a dos amplias categorías: tipificables y no tipificables. Las cepas se tipifican sobre la base de las características capsulares. La cápsula está compuesta por un complejo azúcar-alcohol-fosfato (polirribitol fosfato). Las diferencias en este complejo constituyen la base de la diferenciación de las cepas encapsuladas en seis grupos (serotipos capsulares a, b, c, d, e y f). (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009) La mayoría de las infecciones son producidas por *H. influenzae* pertenecientes al serotipo capsular b. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999) Las cepas no tipificables no producen cápsula y se les encuentra con mayor frecuencia como habitantes normales de las vías respiratorias superiores. (Forbes, Sahn, & Weissfeld, 2009)

Se ha definido al género *Haemophilus* por el requerimiento de factor X y de factor V de las especies que lo integran.

CARACTERES MORFOLOGICOS

Son bacilos gramnegativos, se presentan solos, en pares, algunas veces en forma bacilar y otras formando largos filamentos, es un microorganismo pleomórfico. Es inmóvil, no forma esporas, y se presenta en una forma capsulada y otra no capsulada. (Divo, 1990) Dado su pequeño tamaño, el pleomorfismo que presenta y a su débil coloración con safranina; se puede utilizar azul de metileno, para la detección de estas pequeñas células bacterianas y estas se presentan como bacilos azul-negros contra un fondo ligeramente gris azulado. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999) También se utiliza naranja de acridina porque permite observar cantidades de microorganismos más pequeñas que con la tinción Gram. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

En agar chocolate *H. influenzae* las cepas no capsuladas son pequeñas, lisas y translúcidas a las 24 h; las cepas capsuladas forman colonias más grandes y más mucosas; no son hemolíticas en agar sangre de conejo o de caballo. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

CARACTERES DE CULTIVO

Requiere de los factores X y V para su crecimiento en cualquier medio. El factor X que no es una sola sustancia sino un grupo de compuestos tetrapirrólicos termoestables, proporcionados por varios pigmentos que contiene hierro (hemina, hematina). Esos compuestos son utilizados en la síntesis de catalasas, peroxidasas y citocromos del sistema de transporte de electrones. El factor V que es un dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) o el fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADP). Tanto el factor X como el factor V están presentes en los eritrocitos, incluso en los glóbulos rojos de carnero empleados en el agar sangre. La sangre de carnero también contiene enzimas que hidrolizan lentamente el factor V. Por lo tanto, los hemófilos dependientes del factor V no suelen desarrollarse en agar sangre de carnero con eritrocitos intactos. El ligero calentamiento durante el agregado de la sangre a la base de agar fundido cuando se prepara el agar chocolate produce lisis de los eritrocitos, liberación de factor X y factor V e inactivación de las enzimas que hidrolizan el factor V. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

Para el aislamiento de las especies de *Haemophilus* a partir de muestras clínicas se requiere de medios enriquecidos como agar chocolate (Norman, Chaves, & Garcia, 2006); este medio proporciona los factores necesarios esto es hemina (factor X) y NAD (factor V) para el crecimiento de *Haemophilus*, pueden crecer en agar sangre con 5% de sangre intacta de caballo o de conejo. En medios como BHI que contiene 5% de sangre de conejo, *H. influenzae* es alfa hemolítico (el agar toma un tono verdoso alrededor de la colonia) o gamma hemolítico (ausencia de hemolisis). (Perilla, 2004)

También se ha descrito un medio selectivo para el aislamiento y la diferenciación de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. El medio consiste en agar BHI suplementado con hemina y NAD, sacarosa, rojo de fenol como indicador y bacitracina. Este medio es comparable al agar chocolate que contiene bacitracina en lo que respecta a la recuperación de hemófilos y diferencia *H. parainfluenzae* que presenta colonias amarillas debido a la producción de ácido a partir de la sacarosa de *H. influenzae* que presenta colonias incoloras. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

Crecen bien en caldos nutritivos comunes como tioglicolato e infusión cerebro corazón. Sin embargo, a menudo producen sólo suspensiones apenas turbias y no se visualizan con facilidad en los cultivos líquidos. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

La mayoría de las especies de *Haemophilus* crecen en aerobiosis y en anaerobiosis. El crecimiento es estimulado por el dióxido de carbono (CO₂) al 5-10% de modo que se recomienda la incubación en una jarra con extinción de vela o estufa de incubación CO₂. Estos microorganismos suelen crecer dentro de las 24 h, pero los cultivos deben incubarse de manera sistemática durante 72 h antes de descartarlos como negativos. Una excepción es *H. ducreyi* que puede requerir 7 días para crecer. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Siendo aerobios y anaerobios facultativos, la presencia de CO₂ puede favorecer su desarrollo en un primer cultivo. Requiere un pH ligeramente alcalino y la temperatura óptima es de 37°C. La acción fermentativa de los azúcares es variable, siendo la glucosa regularmente atacada, y con rara producción de gas. El manitol y la lactosa nunca son

fermentados. Las pruebas de indol, ureasa y ornitina descarboxilasa permiten clasificar a *H. influenzae* en ocho biotipos. (Mac Faddin J. F., 2003)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

En el laboratorio el criterio tradicional de identificación se basa en el requerimiento de los factores de crecimiento X, V o ambos. La técnica utilizada en el laboratorio para detectar estos microorganismos es la prueba de satelitismo, que es una prueba presuntiva a nivel de género.

PRUEBA DE SATELITISMO

OBJETIVO

Determinar el requerimiento de factores de crecimiento X y V para favorecer el desarrollo de *Haemophilus influenzae*.

PRINCIPIO BIOQUÍMICO

Muchas bacterias y hongos sintetizan NAD en el curso de su desarrollo en medios bacteriológicos. En los cultivos mixtos, las especies de *Haemophilus* que requieren factor V pueden crecer como colonias satélites alrededor de las colonias de otros microorganismos. Este fenómeno se denomina satelitismo. Tal propiedad ha dado origen a una técnica para detectar estos organismos en cultivos mixtos. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

La prueba de satelitismo es utilizada como una prueba de identificación presuntiva útil para los miembros de esta especie; *H. influenzae* crece como colonias diminutas (satélites) y de forma parecida a las gotas de rocío, dentro de la zona hemolítica de una estría estafilocócica en agar sangre de carnero; ya que los eritrocitos lisados en el agar que rodea la estría de *Staphylococcus aureus* proporcionan el factor X, y las propias células estafilocócicas excretan gran cantidad de factor V durante la fase exponencial de crecimiento. (Catering Rodriguez & Realpe Delgado, 2011)

PRECAUCIONES

El satelitismo no es una prueba de identificación definitiva para este género, debido a que este fenómeno puede ser exhibido por otros microorganismos como *Pasteurella*, *Corynebacterium*, *Actinobacillus*.

Las especies de *Haemophilus* que no requieren el NAD no producen satelitismo y no corresponden con la especie *influenzae*. (López, 2001)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Agar Sangre de Carnero
- B. Jarra para anaerobiosis

II. Cepas

- C. *Haemophilus influenzae*
- D. *Staphylococcus aureus*

III. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- E. Positivo (+): *Haemophilus influenzae*.
- F. Negativo (-): *Haemophilus parainfluenzae*.

IV. Fundamento

El fenómeno del satelitismo de *H. influenzae* se presenta cuando *Staphylococcus aureus* suministra el factor V (NAD) que se difunde en el medio de cultivo, a su vez la sangre del medio proporciona el factor X. Y se observan el crecimiento de colonias satélites alrededor de *S. aureus*.

V. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar un inóculo denso de *Haemophilus* en agar chocolate e inócular la totalidad de la placa de agar sangre de carnero (sembrado masivo).
2. Con un asa bacteriológica, hacer una estría en el centro de la siembra masiva de un microorganismo productor de NAD, como *S. aureus*, a través de la siembra del probable *Haemophilus*.
3. Incubar a 37°C por 24 h en atmósfera del 5% de CO₂ (jarra con vela).
4. Interpretar resultados

VI. Interpretación

- Positivo: Crecimiento de pequeñas colonias húmedas en forma de punta de alfiler (satélite) alrededor de las colonias de *S.aureus*.
- Negativo: Crecimiento de colonias sin forma de punta de alfiler (satélite). (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999), (López, 2001), (Catering Rodriguez & Realpe Delgado, 2011), (Trigoso A., y otros, 2000)

RESULTADOS

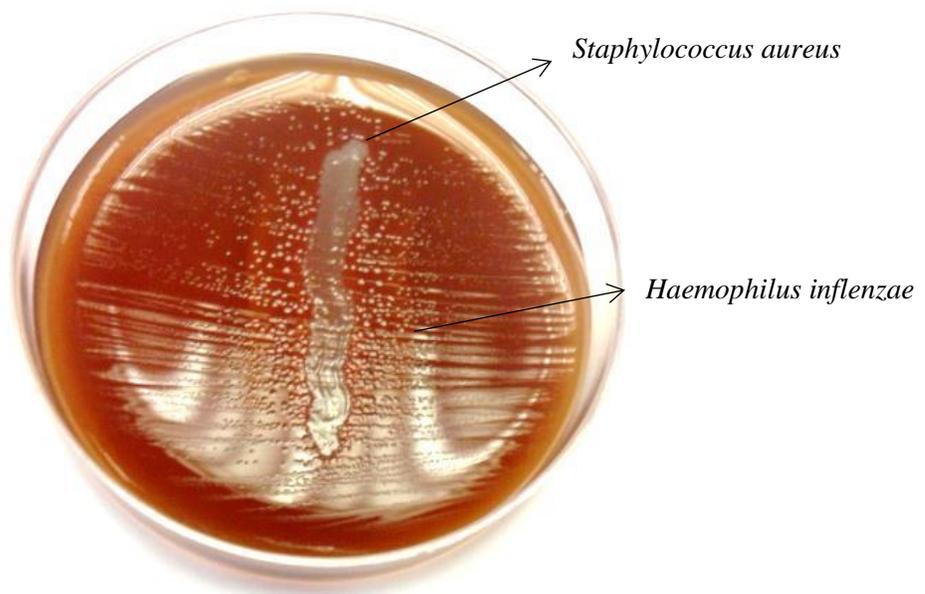


Figura 7.1 Resultado positivo para la prueba de “Satelitismo”

Foto tomada en el Laboratorio de Microbiología L-513.

NOTA:

Un método adicional para determinar el requerimiento de estos factores es mediante discos o tiras de papel filtro impregnados con factor X, V o XV. Ambos factores son hidrosolubles y por eso se difunde fácilmente en el medio. Se toma un inculo del microorganismo de prueba de caldo soya tripticaasa se transfiere y se inocula en agar infusión cerebro corazón o

agar soya tripticasa. Utilizando una técnica aséptica, se colocan los discos que se desea usar sobre el agar inoculado. La presencia o ausencia de crecimiento alrededor y/o entre los discos impregnados de los factores V, X y VX se valora para determinar las especies del organismo. (BD, 2010)

Los siguientes temas se basaran en una breve descripción de los microorganismos en su proliferación en medios de cultivo. No se describirá ninguna prueba de identificación.

CAPÍTULO 8

Enterobacteriaceae

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010)

Los miembros clínicamente importantes del género *Enterobacteriaceae* pueden considerarse en dos grupos: los patógenos oportunistas y los patógenos manifiestos. *Salmonella typhi*, las especies de *Shigella* y *Y. pestis* se encuentran en el último grupo.

Los patógenos oportunistas más frecuentes son especies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Serratia*. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

Los géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* que colonizan con frecuencia a los seres humanos o se asocian con infecciones humanas son las siguientes:

- | | |
|---|---|
| ◆ <i>Citrobacter freundii</i> | ◆ <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| ◆ <i>Citrobacter (diversus) koseri</i> | ◆ <i>Klebsiella ozaenae</i> |
| ◆ <i>Citrobacter amalonaticus</i> | ◆ <i>Morganella morganii</i> subesp. |
| ◆ <i>Edwardsiella tarda</i> | <i>morganii</i> |
| ◆ <i>Enterobacter aerogenes</i> | ◆ <i>Plesiomonas shigelloides</i> |
| ◆ <i>Enterobacter cloacae</i> | ◆ <i>Proteus mirabilis</i> |
| ◆ Grupo <i>Enterobacter agglomerans</i> | ◆ <i>Proteus vulgaris</i> |
| (<i>Pantoea agglomerans</i>) | ◆ <i>Proteus penneri</i> |
| ◆ <i>Enterobacter gergoviae</i> | ◆ <i>Providencia rettgeri</i> |
| ◆ <i>Enterobacter sakazakii</i> | ◆ <i>Providencia stuartii</i> |
| ◆ <i>Enterobacter amnigenus</i> | ◆ <i>Salmonella</i> todos los serotipos |
| ◆ <i>Escherichia coli</i> | ◆ <i>Serratia marcescens</i> |
| ◆ <i>Hafnia alvei</i> | ◆ <i>Serratia liquefaciens</i> |

- ◆ *Shigella dysenteriae* (grupo A)
- ◆ *Shigella flexneri* (grupo B)
- ◆ *Shigella boydii* (grupo C)
- ◆ *Shigella sonnei* (grupo D)
- ◆ *Yersenia pestis*
- ◆ *Yersenia enterocolitica* subesp. *enterolitica*
- ◆ *Yersenia frederiksenii*
- ◆ *Yersenia intermedia*
- ◆ *Yersenia pseudotuberculosis*

(Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

Los miembros de *Enterobacteriaceae* demuestran las siguientes características:

- ◆ Fermentadores de glucosa.
- ◆ Citocromo oxidasa negativa.
- ◆ Reducción de nitrato a nitrito. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

CARACTERES MORFOLOGICOS

Las *Enterobacteriaceae* son bacilos gramnegativos, no formadores de esporas. Pueden ser móviles o inmóviles, capsulados o no.

A continuación se muestran el aspecto y características de las colonias en agar MacConkey y agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD).

Tabla 8.1 Aspecto y características de las colonias de enterobacterias en Agar MacConkey y XLD.

Microorganismo	Medio	Aspecto de las colonias
Especies de <i>Citrobacter</i>	MacConkey	Fermentador tardío de la lactosa, fermenta la lactosa después de 48 h; las colonias son de color rosa pálido.
	XLD	Colonias rojas, amarillas o incoloras, con centros negros o sin ellos (H ₂ S).
Especies de <i>Edwarsiella</i>	MacConkey	Colonias incoloras, no fermenta la lactosa.
	XLD	Colonias rojas, amarillas o incoloras, con centros negros o sin ellos (H ₂ S).
Especies de <i>Enterobacter</i>	MacConkey	Fermentador de lactosa, colonias rosada,

		pueden ser mucoides.
	XLD	Colonias amarillas.
Especies de <i>Escherichia coli</i>:	MacConkey	Fermentador de lactosa; colonias planas, secas y rosadas.
	XLD	Colonias amarillas.
Especies de <i>Hafnia alvei</i>:	MacConkey	Colonias incoloras, no fermenta la lactosa.
	XLD	Colonias rojas o amarillas.
Especies de <i>Klebsiella</i>:	MacConkey	Fermentador de lactosa; colonias rosadas de aspecto mucoide.
	XLD	Colonias amarillas.
Especies de <i>Morganella</i>:	MacConkey	Colonias incoloras, no fermenta la lactosa.
	XLD	Colonias rojas o incoloras.
Especies de <i>Proteus</i>:	MacConkey	Colonias incoloras, no fermenta la lactosa; pueden crecer como enjambre, lo que depende de la cantidad de agar en el medio, olor característico a podrido.
	XLD	Colonias amarillas o incoloras.
Especies de <i>Providencia</i>:	MacConkey	Colonias incoloras, no fermenta la lactosa.
	XLD	Colonias amarillas o incoloras.
Especies de <i>Salmonella</i>:	MacConkey	Colonias incoloras, no fermenta la lactosa.
	XLD	Colonias rojas con el centro negro.
Especies de <i>Serratia</i>:	MacConkey	Fermentador lento de lactosa, colonias rosadas.
	XLD	Colonias amarillas o incoloras.
Especies de <i>Shigella</i>:	MacConkey	Colonias incoloras, no fermenta la lactosa.

	XLD	Colonias incoloras.
Especies de <i>Yersenia</i>:	MacConkey	Puede presentar colonias incoloras hasta un color durazno; no fermenta la lactosa.
	XLD	Colonias amarillas o incoloras.

(Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

CARACTERES DE CULTIVO

Se dispone de tres tipos generales de medio para la recuperación de *Enterobacteriaceae* de muestras clínicas que potencialmente alojan bacterias mixtas:

- ◆ Medio no selectivo: agar sangre
- ◆ Medios selectivo y diferencial: agar MacConkey, agar Hektoen, agar eosina azul de metileno (EMB), agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar xilosa, lisina desoxicolato (XLD).
- ◆ Caldos de enriquecimiento: caldo de tioglicolato, caldo de infusión cerebro corazón, caldo de selenito, caldo para gramnegativo. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Todas las enterobacterias fermentan glucosa con producción de gas o sin ella, anaerobios facultativos, reducen nitratos a nitritos (con algunas excepciones), no licuan el alginato, son oxidasa negativa, producen catalasa y no ven favorecido su crecimiento por la presencia de NaCl. (Kenneth J. & C. George, 2004), (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La diferenciación de *Enterobacteriaceae*, se basa primariamente en la ausencia o presencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Los sustratos sobre los cuales pueden reaccionar estas enzimas están incorporados al medio de cultivo, junto con un indicador que puede detectarse por la utilización de sustrato o por la presencia de productos metabólicos específicos. Mediante la selección de series de medios que miden las diferentes características metabólicas de los microorganismos que se deben ensayar, pueden determinarse su perfil bioquímico para hacer una clasificación de especies. (Koneman, Allen, Jonda, Schreckenberger, & Washington, 1999)

En el laboratorio se realiza la identificación preliminar de *Enterobacteriaceae* en base a las características de las colonias en los siguientes medios y las reacciones bioquímicas que estos presenten:

- ◆ Agar MacConkey
- ◆ Agar EMB
- ◆ Agar *Salmonella-Shigella*
- ◆ Agar Sulfito de Bismuto
- ◆ Agar Verde Brillante

AGAR MACCONKEY

USO

Es un medio selectivo y diferencial para la detección de organismos coliformes y patógenos entéricos.

PRINCIPIO

Agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial. Sólo es ligeramente selectivo ya que la concentración de sales biliares, que inhibe microorganismos grampositivos, es baja en comparación con otros medios de enchapado entéricos. El cristal violeta también se incluye en el medio para inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas, especialmente *Enterococcus* y *Staphylococcus*. La diferenciación de microorganismos entéricos se logra mediante la combinación de lactosa y el indicador rojo neutro. Incoloro o de color rosa a colonias de color rojo se producen dependiendo de la capacidad de la cepa para fermentar los hidratos de carbono. (BBL, 2006)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Agar MacConkey

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

B. Positivo (+): *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*.

C. Negativo (-): Microorganismos grampositivos (*Listeria ssp.*).

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba e inocular por técnica de dilución en la placa.
2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento.

RESULTADOS



Figura 8.1 Agar MacConkey sin inocular.

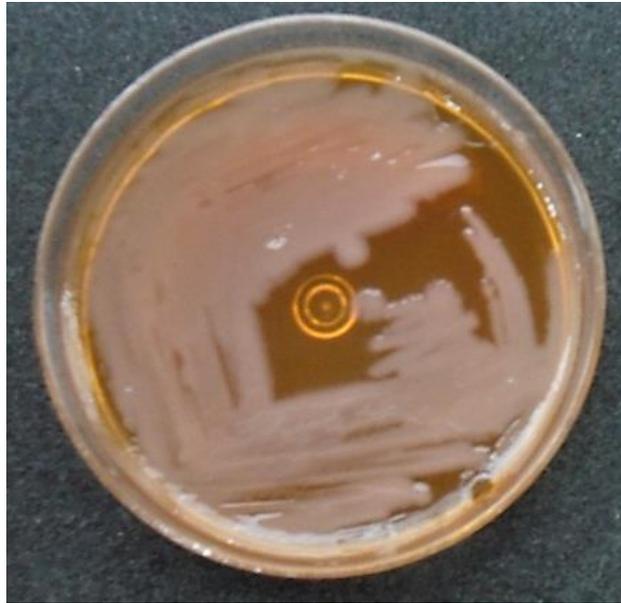


Figura 8.2 *Pseudomonas* ssp. no fermentador de lactosa.

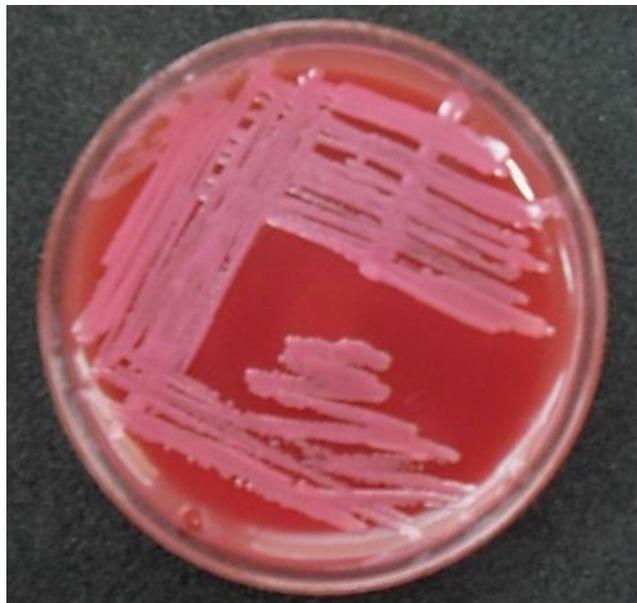


Figura 8.3 *E. coli* fermentador de lactosa.

Fotos tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado.

AGAR EMB

(Eosina Azul de Metileno)

USO

El **Agar EMB** (agar eosina azul de metileno, modificado, fórmula de Holt-Harris y Teague) es un medio ligeramente selectivo y diferencial para el aislamiento y la diferenciación de bacilos gramnegativos entéricos (*Enterobacteriaceae* y diversos bacilos gramnegativos) en muestras clínicas y no clínicas.

PRINCIPIO

Este agar contiene los colorantes de azul de metileno y eosina Y, que inhiben las bacterias grampositivas en cierto grado. Los colorantes también actúan como indicadores diferenciales en respuesta a la fermentación de la lactosa o la sacarosa por parte de los microorganismos. Los coliformes producen colonias de color negro azulado, mientras que las colonias de *Salmonella* y *Shigella* son incoloras o de color ámbar transparente. Las colonias de *E. coli* pueden exhibir un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa.

Este medio puede inhibir el crecimiento de las bacterias grampositivas como los *Streptococcus* grupo D, *Staphylococcus* y levaduras, o bien favorecer su crecimiento con formación de colonias puntiformes. (BD, 2011)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Agar EMB

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

B. Positivo (+): *E. coli.*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*

C. Negativo (-): Microorganismos grampositivos (*Staphylococcus ssp.*)

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba y sembrar por técnica de dilución en la placa.

2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento.

RESULTADOS



Figura 8.4 Agar EMB sin inocular.

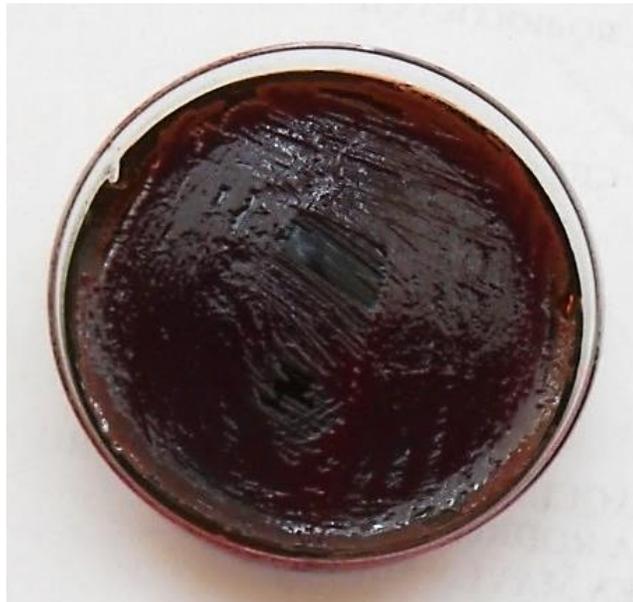


Figura 8.5 Colonias de *Proteus mirabilis* no fermentadoras de lactosa.

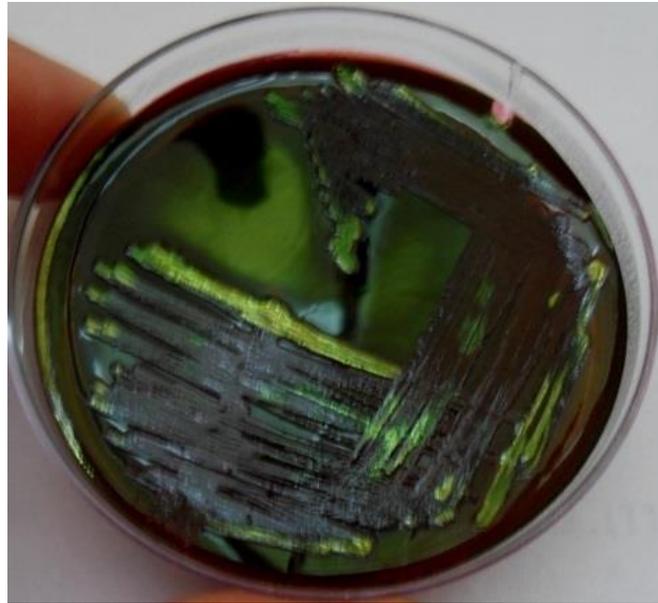


Figura 8.6 Colonias de *E. coli* con presencia de brillo verde metálico debido a la fermentación de lactosa.

Fotos tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado.

AGAR SALMONELLA-SHIGELLA (SS)

USO

Agar Salmonella Shigella o Agar SS es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, en especial los pertenecientes al género *Salmonella*.

PRINCIPIO

El agar *Salmonella-Shigella* es una modificación del agar citrato desoxicolato descrito por Leifson. Se le considera un medio moderadamente selectivo según el nivel de inhibición de los microorganismos grampositivos y *Enterobacteriaceae* diferentes de *Salmonella* y *Shigella*, que inhibe por contenido de sales biliares, verde brillante y citratos.

En este agar, la diferenciación de los organismos entéricos se logra mediante la incorporación de lactosa en el medio. Los organismos que fermentan lactosa producen

ácido que, en presencia del indicador rojo neutro, propicia la formación de colonias de color rojo. Los organismos no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras. Este último grupo incluye la mayoría de los patógenos intestinales, incluidas *Salmonella* y *Shigella*. El tiosulfato sódico y el citrato férrico permiten la detección de producción de ácido sulfhídrico, como lo demuestran las colonias con centros de color negro. Este medio se utiliza para el aislamiento primario de *Salmonella* a partir de muestras fecales humanas. Dado que existen medios más eficaces para el aislamiento de *Shigella*, no debe utilizarse para el aislamiento de este microorganismo. (BD, 2011)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Agar SS

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

B. Positivo (+): *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*.

C. Negativo (-): Microorganismos grampositivos (*Staphylococcus ssp.*).

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba y sembrar por técnica de dilución en la placa.
2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento.

RESULTADOS



Figura 8.7 Agar SS sin inocular.

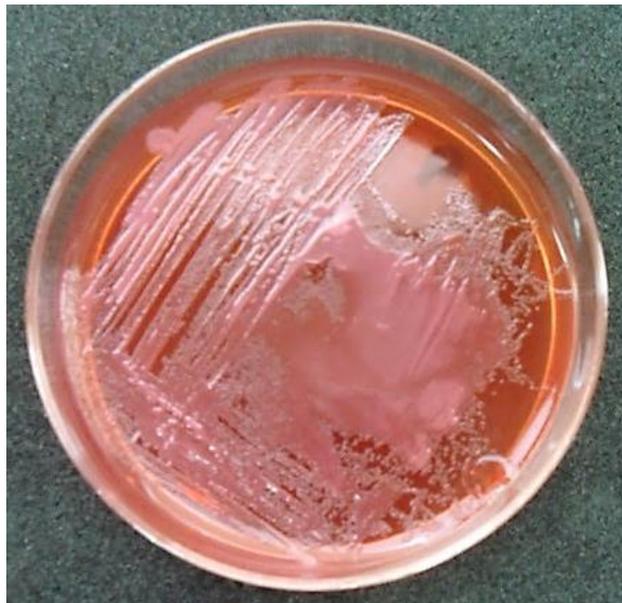


Figura 8.8 Colonias de *Enterobacter aerogenes* fermentador de lactosa.

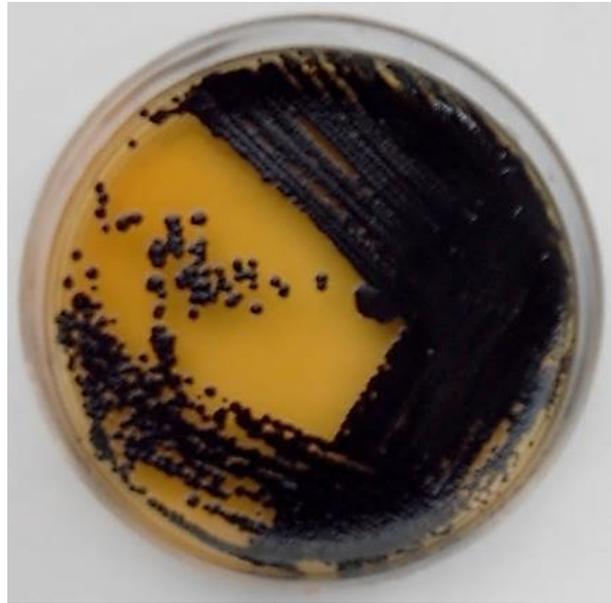


Figura 8.9 Colonias de *Salmonella typhimurium* Producción de H₂S.

Fotos tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado.



Figura 8.10 Colonias de *Shigella sonnei* no fermentador de lactosa.

Foto tomada de (Thermo SCIENTIFIC, 2013).

AGAR SULFITO DE BISMUTO

USO

Medio selectivo para el aislamiento y diferenciación de *Salmonella typhi* y otras *Salmonellas* a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

La peptona, el extracto de carne y la dextrosa proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El sulfato ferroso actúa como indicador en la producción de sulfuro de hidrógeno que se manifiesta en el centro de la colonia por un precipitado negro y un halo negro grisáceo con brillo metálico por la reducción de los iones bismuto en presencia del sulfuro de hidrógeno.

El sulfito de bismuto y el verde brillante inhiben considerablemente el crecimiento de bacterias contaminantes. (DIBICO, 2013)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Agar Sulfito de Bismuto

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

B. Positivo (+): *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*.

C. Negativo (-): Microorganismos grampositivos (*Staphylococcus ssp.*).

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba y sembrar por técnica de dilución en la placa.
2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento.

RESULTADOS



Figura 8.11 Agar Sulfito de Bismuto sin inocular.



Figura 8.12 Colonias de *Pseudomonas* ssp.



Figura 8.13 Colonias de *S. typhimurium* con reducción del bismuto producción de brillo metálico y producción de H₂S.

Fotos tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado.

AGAR VERDE BRILLANTE

USO

Medio de enriquecimiento altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella* spp., excepto *S. typhi* y *S. paratyphi*, a partir de muestras clínicas, alimentos, y otros materiales de importancia sanitaria.

PRINCIPIO

Este medio es recomendado para ser usado con muestras clínicas y de alimentos. La alta selectividad de este medio, permite el uso de inóculos moderados y pesados. El Agar Verde Brillante es de mucho valor cuando se quiere investigar la presencia de especies de *Salmonella* diferentes a *S. typhi* y *S. paratyphi*. Este medio también es utilizado en las pruebas de límites microbianos recomendadas en la USP. (MCD LAB, 2013)

En este medio de cultivo las peptonas y el extracto de levadura proporcionan la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. (MCD LAB, 2013) La lactosa y sacarosa con rojo fenol forman un sistema de diferenciación para excluir los fermentadores de lactosa o sacarosa (*E. coli*), mientras que las *Salmonella* no producen ácidos a partir de estos azúcares. (BD, 2011) El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El verde brillante actúa como inhibidor de bacterias grampositivas y de la mayoría de bacterias gramnegativas diferentes a *Salmonella*. (MCD LAB, 2013)

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

A. Agar Verde Brillante

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

B. Positivo (+): *Salmonella typhimurium*, *Salmonella abony*.

C. Negativo (-): *Enterococcus faecalis*, *E. coli*.

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba y sembrar por técnica de dilución en la placa.
2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento.

RESULTADOS



Figura 8.14 Agar Verde Brillante sin inocular.



Figura 8.15 Colonias de *Enterobacter aerogenes*.

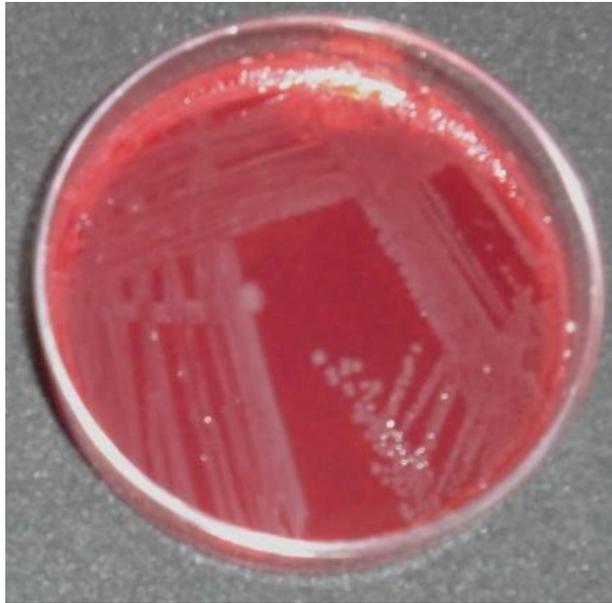


Figura 8.16 Colonias de rosa a blanco de *Salmonella typhimurium*.

Fotos tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado.

CAPÍTULO 9

Pseudomonas

El género *Pseudomonas* incluye unas 30 especies que en su mayor parte se encuentran en el agua, y en cualquier sitio donde haya materia orgánica en descomposición. La especie de *Pseudomonas* mejor conocida y la única patógena para el hombre es *Pseudomonas aeruginosa*. (Freeman, 1974)

CARACTERES MORFOLOGICOS

Pseudomonas está formado por células bacterianas delgadas, de forma bacilar, móviles en su mayor parte por flagelos polares (monotricos o lofotricos), no esporuladas, gramnegativas. Producen un pigmento difusible de color verde, azul, violeta, rosado o pardo. A veces el pigmento es rojo o amarillo y no difusible.

Pseudomonas aeruginosa son bacilos que aparecen solos, en parejas o en cadenas cortas. No forman esporas ni poseen cápsula; son móviles por uno o tres flagelos polares; siendo gramnegativos, presentan gránulos que se tiñen definitivamente con el método de Neisser. (Divo, 1990) Produce un aspecto característico cuando crece en agar sangre. Aparece como grandes colonias grises con una periferia en expansión y muestra β -hemólisis. Las colonias a menudo tienen aspecto de piel de caimán y muestran un brillo metálico. (Koneman, y otros, 2008)

En agar simple se producen grandes colonias redondas, brillantes confluentes, de borde continuo u ondulado, grisáceas con el centro opaco y periferia traslúcida. Si bien la colonia no toma color por el pigmento elaborado, éste se difunde en el medio comunicándole una tonalidad verdosa fluorescente en los primeros días que posteriormente se vuelve parda. (Divo, 1990)

CARACTERES DE CULTIVO

Crecen fácilmente en medios comunes como agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate, agar MacConkey este último debe incubarse en aerobiosis, y también en caldos nutritivos comunes como el tioglicolato y la infusión cerebro corazón. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009) En caldo simple se desarrolla en exceso, forma una fuerte turbidez, anillo y película,

denso depósito viscoso desintegrable, olor intenso debido a la trimetilamina, y transmite al medio un color verde azulado. (Divo, 1990)

El uso de los siguientes medios mejora la producción de piocianina como agar P y agar Cetrimida que se utiliza para el aislamiento selectivo de *P. aeruginosa* y contribuye con la inhibición selectiva de organismos diferentes de *P. aeruginosa*. (BD, 2011)

Los medios que contienen proteosa peptona y cationes, como magnesio o manganeso, aumentan la síntesis de fluoresceína. El medio King B, el medio Sellers, agar F y el agar de Mueller-Hinton, también son apropiados para demostrar fluoresceína. El tubo estrangulado para fermentadores gramnegativos permite una observación visual del pigmento amarillo y es posible que no sea necesaria la luz ultravioleta. La fluoresceína puede aumentar si se incuban los cultivos a 20 a 30°C en lugar de hacerlo a 35°C a 37°C. (Koneman, y otros, 2008)

PROPIEDADES METABÓLICAS

Aerobio, de temperatura óptima 37°C; licua rápidamente la gelatina, hemoliza la sangre y es oxidasa positivo. Ejerce acción bactericida sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos mediante sus pigmentos, siendo el más activo el amarillo y mediante la bacteriocina.

Los pigmentos, productos metabólicos más característicos son dos:

- ◆ La piocianina de color azul, soluble en agua y cloroformo
- ◆ Fluoresceína, amarillo verdoso, soluble en agua, pero no en cloroformo. (Divo, 1990)

La mayoría de las cepas producen piocianina, un pigmento fenazínico verde hidrosoluble que imparte un color verdoso al medio de cultivo. De hecho, la presencia de piocianina puede ser la única característica para identificar *P. aeruginosa*, porque ningún otro fermentador sintetiza este pigmento. (Koneman, y otros, 2008) Son productos de la oxidación de compuestos incoloros y ambos se oxidan en los cultivos viejos pasando a una coloración morena oscura. (Divo, 1990) Se puede observar el pigmento de fluoresceína observando el crecimiento en ciertos medios que utilizan una fuente de luz ultravioleta de longitud de onda larga. (Koneman, y otros, 2008)

Acidifica sólo la glucosa sin formación de gas, nitrato positivo, indol negativo; alcaniza la leche tornasolada en la cual produce un coágulo blando seguido de peptonización rápida y una reducción del indicador; muestra H₂S variable. No descarboxila la ornitina ni la lisina, pero sí hidroliza la arginina. (Divo, 1990) Puede distinguirse de los otros miembros de este grupo por su capacidad de crecer a 42°C. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

La detección de un olor similar al de uvas también es un indicio útil cuando se examina el crecimiento en placas de agar. Algunas cepas de *P. aeruginosa* pueden producir pigmentos con otros colores: piorrubina (rojo), piomelanina (pardo a negro) y pioverdina (amarillo). (Koneman, y otros, 2008)

Las cepas mucoides de *P. aeruginosa* pueden no exhibir el pigmento característico y reaccionar con mayor lentitud en las pruebas bioquímicas que las cepas no mucoides, debido a esto las pruebas bioquímicas estándares deben conservarse durante 7 días completos antes de considerarse negativas. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Para su identificación en el laboratorio de Microbiología se siembra en agar P, agar F y agar Cetrimida para el reconocimiento de sus caracteres morfológicos y culturales así como la identificación del pigmento verde azulado (piocianina).

AGAR CETRIMIDA

USO

Para el aislamiento selectivo de *P. aeruginosa* a partir de muestras clínicas y otros materiales.

PRINCIPIO

Su formulación permite el crecimiento selectivo de *P. aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos. En éste medio la peptona sirve como fuente de nitrógeno, y el glicerol se utiliza como fuente de carbono y energía. (BD, 2011) El cloruro de magnesio y el sulfato

de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa*. (Britania, 2010)

La cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*. (Britania, 2010)

AGAR P

USO

Para la diferenciación de *P. aeruginosa* a partir de otras *Pseudomonas* basándose en la producción de piocianina.

PRINCIPIO

En este medio, Bacto Peptone proporciona el carbono y el nitrógeno necesarios para el crecimiento bacteriano. Favorece la producción de piocianina al añadirse cloruro de magnesio y sulfato de potasio, e inhibe la formación de fluoresceína. Ambos pigmentos se difunden desde las colonias de *Pseudomonas* al medio en el que crecen. Algunas cepas de *Pseudomonas* elaboran ambos pigmentos, mientras que otras producen sólo uno. La piocianina en este medio es de color azul. El glicerol se utiliza como fuente de energía y también favorece la producción de piocianina.

Una cepa de *Pseudomonas* productora de piocianina también produce fluoresceína. Por tanto, debe diferenciarse de otras *Pseudomonas* fluorescentes simples mediante otros métodos. La temperatura de incubación puede ser un factor determinante, dado que la mayoría de las demás cepas fluorescentes no crecen a 35°C. En cambio, crecen a 25-30°C. (BD, 2003)

AGAR F

USO

Para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* en base a la producción de fluoresceína.

PRINCIPIO

En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de carne aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, la concentración de fosfato dipotásico estimula la producción de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina y piorrubina. El sulfato de magnesio provee los cationes necesarios que incrementan la producción de fluoresceína y el agar es el agente solidificante.

PROCEDIMIENTO

I. Medios y Reactivos

- A. Agar Cetrimida
- B. Agar F
- C. Agar P

II. Microorganismos utilizados para el control de calidad

- D. Positivo (+): *Pseudomonas aeruginosa*.
- E. Negativo (-): *Escherichia coli*.

III. Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica tomar una muestra del microorganismo de prueba e inocular por técnica de dilución en la placa.
2. Incubar la placa invertida (tapas hacia abajo) a 37°C por 18-24 h.
3. Observar crecimiento.

RESULTADOS



Figura 9.1 Colonias de *Pseudomonas* ssp. en agar Cetrimida.



Figura 9.2 Producción del pigmento piocianina en agar P.

Fotos tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología en el área de Posgrado.

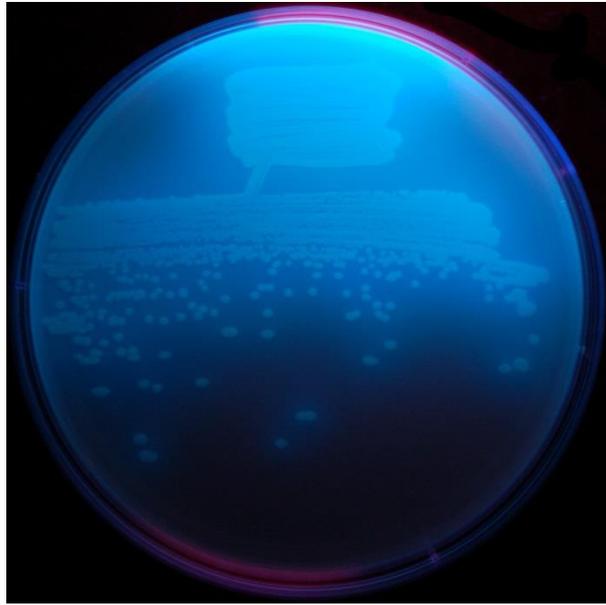


Figura 9.3 Producción de fluoresceína en agar F bajo la luz UV.

Foto tomada de (WIKIMEDIA COMMONS, 2011).

CONCLUSIONES

La realización de este compendio de identificación bacteriana proporciona al estudiante los conceptos y técnicas de manera sencilla, sintetizada y adaptada a lo que se realiza en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad Estudios Superiores Cuautitlán Campo I.

Puede ser utilizado como un instrumento de apoyo y consulta para el estudiante previo a la realización de las prácticas en el laboratorio.

Permite al estudiante realizar la elección de una prueba o de un conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo, en función del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar o del origen de la colonia bacteriana.

Finalmente, constituye una herramienta de consulta para el personal de salud que requiera retomar los conocimientos adquiridos en su formación, ya que ofrece acceso a una consulta rápida y resumida de los fundamentos de pruebas de identificación en el área de Microbiología.

REFERENCIAS:

- ✦ Almeida, R., & Jorgensen, J. (Diciembre de 1982). Use of Mueller-Hinton Agar to Determine Novobiocin Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(6), 1155-1156.
- ✦ Alonso-Urmenta, B., Aragón, V., Bengoechea, J., Diaz, R., Gamazo, C., García-Jalón, I., y otros. (1999). *Manual Práctico de Microbiología* (2a. ed.). Masson.
- ✦ Álvarez Manrique, C. I., & Mendoza, E. S. (1994). *Manual Básico de Bacteriología* (1a. ed.). Fes Cuautitlán: UNAM. págs. 102-103, 106-110, 113.
- ✦ BBL. (Mayo de 2006). *BD*. Recuperado el 11 de Febrero de 2013, de BD: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007505\(05\)\(0506\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007505(05)(0506).pdf)
- ✦ BBL. (Julio de 2006). *BD*. Recuperado el 19 de Abril de 2013, de BD: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007448%2810%29%280706%29_ES.pdf
- ✦ BBL. (May de 2006). *BD*. Recuperado el 19 de Abril de 2013, de BD: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007462\(09\)\(0506\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007462(09)(0506).pdf)
- ✦ BBL. (October de 2006). *BD*. Recuperado el 03 de Junio de 2013, de BD: [https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007388\(08\)\(1006\).pdf](https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007388(08)(1006).pdf)
- ✦ BBL. (January de 2011). *BD*. Recuperado el 12 de Febrero de 2013, de BD: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007495\(09\)\(201101\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007495(09)(201101).pdf)
- ✦ BBL. (Enero de 2011). *BD*. Recuperado el 14 de Febrero de 2013, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22719>
- ✦ BD. (Junio de 2003). *BD*. Recuperado el 11 de Junio de 2013, de BD: <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-257018.pdf>
- ✦ BD. (Junio de 2003). *BD*. Recuperado el 07 de Junio de 2013, de BD: <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254432.pdf>
- ✦ BD. (Julio de 2010). *BD*. Recuperado el 01 de Junio de 2012, de BD: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L000166\(201007\).pdf#page=2&view=Fit](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L000166(201007).pdf#page=2&view=Fit)
- ✦ BD. (Junio de 2010). *BD*. Recuperado el 03 de Abril de 2013, de BD: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L000156\(201006\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L000156(201006).pdf)
- ✦ BD. (Septiembre de 2011). *BD*. Recuperado el 30 de Mayo de 2012, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>

- ⊕ BD. (Septiembre de 2011). *BD*. Recuperado el 03 de Junio de 2013, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8765>
- ⊕ BD. (Septiembre de 2011). *BD*. Recuperado el 03 de Junio de 2013, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8779>
- ⊕ BD. (Septiembre de 2011). *BD*. Recuperado el 03 de Junio de 2013, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8755>
- ⊕ BD. (Septiembre de 2011). *BD*. Recuperado el 11 de Junio de 2013, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8794>
- ⊕ BD. (Septiembre de 2011). *BD*. Recuperado el 05 de Junio de 2013, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
- ⊕ BD. (Octubre de 2012). *BD*. Recuperado el 03 de Abril de 2013, de BD: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
- ⊕ Berbabeu Esclapez, A., & Martín Luengo, F. (1992). *Clostridium difficile: características biológicas y metodología para el aislamiento, caracterización y detección de toxinas*. (3a. ed.). Universidad de Murcia. pág. 23.
- ⊕ Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. (25 de Septiembre de 2013). *Medline Plus*. Recuperado el 12 de Febrero de 2013, de Medline Plus: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a601098-es.html>
- ⊕ Blinn College. (s.f.). *Blinn College*. Recuperado el Abril de 19 de 2013, de Blinn College: <http://www.blinn.edu/natscience/phillips/micro%20pictures.htm#Litmus>
- ⊕ Britania. (Febrero de 2010). *Britania*. Recuperado el 11 de Junio de 2013, de Britania: http://www.britanialab.com/productos/304_hoja_tecnica_es.pdf
- ⊕ Burrows, W. (1974). *Tratado de Microbiología* (20a. ed.). Nueva Editorial Interamericana. págs. 550, 558.
- ⊕ Catering Rodriguez, E., & Realpe Delgado, M. (2011). *Manual de Identificación y Susceptibilidad de Haemophilus influenzae*. (I. N. Salud, Ed.) Colombia. págs. 12-13.
- ⊕ Centers for Disease Control and Prevention. (18 de March de 2005). *Centers for Disease Control and Prevention*. Recuperado el 11 de Marzo de 2013, de Centers for Disease Control and Prevention: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>

- ✦ Chans, G. R. (s.f.). *educa2.madrid.org*. Recuperado el 15 de Marzo de 2012, de *educa2.madrid.org*: http://www.educa2.madrid.org/cms_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/16.-%20Estafilococos.pdf
- ✦ Clarke, P. (1953). Hydrogen Sulphide Production by Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 8, 397-407.
- ✦ Coleman, D. J., Mcghie, D., & Tebbutt, G. M. (Mayo de 1977). Further studies on the reliability of the bacitracin inhibition test for the presumptive identification of Lancefield group A streptococci. *Journal of Clinical Pathology*, 30(5), 421-426.
- ✦ Darling, C. (Febrero de 1975). Standardization and Evaluation of the CAMP Reaction for the Prompt, Presumptive Identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield Group B) in Clinical Material. *Journal of Clinical Microbiology*, 1(2), 171-174.
- ✦ De la Rosa Frailé, M., & Prieto Prieto, J. (2003). *Microbiología en ciencias de la salud; conceptos y aplicaciones* (2a. ed.). Elsevier.
- ✦ DIBICO. (2013). *DIBICO*. Recuperado el 03 de Junio de 2013, de DIBICO: <http://www.dibico.com/fichast/1026.pdf>
- ✦ Divo, A. (1990). *Microbiología Médica* (4a. ed.). Interamericana Mc Graw Hill. págs. 109-115, 116-128, 130, 171-172, 179-183, 199-200, 211, 214-215, 218-219, 221, 225.
- ✦ Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (Edits.). (2006). *The Prokaryotes* (Vol. 6o.). Springer Science+ Business Media.
- ✦ Edberg, S., Gam, K., Bottenbley, C., & Singer, J. (Agosto de 1976). Rapid Spot Test for the Determination of Esculin Hydrolysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(2), 180-184.
- ✦ Ederer, G. R., & Lee, M. R. (Marzo de 1977). Evaluation of the Rapid Hippurate Hydrolysis Test with Enterococcal Group D Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 5(3), 290-292.
- ✦ Esseveld, H., Daniëls-Bosman, M. S., & Leijnse, B. (11 de Enero de 1958). Some observations about the CAMP reaction and its application to human β -haemolytic Streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek Journal Microbiology Serology*, 145-156.
- ✦ Facultad de Química. (2012). *Departamento de Programas Audiovisuales*. Recuperado el 17 de Abril de 2013, de Departamento de Programas Audiovisuales: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Protocolosdepracticass2012_18791.pdf

- ✦ Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). *SEIM*. (E. Cercenado, & R. Cantón, Edits.) Recuperado el 26 de Abril de 2013, de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
- ✦ Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). *Bayley & Scott Diagnóstico Microbiológico* (12a. ed.). Médica Panamericana. págs. 3, 219-221, 223, 238, 243, 265-278, 281-283, 289, 292, 297, 323-324, 328, 343-348, 372, 374-375, 403, 405-407, 431-432.
- ✦ Freeman, B. (1974). *Burrows William. Tratado de Microbiología*. (20a. ed.). Nueva Editorial Interamericana. págs. 509-511.
- ✦ García del Valle, A., & Zamudio Durán, M. (1998). *Google Books*. Recuperado el 19 de Abril de 2013, de Google Books: <http://books.google.com.mx/books?id=b3FKwKELz4YC&pg=PA33&lpg=PA33&dq=Su+distribuci%C3%B3n+en+la+naturaleza+es+amplia,+com%C3%BAmente+s+e+encuentran+como+sapr%C3%B3fitos+en+el+suelo,+agua+y+vegetaci%C3%B3n+;+algunos+tambi%C3%A9n+pueden+encontrarse+en+el+tra>
- ✦ García Martos, P., Fernández del Barrio, M. T., & Paredes Salido, F. (1997). *Microbiología Clínica Aplicada* (1a. ed.). Ediciones Díaz Santos.
- ✦ Gardam, M. A., & Miller, M. A. (March de 1998). Optochin Revisited: Defining the Optimal Type of Blood Agar for Presumptive Identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 833-834.
- ✦ Hardy Diagnostics. (s.f.). *Hardy Diagnostics*. Recuperado el 12 de Febrero de 2013, de Hardy Diagnostics: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/HardyDiskBacitracinDiffDisks.htm
- ✦ Hardy Diagnostics. (s.f.). *Hardy Diagnostics*. Recuperado el 13 de Febrero de 2013, de Hardy Diagnostics: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/HardyDiskOptochinDiffDisks.htm
- ✦ Hernández Monroy, I., Peña Flores, G., & Betancourt Morillo, X. (1996). *Manual de prodeciminetos de laboratorio INDRE/SAGAR: 19, Brucelosis*. Distrito Federal, México: Secretaria de Salud, Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. págs. 13, 19, 20, 26-35.
- ✦ HIMEDIA. (February de 2011). *HIMEDIA*. Recuperado el 21 de Marzo de 2013, de HIMEDIA: <http://himedialabs.com/TD/DD034.pdf>

- ✦ Hussain Qadri, S. M., Nichols, C. W., & Qadri, S. G. (February de 1978). Rapid Sodium Chloride Tolerance Test for Presumptive Identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(2), 238.
- ✦ Ibarra Arias, M. (2008). *Universidad Autónoma de Baja California, Escuela de Ciencias de la Salud*. Recuperado el 29 de Abril de 2013, de Universidad Autónoma de Baja California, Escuela de Ciencias de la Salud: http://medicina.ens.uabc.mx/manuales_laboratorio/L3M-N3-002.pdf
- ✦ INDRE. (Marzo 14 de 2011). *INDRE*. Recuperado el 23 de Marzo de 2013, de INDE: http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/interior/lab_bruceles.html
- ✦ Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. (1994). *Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales*. (S. Giono Cerezo, A. Escobar Gutierrez, & J. L. Valdespino Gomes, Edits.) Distrito Federal, México. págs. 309-329.
- ✦ Instituto Politécnico Nacional. (2013). *UPIBI*. Recuperado el 18 de Abril de 2013, de [UPIBI: http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/T%C3%A9cnicas%20microbiol%C3%B3gicas/T%C3%A9cnicas%20Microbiol%C3%B3gicas%20Parte%201.pdf](http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/T%C3%A9cnicas%20microbiol%C3%B3gicas/T%C3%A9cnicas%20Microbiol%C3%B3gicas%20Parte%201.pdf)
- ✦ Instituto Politécnico Nacional. (2013). *UPIBI*. Recuperado el 18 de Abril de 2013, de [UPIBI: http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Microbiolog%C3%ADa%20ambiental/II.TecMic-Preparaciones.pdf](http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Microbiolog%C3%ADa%20ambiental/II.TecMic-Preparaciones.pdf)
- ✦ Keast, A., & Riley, T. (1997). Identification of *Vibrio* spp. with the 'string' test. *Letters in Applied Microbiology*, 25(2), 106-108.
- ✦ Kenneth J., R., & C. George, R. (2004). *Sherris Microbiología Médica*. McGraw-Hill Interamericana. págs. 297-300, 311-312, 314, 320, 374.
- ✦ Koneman, E. W., Allen, S. D., Jonda, W. M., Schreckenberger, P. C., Washington, W. C., Woods, G., y otros. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color*. (6a. ed.). Médica Panamericana. págs. 238-239, 244, 301-304, 340, 342-344, 357-358, 371-372, 729-730, 733-735, 889.
- ✦ Koneman, E. W., Allen, S. D., Jonda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (1999). *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color*. Médica Panamericana. págs. 173, 180, 428-429, 529-554, 564-586, 590-603, 1230-1231, 1260-1263, 1265-1266, 1330, 1335-1336, 1343-1344.

- ⊕ López Merino, A. (2013). *Microbios en línea*. Recuperado el 22 de Marzo de 2013, de [Microbios en línea: http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap7/capitulo.html](http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap7/capitulo.html)
- ⊕ López, S. (2001). *Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de Meningitis Bacteriana*. (C. N. Nicaragua, Ed.) Nicaragua. págs. 7-8.
- ⊕ Mac Faddin, J. F. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica* (3a. ed.). Médica Panamericana. págs. 3-22, 33-50, 98-109, 177-189, 275-282, 340-342, 428-429.
- ⊕ Maxted, W. R. (1953). The Use of Bacitracin for Identifying Group A Hemolytic Streptococci. *Journal of Clinical Pathology*, 6, 224-226.
- ⊕ MCD LAB. (2013). *MCD LAB*. Recuperado el 03 de Junio de 2013, de MCD LAB: <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20VERDE%20BRILLANTE.pdf>
- ⊕ Miranda, C., & Rojo, M. (s.f.). *Control Calidad SEIMC*. Recuperado el 17 de Abril de 2013, de [Control Calidad SEIMC: http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Clostper.pdf](http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Clostper.pdf)
- ⊕ Molina López, J. (02 de Agosto de 2012). *Facultad de Medicina UNAM*. Recuperado el 01 de Junio de 2013, de [Facultad de Medicina UNAM: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html)
- ⊕ Norman, R., Chaves, E., & Garcia, F. (2006). *Bateriología Diagnóstica*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología. págs. 55-56, 79-80.
- ⊕ Perilla, M. J. (2004). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. Organización Mundial de la Salud. pág. 9.
- ⊕ Phillips, E., Tapsall, J., & Smith, D. (Agosto de 1980). Rapid Tube of CAMP for Identification of Streptococcus agalactiae (Lancefield Group B). *Journal of Clinical Microbiology*, 12(2), 135-137.
- ⊕ Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426-3431.
- ⊕ Qian, Q., Echelberger, K., & Kirby, J. E. (23 de Mayo de 2007). Rapid Identification of Staphylococcus aureus in Blood Cultures by Use of the Direct Tube Coagulase Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), 2267-2269.

- ✦ Sacsquispe Contreras Rosa, V. E. (2001). *Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias*. Peru: Instituto Nacional de Salud.
- ✦ Secretaría de Salud. (1991). *Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de Vibrio cholerae O1*. (S. Giono Cerezo, L. Gutierrez Cogco, & A. M. Hinojosa Ahumada, Edits.) Distrito Fderal, México.
- ✦ Secretaría de Salud. (1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Metodo de Prueba Microbiologico Para Alimentos. Determinacion de Listeria monocytogenes*. México. Obtenido de Secretaria de Salud.
- ✦ Secretaría de Salud. (2001). *Manual para la Vigilancia Epidemiológica del Cólera en México* (3a. ed.). México. págs. 22, 26-35.
- ✦ Smith, H. L. (1970). A Presumptive Test for Vibrios: the "String" Test. *Bulletin of the World Health Organization*, 42(5), 817-818.
- ✦ Sperber, W. H., & Tatini, S. R. (1975). Interpretation of the Tube Coagulase Test for Identification of Staphylococcus aureus. *Journal Applied Microbiology*, 29(4), 502-505.
- ✦ Thermo SCIENTIFIC. (2013). *Thermo SCIENTIFIC*. Recuperado el Junio de 03 de 2013, de Thermo SCIENTIFIC: http://www.thermoscientific.com/ecommservlet/productsdetail_11152___14825856_-1
- ✦ Trigoso A., C., Damiani M., E., Albarracín L., M., Monasterios A., M., Rodríguez O., K., Torrico H., E., y otros. (2000). *Manual para la Vigilancia de Laboratorio del Haemophius influenzae y del Streptococcus pneumoniae*. Bolivia: Instituto Nacional de Laboratorios de Salud. pág. 27.
- ✦ UNAM; Facultad de Química. (s.f.). *UNAM AMYD Facultad de Química*. Recuperado el 26 de Abril de 2013, de UNAM AMYD Facultad de Química: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Practica6.2PruebasBioquimicas_21633.pdf
- ✦ Universidad de Granada. (2013). *Prácticas online de Microbiología para Farmacéuticos*. Recuperado el 18 de Abril de 2013, de Prácticas online de Microbiología para Farmacéuticos: <http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/tinciones/endosporas>
- ✦ VADEMECUM. (2013). Recuperado el 18 de Abril de 2012, de VADEMECUM: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/b001.htm>

- ✦ *Virtual Unknown Microbiology*. (s.f.). Recuperado el 12 de Febrero de 2013, de Virtual Unknown Microbiology: http://www.vumicro.com/vumie/help/VUMICRO/Bacitracin_Susceptibility.htm
- ✦ WIKIMEDIA COMMONS. (08 de April de 2011). *WIKIMEDIA COMMONS*. Recuperado el 11 de Junio de 2013, de WIKIMEDIA COMMONS: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Pseudomonas_fluorescens_on_TY_agar_\(UV_light\).JPG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Pseudomonas_fluorescens_on_TY_agar_(UV_light).JPG)
- ✦ ZoBell, C., & Feltham, C. (August de 1934). A Comparison of Lead, Bismuth, and Iron as Detectors of Hydrogen Sulphide Produced by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 28(2), 169-176.