



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**

**Libro electrónico sobre la identificación de microorganismos de la familia
Enterobacteriaceae mediante el uso de medios cromogénicos**

TESIS

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Burgos García Irvin

DIRECTOR DE TESIS

Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Ciudad de México 2017



**F E S
ZARAGOZA**

Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIME, PE202716

MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A dios por darme la oportunidad de terminar este largo camino y permitirme alcanzar una meta más en mi vida.

A la máxima casa de estudios UNAM y a mi amada FES Zaragoza.

Al Dr. Luis Mora y la Mtra. Yolanda por su apoyo y enseñanzas durante la elaboración de esta tesis gracias por la oportunidad brindada.

Al Dr. Rubén Marroquín y el Mtro. Armando por sus enseñanzas y alegrías compartidas en el laboratorio.

A mis sinodales Mtro. Gabriel Alejandro, Q.F.B Carina Gutiérrez, Q.F.B Patricia Vidal muchas gracias por su contribución y aportes en este trabajo.

A los profesores Sandra Ortega y Enrique Escalera, mi gratitud y cariño por su infinita paciencia, apoyo, dedicación y compromiso en la docencia.

A mi madre por su gran amor, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien y por haberme traído hasta aquí y confiar en mí, no hay palabras en este mundo para agradecerte mamá.... Gracias por todo.

A mi hermana Karina por sus palabras de apoyo en todo momento por preocuparte por mí y ser como mi segunda mamá te agradezco todo lo que me enseñas día a día te quiero mucho Karisauria.

A mi papá por su apoyo y aliento aun en la distancia gracias por todo.... Te quiero.

A todos mis compañeros que conocí: Alejandro, Yisus, Barbon, Eber, Gaby, Edy, Mitzi, miembros del laboratorio no.1 y más... Gracias por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca voy a olvidar pero en especial a mí amigo Erik García te agradezco por tu amistad y enseñanzas compartidas en tan poco tiempo.

A Elena por tu apoyo y cariño todo este tiempo, por el ánimo que me brindas día a día para alcanzar mis metas y sueños...Gracias por todo.

No hay nada en la vida que no contenga sus lecciones. Si estás vivo, siempre tendrás algo para aprender.

ÍNDICE

ÍNDICE	4
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	2
APRENDIZAJE	2
ESTRATEGIAS DE APRENDIZAJE.....	2
EL APRENDIZAJE CON EL USO DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS	2
LIBRO ELECTRÓNICO	3
CARACTERÍSTICAS DE UN LIBRO ELECTRÓNICO	4
FORMATOS DE UN LIBRO ELECTRÓNICO	4
VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE UN LIBRO ELECTRÓNICO	5
MICROBIOLOGIA.....	6
BACTERIAS	7
FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.....	7
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	8
ESTRUCTURA.....	10
PROPIEDADES METABÓLICAS.....	11
Género <i>Escherichia</i>	12
<i>Escherichia coli</i>	12
Género <i>Klebsiella</i>	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
Género <i>Proteus</i>	14
<i>Proteus vulgaris</i>	14
Género <i>Salmonella</i>	15
<i>Salmonella enteritidis</i>	15
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.....	16
MÉTODOS FENOTÍPICOS.....	16
SISTEMAS COMERCIALES AUTOMATIZADOS	16
MEDIOS CROMOGÉNICOS	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
MÉTODO	22

RESULTADOS	25
ANÁLISIS DE RESULTADOS	26
CONCLUSIÓN	28
RECOMENDACIONES	29
REFERENCIAS	30

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen numerosos esquemas para la identificación de bacterias como son métodos fenotípicos, moleculares, manuales, automatizados, métodos proteómicos etc. En los últimos años surge una nueva herramienta para la identificación bacteriana los medios de cultivo cromogénicos los cuales permiten una identificación rápida, eliminación de un subcultivo y la elaboración de numerosas pruebas bioquímicas economizando así tiempo y dinero.

Existen libros electrónicos que ayudan a la identificación de *Enterobacterias* los cuales incluyen pruebas bioquímicas y medios de cultivo selectivo y diferencial pero ninguno de ellos incluye los medios cromogénicos.

El presente trabajo se ha orientado a la identificación bacteriana mediante el uso de medios cromogénicos de algunos de los microorganismos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, específicamente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Proteus vulgaris*. Este libro electrónico servirá como apoyo didáctico para el aprendizaje de la asignatura de Microbiología General I.

Para la elaboración del presente trabajo se realizó la identificación y aislamiento de los microorganismos en estudio utilizando medios de cultivo selectivos y diferenciales así como medios cromogénicos además de pruebas bioquímicas para su identificación. El libro electrónico presenta un formato atractivo ya que cuenta con imágenes y fotos referentes al tema en cuestión.

MARCO TEÓRICO

APRENDIZAJE

El aprendizaje es un proceso constructivo en donde todas las habilidades y conocimientos que ha adquirido una persona son utilizadas para construir ideas y nuevos significados al interactuar con el medio ambiente que lo rodea ¹.

ESTRATEGIAS DE APRENDIZAJE

Las estrategias de aprendizaje se definen como los procesos de toma de decisiones (conscientes e intencionales) en los que el alumno elige y recupera de manera coordinada, los conocimientos que necesita para complementar una determinada demanda u objetivo, dependiendo de las características de la situación educativa en que se produce la acción.

Consecuentemente un estudiante emplea una estrategia cuando este es capaz de ajustar su comportamiento a las exigencias de una actividad o tarea, encomendada por el profesor y a las circunstancias en que se produce esa demanda ².

EL APRENDIZAJE CON EL USO DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS

Hoy día existen nuevas tecnologías educativas disponibles, como lo son los elementos multimedia, la televisión, los CD-ROM, programas interactivos, el acceso a la red. Este último es lo que ha convertido a la computadora y dispositivos electrónicos en un instrumento pedagógico relevante; sin embargo la

pedagogía insiste, que para hacer uso de cualquier tecnología educativa se tenga un método y enfoque claro que garanticen un aprovechamiento óptimo por parte del estudiante.

Las estrategias de aprendizaje pueden ser ampliadas, enriquecidas o sustituidas por los siguientes medios virtuales:

- Materiales didácticos, como interactivos, tutoriales, sitios web o libros electrónicos.
- Contexto natural, enriquecido a través de los sistemas de realidad virtual, simuladores o videos entre otros. Este recurso tiene la ventaja de poder realizar observaciones o pruebas ilimitadas a diferencia de la modalidad presencial en la cual las posibilidades son más reducidas.
- Comunicación e interacción mediada por computadora, a través del correo electrónico, videoconferencias, enlaces asincrónicos, grupos de discusión, entre otros ³.

LIBRO ELECTRÓNICO

Un libro electrónico, también conocido como e-book, eReader o libro digital, es una versión electrónica o digital de un libro tradicional que puede visualizarse en cualquier dispositivo digital: ordenadores, teléfonos móviles, lectores de libros electrónicos, Ipad, tablets ⁴.

CARACTERÍSTICAS DE UN LIBRO ELECTRÓNICO

Los libros electrónicos tienen herramientas para facilitar la lectura. Éstas permiten buscar palabras, resaltar partes, hacer comentarios, encontrar significados en el diccionario y otras funciones. En los libros digitales muchas veces se articulan al texto elementos de multimedia, como el audio y el video. A través de internet un texto puede tener vínculos a otros libros disponibles en la red ⁴.

FORMATOS DE UN LIBRO ELECTRÓNICO

ePub: Es un formato libre basado en el estándar *XML* desarrollado por el *IDPF* (International Digital Publishing Forum). Los libros con este formato pueden ser leídos por diferentes lectores, a diferencia de los libros bloqueados con *DRM*.

PDF: *Adobe Portable Document*. Es el formato más utilizado ya que es muy fácil generar y ver documentos en la computadora o dispositivo electrónico. Entre sus ventajas se puede citar su portabilidad y su estandarización *ISO*. Entre sus desventajas se puede citar que no es re paginable como *epub* y que la mayoría de documentos *PDF* están en algún formato definido para ser imprimidos o visualizados en pantallas de computadora lo cual impide que se puedan adaptar correctamente a la pantalla del lector de libros electrónicos.

DJVU: *DjVu* es un formato libre que destaca en el almacenamiento de imágenes escaneadas. Incluye compresores avanzado optimizado para imágenes de color y documentos de texto.

azw: Es el formato creado para dar soporte al lector de libros electrónicos comercializado por *Amazon (Kindle)* . Está basado en *Mobipocket*. Tiene su

propio formato *DRM*. *Amazon* es la tienda de libros electrónicos más grande del mundo, es una pena que su catálogo en español sea muy pequeño, casi no hay libros en español porque las editoriales no quieren comercializarlos.

fb2: *FictionBook* es un formato *XML* para el almacenamiento de libros donde cada elemento del libro es descrito por etiquetas. El objetivo principal para el almacenamiento de libros en el formato *FictionBook* es su precisión de mantenimiento de la estructura del libro.

Doc y **docx:** Formato de *Microsoft Word*, que es procesador de textos más utilizado en el mundo y por lo tanto, el formato en el que se genera la mayoría de la documentación.

html: Formato de las páginas web. Existen multitud de otros formatos que son menos conocidos y menos utilizados ⁴.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE UN LIBRO ELECTRÓNICO

Ventajas

- Los libros electrónicos no ocupan mucho espacio físico.
- No existe impresión lo que permite disponer de libros sobre temas de actualidad con mayor rapidez, y también son fácilmente actualizables, para corregir errores y añadir información.
- Los e-books no tienen ediciones agotadas. Con las ediciones electrónicas el libro siempre estará disponible globalmente.
- Son amigables con el medio ambiente, evitan la tala de árboles.
- Se pueden llevar múltiples libros en un mismo dispositivo ⁴.

Desventajas

- Los Lectores de libros electrónicos necesitan de una computadora o dispositivo y también de una conexión a Internet para comprar los libros electrónicos.
- No todos los libros se han digitalizado, ediciones antiguas o libros que ya se han descatalogado no podrás leerlos en tu computadora o dispositivo.
- Se pierde parte del ritual tradicional de la presentación personal de un libro.

MICROBIOLOGIA

La microbiología es una rama de la biología que estudia seres vivientes de tamaño microscópico que existen como células aisladas o asociadas y también incluye el estudio de virus (microscópicos no celulares). En general, los microorganismos a diferencia de los macro organismos, son capaces de llevar a cabo procesos de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células sean del mismo tipo o diferentes. Las células estudiadas en microbiología pueden pertenecer a dos grandes grupos, eucariotas y procariotas. Las eucariotas constituyen la unidad estructural de protozoarios, hongos y algas cuyo tamaño las incluye en esta especialidad. Son organismos unicelulares o multicelulares que poseen en su interior estructuras limitadas por membranas llamadas organelas (núcleo, mitocondrias y cloroplastos presentes sólo en células capaces de realizar fotosíntesis). Las células procariotas son las bacterias, cuya estructura interna es sencilla, etimológicamente el término procariota significa ausencia de membrana nuclear ⁵.

BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos procariotas (microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico) que se reproducen por división asexual. Las bacterias están recubiertas por una pared celular la cual es el compartimiento celular que media todas las relaciones de la célula con el entorno, protege los contenidos de la célula y da rigidez a la estructura celular. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: pared celular Gram positiva con una gruesa capa de péptidoglucano y una pared Gram negativa con una delgada capa de péptidoglucano, así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de pared celular y suplen su ausencia sobreviviendo en el interior de células del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico. Las bacterias son los más simples y abundantes de los organismos y pueden vivir en tierra, agua, materia orgánica o en plantas y animales. Tienen una gran importancia en la naturaleza, ya que están presentes en los ciclos naturales del nitrógeno, del carbono, del fósforo, etc. y pueden transformar sustancias orgánicas en inorgánicas y viceversa⁵.

FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, que fermentan la glucosa en anaerobiosis; citocromo oxidasa negativos; reducen los nitratos a nitritos. Son llamadas enterobacterias

porque con frecuencia se encuentran en el aparato digestivo de animales y humanos pero algunas especies también viven en la tierra y en el agua ⁶.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Una de las clasificaciones taxonómicas de las *Enterobacterias* fue propuesta por Erwing, quien las agrupo mediante tribus, esta clasificación tiene ciertas ventajas para la enseñanza y el aprendizaje de los alumnos que son nuevos en el campo de la microbiología. Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de *Enterobacterias* por tribus ⁷

TRIBU	GÉNERO	ESPECIE
I. Escherichieae	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i>	<i>E.coli</i> , <i>E.blattae</i> , <i>E.alberti</i> , <i>E.fergusonii</i> , <i>E.hermanii</i> , <i>E.vulneris</i> . <i>S.flexnerii</i> , <i>S.boydii</i> , <i>S.sonnei</i> , <i>S.dysenteriae</i> .
II. Edwardsielleae	<i>Edwardsiella</i>	<i>E.tarda</i> , <i>E.hoshinae</i> , <i>E.ictaluri</i> .
III. Salmonelleae	<i>Salmonella</i>	<i>S.typhi</i> , <i>S.enteritidis</i> .
IV. Citrobactereae	<i>Citrobacter</i>	<i>C.amalonaticus</i> , <i>C.braaki</i> , <i>C.farmer</i> , <i>C.freundii</i> , <i>C.gilleni</i> , <i>C.koseri</i> , <i>C.murlinae</i> , <i>C.rodentium</i> , <i>C.sedlakii</i> , <i>C.werkmanii</i> , <i>C.youngae</i> .
V. Klebsielleae	<i>Klebsiella</i> <i>Radoultella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Hafnia</i> <i>Serratia</i>	<i>K.granulomatis</i> , <i>K.oxycota</i> , <i>K.pneumoniae</i> . <i>R.ornithinolytica</i> , <i>R.planticola</i> , <i>R.terrigena</i> . <i>E.aerogenes</i> , <i>E.amnigenus</i> <i>E.dissolvens</i> , <i>E.gergoviae</i> , <i>E.cloacace</i> , <i>E.cowanii</i> , <i>E.kobel</i> <i>H.alvei</i> . <i>S.entomophila</i> , <i>S.ficaria</i> , <i>S.grimesii</i> , <i>S.marcescens</i> , <i>S.rubidaea</i> , <i>S.proteamaculans</i> .
VI. Proteeae	<i>Proteus</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i>	<i>P.hauseri</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>P.myxofaciens</i> , <i>P.penneri</i> , <i>P.vulgaris</i> . <i>M.morganii</i> <i>P.alcalifaciens</i> , <i>P.heimbachae</i> , <i>P.stuartii</i> , <i>P.rettgeri</i> .
VII. Yersinieae	<i>Yersinia</i>	<i>Y.aldovae</i> , <i>Y.bercovieri</i> , <i>Y.enterocolitica</i> , <i>Y.intermedia</i> , <i>Y.kristensenii</i> , <i>Y.pestis</i> , <i>Y.pseudotuberculosis</i> , <i>Y.rohdej</i> , <i>Y.ruckeri</i> .
VII. Erwiniaeeae	<i>Erwinia</i>	<i>E.amylovora</i> , <i>E.caratovira</i> , <i>E.americana</i> .

ESTRUCTURA

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma alargada (bastoncillo) , por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro. Como en otras bacterias Gram negativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. Presentan una membrana interna (o citoplasmática) que consiste en una doble capa de fosfolípidos la cual regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas la capa siguiente, o capa externa, consiste en un péptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al péptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas. Entre estas proteínas se encuentran las de los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición. El lípido A, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce. El oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como

antígeno O. Este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos. Junto con otros factores, la presencia del antígeno O media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal, siendo capaces por tanto de sobrevivir más tiempo en sangre y causando infecciones hematógenas, diseminadas y más graves ⁶.

En la figura 1 se esquematiza la estructura del género *Enterobacteriaceae*.

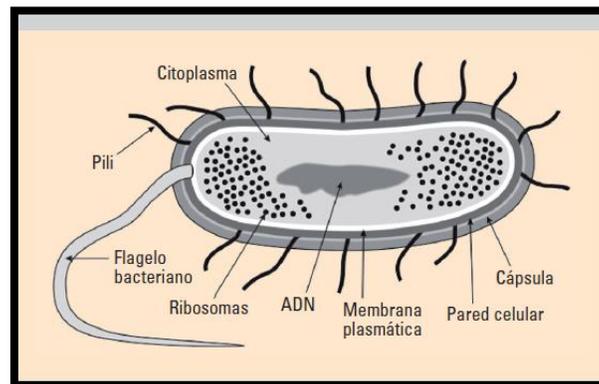


Figura 1. Estructura del género *Enterobacteriaceae* ⁶.

PROPIEDADES METABÓLICAS

Las propiedades metabólicas de la familia *Enterobacteriaceae* son muy útiles en la caracterización de sus géneros. Los miembros de esta familia, a menudo denominados enterobacterias o bacterias entéricas, degradan azúcares mediante la vía Embed-Meyerhof y escinden el ácido pirúvico para producir ácido fórmico. La familia *Enterobacteriaceae* se divide en dos grupos en función de sus productos de fermentación la mayoría (p.ej., los géneros *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*) llevan a cabo una fermentación ácido mixta y producen principalmente lactato, acetato, succinato, formato y etanol. A diferencia de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Erwinia* son fermentadores de butanodiol en

este tipo de fermentaciones los productos principales son butanodiol, etanol y dióxido de carbono. Los dos tipos de fermentación se distinguen por las pruebas rojo de metilo y Voges- Proskauer ⁸.

Género *Escherichia*

Este género lo constituyen bacilos cortos Gram negativos ⁹, y se diferencian de otros miembros de enterobacterias por su rápida fermentación de lactosa. Sin embargo existen algunas cepas que no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente. Se presentan tanto formas móviles como inmóviles ¹⁰.

Escherichia coli

E.coli es un anaerobio facultativo y forma parte de la flora intestinal normal de los animales y humanos, fermenta la lactosa y produce rápidamente ácido y gas a partir de este azúcar. *E.coli* crece muy bien en medios de gran simplicidad (EMB, Mac Conkey, Agar Nutritivo); forma un brillo verdoso sobre el agar de eosina y azul de metileno; tiene actividad descarboxilasa de lisina; utiliza el acetato como única fuente de carbono e hidroliza el triptófano para formar indol ¹¹.

La estructura antigénica de *E.coli* es compleja. Existen cuatro antígenos: el antígeno H (flagelar), el antígeno K (capsular), el antígeno O (somático) y el antígeno F (fimbrias/pili); de los que existen 75, 102, 167 y 12 variantes, respectivamente ¹².

Es la especie bacteriana con mayor prevalencia en los aislamientos clínicos y es responsable de diversas enfermedades infecciosas causante de sepsis y shock

Inducido por endotoxinas, también provoca infección en vías urinarias, neumonía en pacientes inmunosuprimidos y meningitis en recién nacidos ¹³.

Género *Klebsiella*

Descubierta por el microbiólogo Edwin Klebs a finales del siglo XIX el género *Klebsiella* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* ¹⁴, los miembros del género *Klebsiella* son bastoncillos Gram negativos cortos, inmóviles, encapsulados ¹⁰.

Son bacterias inmóviles y en forma de varilla, son bacterias encapsuladas la cápsula que cubre una célula de *Klebsiella* le ayuda a ser resistente a muchos antibióticos. Estas bacterias tienen dos tipos de antígenos en la superficie de la célula estos antígenos incluyen el lipopolisacárido (antígeno O) y el polisacárido capsular (antígeno K). Hay alrededor de 9 antígenos O y 77 antígenos K presentes de una célula de *Klebsiella* ¹⁰.

El género *Klebsiella* presenta dos especies patógenas *klebsiella pneumoniae* y *klebsiella oxytoca*. Los miembros de del género *Klebsiella* son microorganismos entéricos, células aisladas que fermentan la lactosa, descarboxilan la lisina pero no la ornitina ¹⁵.

Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae es inmóvil, indol negativo, MR positivo, VP negativo, crece en medio de citrato pero no en medio de KCN, no produce sulfuro de hidrógeno, pero da positiva la prueba de la lisina descarboxilasa ⁹. En agar Mac Conkey fermenta la lactosa y forma colonias mucoides, mientras que en agar XLD se observan colonias amarillas ¹⁶. *Klebsiella pneumoniae* es notable por qué forma colonias mucoides de gran tamaño, húmedas debido a la presencia de material capsular ¹⁵.

Género *Proteus*

Este género está difundido en el suelo, agua, aguas servidas, materiales de animales en descomposición, tracto intestinal del hombre, etc. El género *Proteus* está incluido en la tribu *Proteeae*, junto con los géneros *Providencia* y *Morganella*, y sus miembros se describen como bacilos Gram negativos, móviles con flagelos peritricos, aerobios y anaerobios facultativos ¹⁷, es un género de bacterias que incluye patógenos responsables de muchas infecciones del tracto urinario ¹⁸. Este género está formado por las especies *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* y *Proteus myxofaciens* ¹⁹.

Los organismos del género *Proteus* crecen en medios de cultivo simples, donde sus colonias tienden a extenderse o diseminarse por la superficie (swarming) ¹⁸.

Proteus vulgaris

Proteus vulgaris es una bacteria Gram negativa en forma de varilla el tamaño de las células individuales varía de 0.4-0.6 μm por 1.2 -2.5 μm . *P.vulgaris* posee

flagelos peritricos los cuales ocasionan que “hormiguee” sobre la superficie solida de un medio de cultivo, por lo que es activamente móvil. Habita en el suelo, el agua contaminada, carne cruda, tracto gastrointestinal de los animales, y el polvo

17.

Género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos móviles que no fermentan la lactosa, aunque la mayoría producen sulfuro de hidrógeno o gas por fermentación de los hidratos de carbono. Inicialmente, se agruparon en más de 2000 especies (serotipos) en función de sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (esquema de Kauffman-White). El género *Salmonella* se conforma de dos especies: *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*

20.

Salmonella enteritidis

Salmonella enteritidis, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Bacilo Gram negativo, no esporulado en el medio de cultivo *Salmonella-Shigella* produce colonias con centro negro debido a la formación de ácido sulfhídrico Este agente es ampliamente reconocido como causa de brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), especialmente a través de alimentos de origen aviar. *Salmonella enteritidis*, es un patógeno entérico que provoca un cuadro de enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal ²¹.

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Existen diversos métodos de tipificación bacteriana con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y conocer las implicaciones patológicas, patogénicas, la evolución clínica y así poder aplicar una terapia antimicrobiana eficaz ²².

MÉTODOS FENOTÍPICOS

La identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costos son accesibles. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica se basan en las características “observables” de las bacterias; como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas ²³.

SISTEMAS COMERCIALES AUTOMATIZADOS

Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inocula individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trio de pruebas queda reducido a un dígito). Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado ²⁴.

Ante un microorganismo problema, se busca el código numérico y se comprueba a que bacteria pertenece. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el

mercado son: API (bioMerieux), Enterotube, Oxi/Fer, Tube (BD), Rap ID systems y Micro ID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen) etc ²⁴.



Imagen 1.- Sistema de identificación automatizado API

Existen en el mercado galerías multipuebas como las descritas anteriormente pero cuya inoculación, incubación, y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos objeto de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos. Los obtenidos en un ordenador, el cual proporciona; con un alto índice de fiabilidad, la identificación del microorganismo. Algunos de los sistemas de paneles comerciales disponibles de uso más extendido son: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Winder, Phoenix, etc ¹¹.

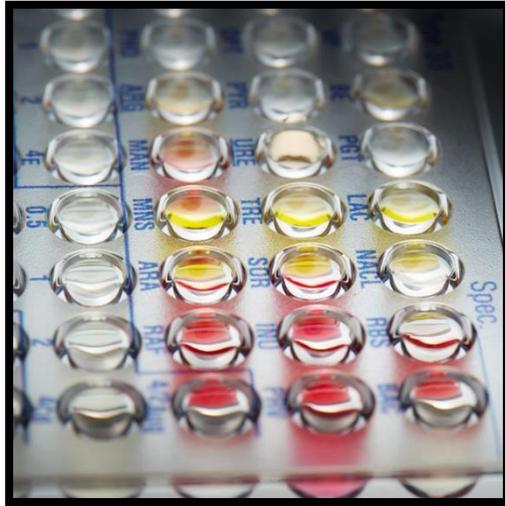


Imagen 2.- Microscan panel para identificación de microorganismos

MEDIOS CROMOGENICOS

Los medios cromogénicos son medios de cultivo en los cuales se han incluido directamente substratos cromogénicos que permiten detectar actividades enzimáticas. Esto a su vez permite reagrupar el aislamiento y la identificación inmediata de los principales microorganismos relacionados en la patología humana ²⁵.

Estos medios se fundamentan en el uso de un sustrato cromogénico específico de la enzima del microorganismo que se investiga. Esta enzima al actuar sobre estos sustratos genera en ellos un cambio en su estructura, que queda evidenciada por la formación de colonias coloreadas ²⁶.

Con base en lo anterior se han desarrollado diferentes tipos de medios cromogénicos:

a) Medios cromogénicos de orientación: permiten la identificación de múltiples microorganismos en un mismo medio.

b) Medios cromogénicos selectivos: permiten la identificación de un determinado grupo de microorganismos, inhibiendo el crecimiento de otros. En algunos casos la identificación presuntiva puede llegar hasta género o especie.

c) Medios cromogénicos para la detección de mecanismos de resistencia: además de permitir la identificación presuntiva, también son útiles para el screening de mecanismos de resistencia por ejemplo en el caso de los bacilos Gram negativos (enterobacterias) permiten detectar betalactamasas de espectro extendido.

Actualmente estos medios se emplean en diferentes áreas, desde la clínica y epidemiológica hasta la industria alimenticia, donde ofrecen como ventajas eliminar la necesidad del subcultivo y la elaboración de numerosas pruebas bioquímicas economizando tiempo y dinero. Entre las desventajas que pueden presentar se encuentran la actividad enzimática de los microorganismos y la interpretación de los colores por parte del operador. Sin embargo con respecto a esto último se han desarrollado equipos que facilitan la lectura de las placas ²⁷.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mundo existen gran cantidad de bacterias que participan en distintos procesos infecciosos, es por eso que en los laboratorios microbiológicos se realizan cultivos y diferentes métodos para identificar microorganismos utilizando pruebas bioquímicas con el fin de facilitar la aplicación de los conceptos básicos y así llegar a un diagnóstico.

Existen diversos manuales y libros que contienen información acerca de los medios de cultivos y pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos, pero ninguno de estos incluye el empleo de medios cromogénicos como son ChromID ESBL ChromID CPS y ChromID *Salmonella* elite.



Imagen 3.- Medio cromogénico ESBL para la identificación de *Enterobacterias*

Por tal motivo se realizó un Libro Electrónico de Identificación de *Enterobacterias* el cual incluye imágenes propias tomadas en el laboratorio No. 1 de la planta Alta-UMIEZ además de contener las características microbiológicas y bioquímicas de estas, así como pruebas para su identificación entre las cuales está el uso de medios cromogénicos, el cual es un recurso didáctico para los alumnos del área de microbiología que complementara el acervo bibliográfico a su disposición, otorga información actual y útil sobre el uso de medios cromogénicos dando un primer acercamiento a estos para sus aplicaciones posteriores en:

- Bacteriología clínica
- Microbiología industrial control de calidad para la industria
- Pruebas de agua

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un libro electrónico sobre la identificación de algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* mediante el uso de medios cromogénicos con fotografías tomadas durante el aislamiento en estos medios.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

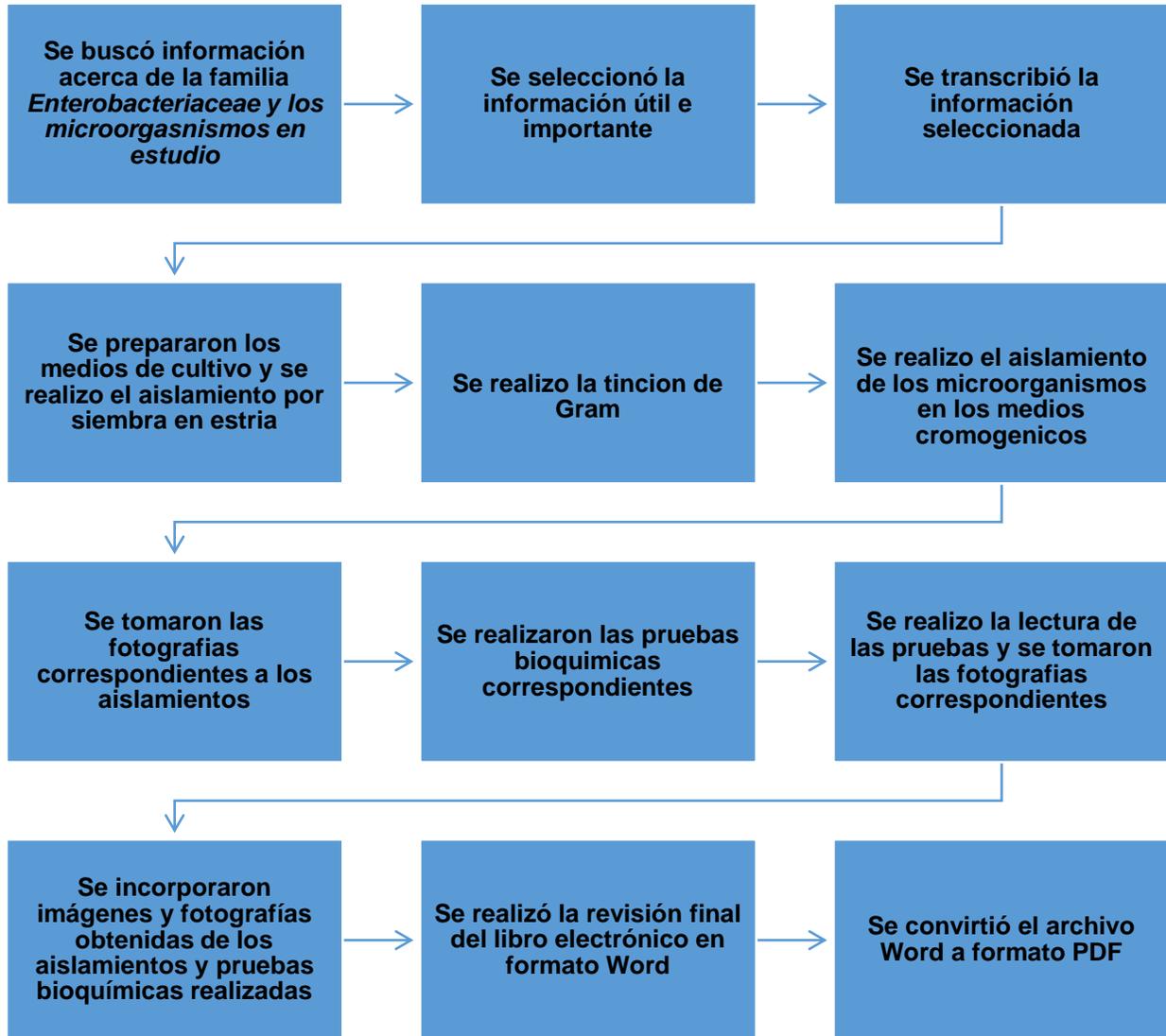
- Búsqueda y recopilación de información relevante y útil acerca de los microorganismos de interés.
- Conjuntar la información de manera adecuada y lógica para la elaboración del libro electrónico.
- Realizar el aislamiento de las *Enterobacterias* como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Proteus vulgaris* en medios de cultivo selectivo, diferencial y cromogénicos, y realizar la toma de fotografías.
- Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas utilizadas mediante pruebas bioquímicas.
- Digitalizar el libro electrónico.

MÉTODO

1. Se buscó información acerca de la familia *Enterobacteriaceae* y en específico sobre los microorganismos: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, en libros, revistas, publicaciones.
2. Se seleccionó la información útil e importante de los microorganismos en estudio.
3. Se transcribió la información seleccionada en Word.
4. Se prepararon los medios de cultivo necesarios para el aislamiento de las cepas: Agar EMB, Agar Verde Brillante, Agar Mac Conkey, se realizó la siembra en estría cruzada.
5. Se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas, se tomaron las fotografías correspondientes y posteriormente se tomó una placa para realizar la tinción de Gram.
6. Se realizó la siembra por estría cruzada en los medios cromogénicos seleccionados para las *Enterobacterias Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella enteritidis*.
7. Se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas y posteriormente se tomaron las fotografías correspondientes.
8. Se prepararon las pruebas bioquímicas para la identificación: Citrato de Simmons, KIA, TSI, LIA, SIM Rojo de Metilo y Voges Proskauer.
9. Se incubaron las pruebas bioquímicas de 18 a 24 horas y se realizó la lectura de estas.

10. Se tomaron las fotografías correspondientes a las pruebas bioquímicas realizadas.
11. Se incorporaron imágenes y fotografías obtenidas de los aislamientos y pruebas bioquímicas realizadas.
12. Se realizó la revisión final del libro electrónico en formato Word.
13. Se convirtió el archivo Word a formato PDF.
14. Se digitalizó el libro.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Se realizó el libro electrónico sobre la identificación de algunos microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* mediante el uso de medios cromogénicos el cual se encuentra en formato PDF y consta de los siguientes apartados

- Bacterias
- Generalidades familia *Enterobacteriaceae*
- Métodos de identificación Bacteriana
- Aislamiento e identificación de Enterobacterias (Género *Escherichia*, Género *Salmonella*, Género *Klebsiella*, Género *Proteus*)
- Anexo de medios de cultivo y pruebas bioquímicas
- Referencias

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El aislamiento de las *Enterobacterias* se realizó mediante la siembra por estría cruzada en medios de cultivo convencionales y cromogénicos obteniendo colonias aisladas de cada microorganismo. Para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Proteus vulgaris* se realizó una siembra en los medios de cultivo EMB, Verde Brillante y Mac Conkey. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Proteus vulgaris* mostraron colonias con características similares en cuanto a color, aunque estos medios son selectivos no permiten una adecuada identificación por lo que esta debe ser confirmada con pruebas bioquímicas, en cambio los medios cromogénicos ESBL y CPS permiten una identificación de microorganismos por una detección de enzimas producidas, estas enzimas reaccionan con un sustrato específico que origina un cambio de color en el medio, por ejemplo *K. pneumoniae* se observaron como colonias verdes (fotografías 18 y 19 del libro electrónico) a diferencia de *E.coli* que en los mismos medios se observaron colonias color marrón en medio ESBL y café en CPS como se muestra en las fotografías 45 y 46 del libro electrónico. Aunque la literatura marca que tanto el medio ESBL y CPS se pueden utilizar para identificar *Enterobacterias* los resultados sugieren que el empleo del medio ESBL permite una mejor identificación de estas *enterobacterias* ya que la identificación de los microorganismos es más clara por el contraste de colores.

Salmonella enteritidis es un patógeno entérico que provoca un cuadro de enterocolitis a causa de alimentos infectados con esta por lo cual su identificación debe ser rápida y exacta. En los medios EMB y MacConkey *S.enteritidis* muestra

colonias transparentes y de forma similar mientras que en el medio *Salmonella-Shigella* se observaron colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro. El medio cromogénico *Salmonella elite* es un medio que se utiliza para la rápida identificación de *S. enteritidis* en el cual se producen colonias color morado características de esta obteniendo una identificación rápida como se pudo comprobar experimentalmente después de 18 horas de incubación (figura 32 del libro electrónico). Para corroborar que los medios cromogénicos identifican a los microorganismos antes mencionados se realizaron pruebas bioquímicas para contrastar los resultados obtenidos en los medios de cultivo. En cuanto a la elaboración del manual se llevó a cabo con la información necesaria y específica para así brindar un recurso electrónico confiable y útil. Las imágenes incorporadas al manual son atractivas y de fácil entendimiento, estas fueron tomadas de blogs, libros y páginas de internet. Las fotografías de los cultivos y las tinciones fueron tomadas durante el aislamiento e identificación de las cepas, el trabajo fue realizado en el laboratorio no. 1 de la planta alta de la UMIEZ.

Dando como resultado el “Libro electrónico sobre la identificación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* mediante el uso de medios cromogénicos”

CONCLUSIÓN

Se logró elaborar satisfactoriamente el libro electrónico sobre la identificación de algunos microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* mediante el uso de medios cromogénicos, el cual contiene información útil y específica sobre el uso de los medios cromogénicos ChromID ESBL, ChromID CPS, ChromID *Salmonella* elite para la identificación de *K.pneumoniae*, *S.enteritidis*, *E.coli* y *P.vulgaris*.

Este trabajo pretende enriquecer el material didáctico con el cual cuenta la carrera de Química Farmacéutica Biológica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, así como proporcionar al alumno información sobre el uso de los medios cromogénicos para la identificación de *Enterobacterias*.

RECOMENDACIONES

- Poner a prueba el manual con los alumnos que cursan alguna de las asignaturas del área de Microbiología.
- Incorporar el manual a algún portal donde los alumnos puedan tener acceso a este material electrónico y así poder consultar la información cuando así lo requieran.

REFERENCIAS

- 1.- Covarrubias PP. Representaciones de estudiantes universitarios sobre el aprendizaje significativo y las condiciones que lo favorecen. Perfiles educativos 2007; 29 (115): 49-71.
- 2.- Monereo C. Estrategias de enseñanza y aprendizaje. Disponible en: <http://www.terras.edu.ar/jornadas/119/biblio79Las-estrategias-de-aprendizaje.pdf>. [Acceso: Octubre 08, 2016].
- 3.- Coaching tecnológico Ventajas y desventajas de un libro electrónico [homepage on the internet]. c2013 [actualizado 2013 Abr 22; citado 2016 Oct 1]. Disponible en: <http://www.coaching-tecnologico.com/ventajas-y-desventajas-del-libro-electronico-o-ebook/>
- 4.- Navarro AE Tesis Profesional. Elaboración de un manual de lecto-escritura. Universidad de las Américas de Puebla. Mayo 17, 2004.
- 5.- Observatorio tecnológico Libros electrónicos (ebooks) [homepage on the internet]. c2011 [actualizado 2011 Ene 19; citado 2016 Oct 10]. Disponible en: <http://recursostic.educacion.es/observatorio/web/eu/equipamiento-tecnologico/hardware/954-libros-electronicos-ebooks->
- 6.- Murray P, Rosenthal S, Pfaller M. Microbiología Médica. 6ª ed. España: Elsevier; 2009.
- 7.- Puerta F, Mateos R. Enterobacterias Unidad de Enfermedades Infecciosas. 2ª ed. España: Editorial Albacete., 2009.

- 8.- García A, Rodríguez F. Enterobacterias [Monografía en internet]. Albacete; España: Medicine; 2010 [accesado 20 de septiembre 2015]. Disponible en; www.facmed.unam.mx
- 9.- Willey M, Sherwood M, Woolverton J, Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª ed. España: Editorial Mc Graw Hill., 2009.
- 10.- Serrano S, Marfil R, Jodral M. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio porcino; fundamentos de seguridad alimentaria. Editorial Díaz de Santos. España; 2009.
- 11.- Finegold S., Martin W. Diagnostico Microbiologico. 6ª Ed. Buenos aires: Editorial medica panamericana;1983.
- 12.- Kenneth R. Microbiología Médica.Vol 1. 5ª edición. Mexico: Mc Graw Hill; 2010.
- 13.- Collins H, Lyne M. Metodos microbiológicos. 5ª Ed. España:Editorial Acribia;1989.
- 14.- Espinal P. Mantilla J. Saavedra C. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido. Biomédica. Vol.24 No.23; 2004.
- 15.- García P. Fernández M. Paredes F. Microbiología Clínica Aplicada. 3ª ed. Editorial Díaz de Santos. México: 1998.
- 16.- Walker S. Microbiologia.1ª Ed.Mexico:Editorial McGraw Hill;2000.
- 17.- Bailey & Scott. Diagnostico microbiológico. 12ª Ed.Buenos aires:Editorial medica panamericana;2009.

- 18.- Cantón R. *Proteus penneri*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(1):8-13
- 19.- EcuRed. Conocimiento con todos y para todos: Proteus(bacteria) [homepage on the internet]. c1999 [actualizado 1999 Ene 20; citado 2016 Sep 7]. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Proteus_\(bacteria\)](https://www.ecured.cu/Proteus_(bacteria))
- 20.- Romero R. *Microbiología y parasitología humana*. 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- 21.- Salmonella descripción general Genero salmonella [homepage on the internet]. c2002 [actualizado 2002 Julio 1; citado 2016 Sep 8]. Disponible en: http://www.bvsde.paho.org/cdgdwq/docs_microbiologicos/bacterias%20pdf/salmonella.pdf
- 22.- Instituto de salud pública Ministerio de salud [homepage on the Internet]. c2011 [actualizado 2011 Agos 30; Citado 2016 Ago 28]. Disponible en: <http://www.ispch.cl/content/15049>
- 23.- Merino A. Losch S. Familia Enterobacteriaceae. Universidad Nacional del Nordeste- Facultad de medicina.PDF. 20/09/15.
- 24.- Flores S., Perez L., Marjorie K. Infección urinaria intrahospitalaria en los servicios de hospitalización de Medicina de un Hospital General. *Revista Médica Herediana*. Vol.19 No.2; 2008.
- 25.- García M, Cárdenas M, Urbano A. *Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias*. Vol1. 1ª edición.España: Omniascience;2012.

26.- Biomerieux. Medios cromogenicos chromID [homepage on the internet]. No date [citado 9 Sep 2016]. Disponible en: http://www.biomerieux.com.co/servlet/srt/bio/colombia/dynPage?open=CLM_CLN_PRD&doc=CLM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_41&pubparams.sform=1&lang=es_co

27.- Gotas microbiológicas. Medios cromogénicos [homepage on the internet].c 2011 [actualizado 2011 Feb 7; citado 2011 Mar 9]. Disponible en: <http://gotasmicrobiologicas.blogspot.mx/2011/02/medios-cromogenicos.html>

Referencias de Imágenes

Imagen 1.- Sistema de identificación automatizada API https://www.google.com.mx/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=0ahUKEwj5-ZGxiPTRAhUk_4MKHbtpC0MQjhwIBQ&url=http%3A%2F%2Fwww.biomerieux.com.mx%2Fmicrobiologia-industrial%2Fapirid32-1&psig=AFQjCNE1k-Qpkf79_2GFXSSoQK31po4Ow&ust=1486215988360249

Imagen 2.- Microscan panel para la identificación de microorganismos https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal;jsessionid=0pJgYJLHD57BpztG5l4F7PXnkQGKvXLmpg8cRGx4QGLFG2PnZvnp!-322512587!577010297?nfpb=true&windowLabel=UCM_RENDERER&urlType=render&wlpUCM_RENDERER_path=%2Fwsr%2Fcountry-selector%2Findex.htm&WRpath=%252Fwsr%252Fdiagnostics%252Fclinical-products%252Fmicrobiology%252Fmicroscan-panels%252Fconventional-panels%252Findex.htm&intBp=true

Imagen 3.- Medio cromogénico ESBL para la identificación de enterobacterias

[http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?open=SPN_CLN_PRD&do
c=SPN_CLN_PRD_G_PRD_CLN_123&pubparams.sform=13&lang=es](http://www.biomerieux.es/servlet/srt/bio/spain/dynPage?open=SPN_CLN_PRD&do
c=SPN_CLN_PRD_G_PRD_CLN_123&pubparams.sform=13&lang=es)

Indicaciones Búsqueda de información

Barra de Búsqueda

Realice búsquedas para localizar elementos específicos en documentos PDF.

Realice una búsqueda mediante la ventana de búsqueda o la barra de herramientas **Buscar**.

- 1- Introducir el texto que se desee buscar en el cuadro de texto de la barra de herramientas Buscar.
- 2- (Opcional) Haga clic en la flecha situada junto al cuadro de texto y elija una o varias de las siguientes opciones:
 - a. Palabras completas
 - b. Coincidencias de mayúsculas y minúsculas

Activar Marcadores

Para activar los marcadores localice el icono mostrado a continuación y dar click.





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA



**Libro electrónico sobre la
identificación de
microorganismos de la familia
Enterobacteriaceae mediante el
uso de medios cromogénicos**

Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Burgos García Irvin

Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIME,

PE202716

Contenido

Bacterias.....	1
Estructura celular de las bacterias	1
Reproducción bacteriana.....	1
Crecimiento y metabolismo de las bacterias	2
Importancia de las bacterias	4
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	7
Clasificación taxonómica	7
Fisiología y estructura.....	9
Propiedades metabólicas	10
Principales características microbiológicas de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	10
Métodos de identificación bacteriana	12
Métodos fenotípicos	12
Sistemas comerciales automatizados	13
Medios cromogénicos	15
Medio cromogénico chromID <i>Salmonella</i> Elite.....	16
Medio cromogénico chromID ESBL.....	17
Medio cromogénico CPS.....	18
Aislamiento e identificación de Enterobacterias	20
Género <i>Escherichia</i>	22
<i>Escherichia coli</i>	22
Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i>	23
Género <i>klebsiella</i>	29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Aislamiento e identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
Género <i>Salmonella</i>	36
<i>Salmonella enteritidis</i>	37
Aislamiento e identificación de <i>Salmonella enteritidis</i>	37
Género <i>Proteus</i>	43
<i>Proteus vulgaris</i>	43
Aislamiento e identificación de <i>Proteus vulgaris</i>	44
Anexo de medios de cultivo y pruebas bioquímicas	49
Medio de cultivo Verde Brillante	50

Medio de cultivo EMB (eosina azul de metileno)	51
Medio de cultivo MacConkey	52
Agar <i>Salmonella-Shigella</i>	53
Prueba de citrato	54
LIA (lisina hierro)	55
KIA (kliger hierro agar) y TSI (triple azúcar de hierro).....	56
Medio SIM (sulfuro indol motilidad).....	58
Rojo de metilo-Voges Proskauer.....	59
Referencias	62



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Bacterias Generalidades

Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariontes, esto quiere decir que están formados por una sola célula carente de núcleo. Su ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra libre en el citoplasma y no tienen organelos como mitocondria, cloroplasto o aparato de Golgi. A pesar de su sencilla organización celular cuentan con una pared celular (capa de polisacáridos) que envuelve la célula proporcionándole rigidez y protección.

Son tan pequeñas que es imposible verlas a simple vista miden de $0.1 \mu\text{m}$ a $10 \mu\text{m}$ ¹.

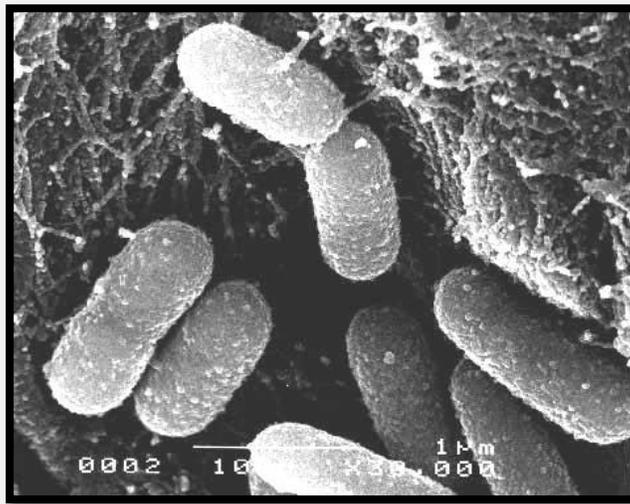


Imagen 1. Bacteria observada al microscopio electrónico¹

Estructura celular de las bacterias

La estructura de una bacteria no incluye mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico y otros organelos, de hecho la mayoría de las bacterias mide casi lo mismo que las mitocondrias. Su citoplasma sólo contiene ribosomas y un sólo cromosoma de DNA de doble cadena, las bacterias carecen de núcleo pero poseen todos los elementos químicos necesarios para la síntesis proteica².

Reproducción bacteriana

Se reproducen asexualmente por medio de una forma de división celular denominada fisión binaria, que produce copias genéticamente idénticas a la célula original. En condiciones ideales algunas bacterias se duplican en cuestión de minutos por lo que podrían en principio dar origen a una población de millones de bacterias en poco tiempo¹.

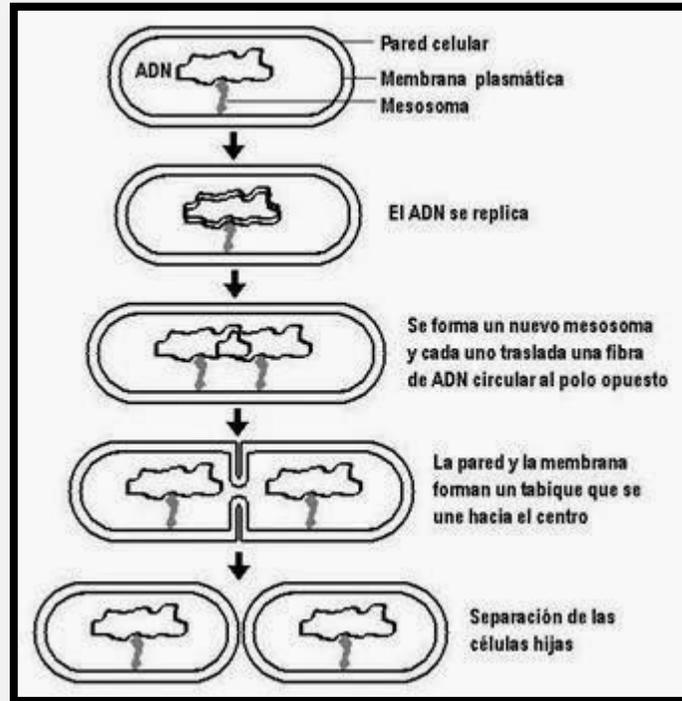


Imagen 2. Proceso de reproducción asexual Fisión binaria²

Crecimiento y metabolismo de las bacterias

La multiplicación celular es una consecuencia directa del crecimiento que en el caso de las bacterias da lugar a la formación de colonias. Los procesos sintéticos involucrados en el crecimiento bacteriano incluyen más de 2000 reacciones bioquímicas³.

Las principales funciones del metabolismo son:

- Formar las subunidades que luego serán utilizadas en la síntesis de macromoléculas.
- Proporcionar la energía necesaria para todos aquellos procesos que la requieran como transporte activo, movilidad, biosíntesis, etc.

El metabolismo de las bacterias es muy complejo, mediante unas dos mil reacciones metabólicas la bacteria puede sintetizarse a sí misma y puede generar energía para procesos como transporte activo, motilidad y otros procesos. Los distintos tipos de metabolismo microbiano pueden clasificarse según tres criterios distintos.

1) Con base en como el organismo obtiene el carbono para la construcción de la masa celular:

- Autótrofo: a partir de CO₂

- Heterótrofo: de compuestos orgánicos

2) Con base en como el organismo obtiene los equivalentes reductores para la conservación de energía:

- Litotrofo: de compuestos inorgánicos
- Organotrofo: de compuestos orgánicos.

3) Con base en la forma en la que el organismo obtiene la energía para vivir y crecer.

- Quimiótrofo: compuestos químicos externos.
- Fotótrofo: de la luz

Existen distintos tipos de organismos según como aprovechan el carbono y el tipo de energía que utilizan:

- Quimiolitoautrofos: obtienen la energía de la oxidación de compuestos inorgánicos, y el carbono de la fijación de CO₂. Algunos ejemplos son las bacterias nitrificantes, oxidantes de azufre, hierro e hidrógeno.
- Fotolitoautrofos: obtienen la energía de la luz y el carbono de la fijación de CO₂. Usan compuestos inorgánicos como equivalentes reductores. Un ejemplo de este tipo son las Cyanobacterias.
- Quimiolitoheterotrofos: obtienen la energía de la oxidación de compuestos inorgánicos, no pueden fijar el CO₂. Un ejemplo serían las bacterias oxidantes de hidrógeno.
- Quimioorganoheterotrofos: obtienen la energía del Carbono y de equivalentes reductores para reacciones biosintéticas de compuestos orgánicos. Un ejemplo son las bacterias *Escherichia coli* y Bacillos spp.
- Fotoorganotrofos: obtienen la energía de la luz, y el carbono y los equivalentes reductores de compuestos orgánicos.

El metabolismo se divide en dos clases de reacciones:

- Catabolismo: consiste en la degradación enzimática de macromoléculas como lípidos, hidratos de carbono y proteínas que el organismo obtiene del entorno en el cual vive o de sus propias sustancias de reserva. Esta degradación es acompañada de la liberación de una gran cantidad de energía.
- Anabolismo: consiste en la síntesis enzimática de macromoléculas a partir de compuestos sencillos, con consumo de energía. Es decir que a partir de moléculas sencillas y de bajo contenido energético se sintetizan macromoléculas complejas ⁴.

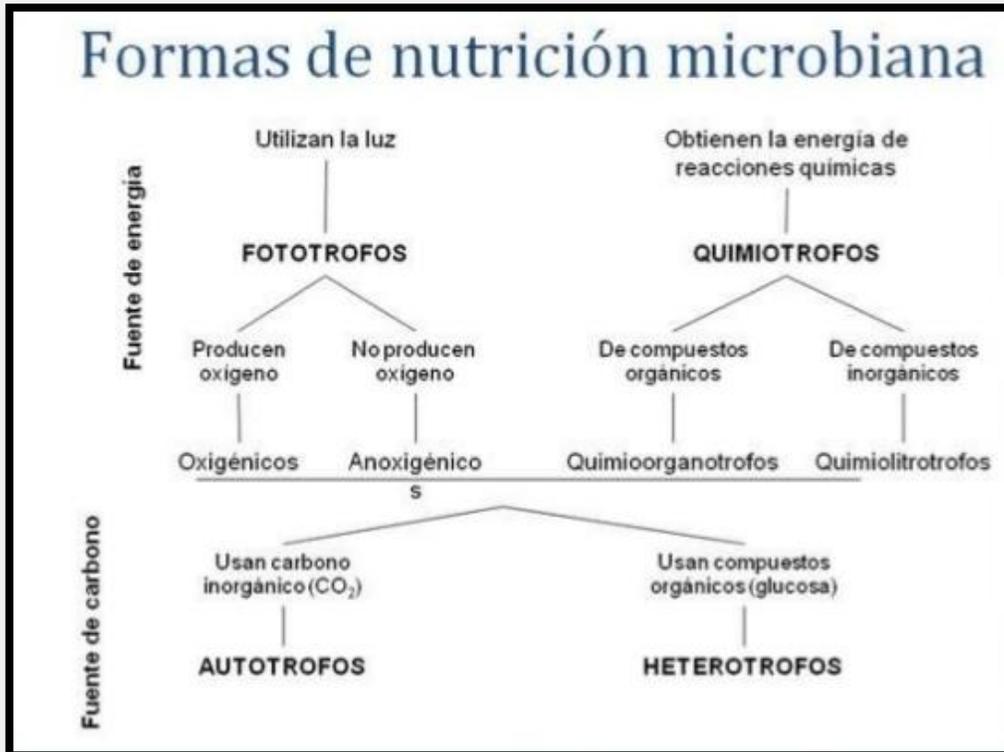


Imagen 3. Formas de nutrición microbiana³

Importancia de las bacterias

Las bacterias desempeñan funciones que son importantes para otras formas de vida. Muchas son endosimbiontes, esto quiere decir que viven dentro de otros organismos o en estrecha asociación con ellos. Por ejemplo, existen bacterias que habitan en el tracto digestivo de los animales, incluyendo el ser humano y les ayudan a procesar los nutrimentos que por sí solos serían incapaces de digerir ¹.



Imagen 4. Tinción en esputo de *Mycobacterium tuberculosis* causante de la tuberculosis⁴

Las bacterias son responsables de millones de muertes de personas a nivel mundial. Entre algunas enfermedades infecciosas bacterianas, causantes de grandes epidemias que han mermado la población, se encuentran: la difteria, cólera, tuberculosis, sífilis, tétanos, tos ferina, y fiebre tifoidea. Sin embargo, también existen infecciones

bacterianas que aunque están asociadas en menor frecuencia como causa de muerte, son un problema de salud pública en países en vías de desarrollo como el nuestro, entre las que se puede mencionar algunas de las enfermedades "menospreciadas", emergentes ².

Otro aspecto importante de las bacterias es que forman parte de la microbiota del cuerpo humano en especial del tracto gastrointestinal.

Se estima que en el intestino de un ser humano adulto, existe un billón de microorganismos por mililitro de contenido fecal y alberga entre 500 y 1000 diferentes especies bacterianas. La mayoría de esos microorganismos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* que está formada por bacterias Gram negativas, la microbiota intestinal difiere de una persona a otra y esa diversidad se ha visto en la composición del lumen (heces) y de la mucosa (epitelial).

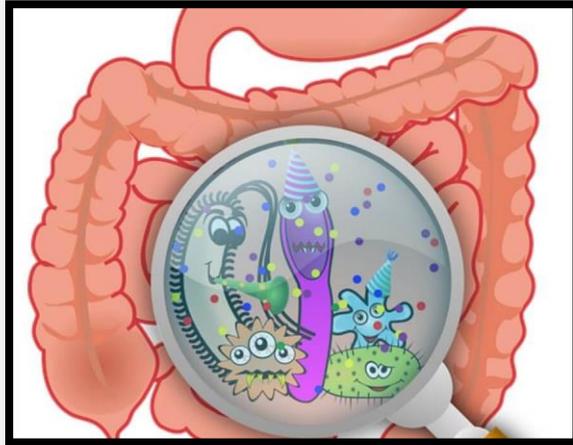


Imagen 5. Ilustración microbiota intestinal⁵

La microbiota también está involucrada en la degradación de algunas toxinas y carcinógenos que se ingieren en la dieta, síntesis de micronutrientes, fermentación de sustancias del alimento, ayuda en la absorción de electrolitos y minerales; asimismo afecta el desarrollo y diferenciación de los enterocitos, a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta. Finalmente, la microbiota previene la colonización del intestino por bacterias patógenas como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Shigella* ³.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

Generalidades
Familia
Enterobacteriaceae

Familia Enterobacteriaceae

La familia *Enterobacteriaceae* está conformada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos rectos, inmóviles o con flagelos peritricos, con necesidades nutricionales sencillas ⁵.

El orden Enterobacterial contiene solamente una familia, *Enterobacteriaceae*, con 44 géneros ⁵.

Son llamadas *Enterobacterias* porque con frecuencia se encuentran en el aparato digestivo de animales y humanos pero algunas especies también viven en la tierra y en el agua ⁶.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son tan comunes frecuentes e importantes que probablemente sean las bacterias más estudiadas en la mayoría de los laboratorios ⁵.

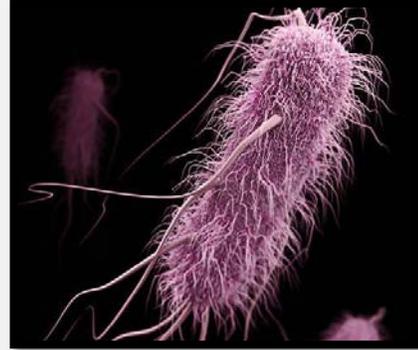


Imagen 6. Bacteria miembro de la familia *Enterobacteriaceae*⁶

Clasificación taxonómica

Una de las clasificaciones taxonómicas de las *Enterobacterias* fue propuesta por Erwing, quien las agrupo mediante tribus, esta clasificación tiene ciertas ventajas para la enseñanza y el aprendizaje de los alumnos que son nuevos en el campo de la microbiología. Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de *Enterobacterias* por tribus ⁷.

TRIBU	GÉNERO	ESPECIE
I. Escherichieae	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i>	<i>E.coli</i> , <i>E.blattae</i> , <i>E.alberti</i> , <i>E.fergusonii</i> , <i>E.hermanii</i> , <i>E.vulneris</i> . <i>S.flexnerii</i> , <i>S.boydii</i> , <i>S.sonnei</i> , <i>S.dysenteriae</i> .
II. Edwarsielleae	<i>Edwarsiella</i>	<i>E.tarda</i> , <i>E.hoshinae</i> , <i>E.ictaluri</i> .
III. Salmonelleae	<i>Salmonella</i>	<i>S.typhi</i> , <i>S.enteritidis</i> .
IV. Citrobactereae	<i>Citrobacter</i>	<i>C.amalonaticus</i> , <i>C.braaki</i> , <i>C.farmer</i> , <i>C.freundii</i> , <i>C.gilleni</i> , <i>C.koseri</i> , <i>C.murlinae</i> , <i>C.rodentium</i> , <i>C.sedlakii</i> , <i>C.werkmanii</i> , <i>C.youngae</i> .
V. Klebsielleae	<i>Klebsiella</i> <i>Radoultella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Hafnia</i> <i>Serratia</i>	<i>K.granulomatis</i> , <i>K.oxycota</i> , <i>K.pneumoniae</i> . <i>R.ornithinolytica</i> , <i>R.planticola</i> , <i>R.terrigena</i> . <i>E.aerogenes</i> , <i>E.amnigenus</i> <i>E.dissolvens</i> , <i>E.gergoviae</i> , <i>E.cloacace</i> , <i>E.cowanii</i> , <i>E.kobel</i> <i>H.alvei</i> . <i>S.entomophila</i> , <i>S.ficaria</i> , <i>S.grimesii</i> , <i>S.marcescens</i> , <i>S.rubidaea</i> , <i>S.proteamaculans</i> .
VI. Proteeae	<i>Proteus</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i>	<i>P.hauseri</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>P.myxofaciens</i> , <i>P.penneri</i> , <i>P.vulgaris</i> . <i>M.morganii</i> <i>P.alcalifaciens</i> , <i>P.heimbachae</i> , <i>P.stuartii</i> , <i>P.rettgeri</i> .
VII. Yersinieae	<i>Yersinia</i>	<i>Y.aldovae</i> , <i>Y.bercovieri</i> , <i>Y.enterocolitica</i> , <i>Y.intermedia</i> , <i>Y.kristensenii</i> , <i>Y.pestis</i> , <i>Y.pseudotuberculosis</i> , <i>Y.rohdei</i> , <i>Y.ruckeri</i> .
VII. Erwiniaeeae	<i>Erwinia</i>	<i>E.amylovora</i> , <i>E.caratovira</i> , <i>E.americana</i> .

Fisiología y estructura

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas; la capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas la membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunas organelos complejas que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición. El lípido A, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce. El oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como antígeno O. Este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos. Junto con otros factores, la presencia del antígeno O media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal, siendo capaces por tanto de sobrevivir más tiempo en sangre y causando infecciones hematógenas, diseminadas y más graves ⁶.

En la imagen 7 se esquematiza la estructura de la familia *Enterobacteriaceae* ⁶.

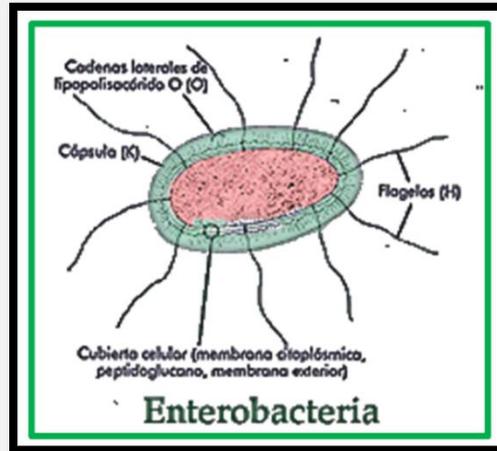


Imagen 7. Estructura de *Enterobacteria*⁷

Propiedades metabólicas

Las propiedades metabólicas de *Enterobacteriaceae* son muy útiles en la caracterización de los géneros que contiene. Los miembros de esta familia, a menudo denominados enterobacterias o bacterias entéricas, degradan azúcares mediante la vía Embed-Meyerhof y escinden el ácido pirúvico para producir ácido fórmico. La familia *Enterobacteriaceae* puede dividirse en dos grupos, en función de sus productos de fermentación. La mayoría (p.ej., los géneros *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*) llevan a cabo una fermentación ácido mixta y producen principalmente lactato, acetato, succinato, formato y etanol. A diferencia de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Erwinia* son fermentadores de butanodiol. En este tipo de fermentaciones los productos principales son butanodiol, etanol y dióxido de carbono. Los dos tipos de fermentación se distinguen por las pruebas rojo de metilo y Voges- Proskauer ⁵.

Principales características microbiológicas de la familia *Enterobacteriaceae*

- Son aerobios no formadores de esporas que pueden crecer en anaerobiosis (anaerobios facultativos).
- Reducen los nitratos a nitritos (con algunas excepciones).
- No licuan el alginato.
- Fermentan la glucosa a ácido con producción de gas o sin ella.
- Son oxidasa-negativos, a excepción de *Plesiomonas*.
- Producen catalasa.
- No ven favorecido su crecimiento por la presencia de NaCl.
- La mayoría son móviles (con flagelos peritricos).
- No formadores de esporas ⁵.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA



Métodos de identificación bacteriana

Existen diversos métodos de tipificación bacteriana con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y conocer las implicaciones patológicas, patogénicas, la evolución clínica y así poder aplicar una terapia antimicrobiana eficaz ⁸.

Métodos fenotípicos

La identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y costos son accesibles. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica se basan en las características “observables” de las bacterias; como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas ⁹.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS: Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación.

Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y la oxidasa.

Pruebas rápidas, con lectura en 6 horas; como la hidrólisis del hipurato, la β -galactosidasa (ONPG), aminopeptidasas, ureasa e indol. Pruebas lentas con lectura de 18 a 48 horas; oxido-fermentación, reducción de nitratos, Rojo de Metilo, Vogues Proskauer, Agar hierro de Kigler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, descarboxilasas, lipasas, utilización de citratos, entre las más frecuentes.

Pruebas basadas en características de resistencia a ciertas sustancias tal y como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis.

Las pruebas bioquímicas también evalúan: la capacidad de reducir ciertos iones (ferroso a férrico), la presencia o ausencia de flagelos (prueba de movilidad), la producción o no de hemolisinas, el requerimiento o no de algunos factores especiales (proteínas séricas), la producción o no de algunas toxinas con capacidad virulenta (toxina diftérica, toxina botulínica, etc.) ¹⁰.



Imagen 8. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Enterobacterias*⁸

Sistemas comerciales automatizados

Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inocula individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica (los resultados de las pruebas se agrupan de tres en tres, de manera que el resultado de cada trio de pruebas queda reducido a un dígito). Cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se hubieran utilizado. Para codificar el dígito de un trio de pruebas se establece el siguiente sistema: ¹¹.

- si una prueba es negativa se asigna un valor de 0 a la prueba
- si la primera prueba es positiva se asigna un valor a 1
- si la segunda prueba es positiva se asigna un valor de 2
- si la tercera prueba es positiva se asigna un valor de 4

El código numérico se obtiene sumando los valores de las tres pruebas. Los límites inferior y superior del código son 0 y 7 respectivamente.

Ante un microorganismo problema, se busca el código numérico y se comprueba a que bacteria pertenece. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: API (bioMerieux), Enterotube, Oxi/Fer, Tube (BD), Rap ID systems y Micro ID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen) etc ¹¹.



Imagen 9. Sistema API para la identificación bacteriana⁹

Existen en el mercado galerías multipuebas como las descritas anteriormente pero cuya inoculación, incubación, y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos objeto de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos. Los obtenidos en un ordenador, el cual proporciona con un alto índice de fiabilidad, la identificación del microorganismo. Algunos de los sistemas de paneles comerciales disponibles de uso más extendido son: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Winder, Phoenix, etc ¹².



Imagen 10. Microscan Panel, realiza la identificación microbiana simultánea con procedimientos manuales, semi o automatizados¹⁰

Medios cromogénicos

Los medios cromogénicos son medios de cultivo en los cuales se han incluido directamente sustratos cromogénicos que permiten detectar actividades enzimáticas. Esto a su vez permite reagrupar el aislamiento y la identificación inmediata de los principales microorganismos relacionados en la patología humana ¹³.

Estos medios se fundamentan en el uso de un sustrato cromogénico específico de la enzima del microorganismo que se investiga. Esta enzima al actuar sobre estos sustratos genera en ellos un cambio en su estructura, que queda evidenciada por la formación de colonias coloreadas ¹⁴.

Con base en lo anterior se han desarrollado diferentes tipos de medios cromogénicos:

a) Medios cromogénicos de orientación: permiten la identificación de múltiples microorganismos en un mismo medio.

b) Medios cromogénicos selectivos: permiten la identificación de un determinado grupo de microorganismos, inhibiendo el crecimiento de otros.

En algunos casos la identificación presuntiva puede llegar hasta género o especie; c) Medios cromogénicos para la detección de mecanismos de resistencia: por ejemplo en el caso de los bacilos Gram negativos (enterobacterias) permiten detectar betalactamasas de espectro extendido.

Actualmente los medios cromogénicos se emplean en diferentes áreas, desde la clínica y epidemiológica hasta la industria alimenticia, donde ofrecen como ventajas eliminar la necesidad del subcultivo y la elaboración de numerosas pruebas bioquímicas economizando tiempo y dinero. Entre las desventajas que pueden presentar se encuentran la actividad enzimática de los microorganismos y la interpretación de los colores por parte del operador. Sin embargo con respecto a esto último se han desarrollado equipos que facilitan la lectura de las placas ¹⁴.

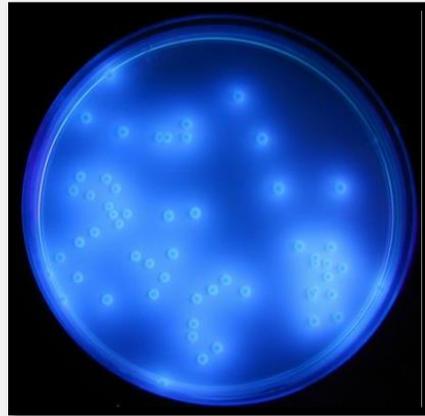


Imagen 11. Medio de cultivo Cromocen¹¹

Medio cromogénico chromID *Salmonella* Elite

El medio chromID *Salmonella* Elite es un medio cromogénico para el aislamiento selectivo e identificación de *Salmonella* a partir de muestras de origen humano.

Fundamento

El medio chromID *Salmonella* Elite está constituido por una base nutritiva que asocia diferentes peptonas y substratos cromogénicos (patente depositada) que permite el crecimiento del conjunto de las *Salmonella* el revelado de las actividades enzimáticas correspondientes. La diferenciación del género *Salmonella*, comprendidas las *Salmonella* lactosa (+), descansa en la aparición espontánea de un color malva pálido a malva de las colonias productoras de C8-esterasa, característica expresada por la mayoría de las *Salmonella*. El resto de cepas bacterianas desarrollan colonias de colores diferentes. La mezcla selectiva permite inhibir las bacterias Gram (+), algunas bacterias Gram (-), las levaduras y los mohos ¹⁵.

Siembra

1. Dejar que las placas alcancen temperatura ambiente.
2. Inocular el medio chromID *Salmonella* Elite directamente a partir de las muestras mediante estría cruzada incubar en estufa, con la tapa hacia abajo, a 35 ± 2 °C en aerobiosis. Los cultivos se examinan después de 18 a 24 horas de incubación ¹⁵.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Después de incubar, observar el crecimiento bacteriano, observar la presencia de colonias características de *Salmonella* de color malva pálido a malva. La identificación del o de los microorganismos aislados debe continuarse con pruebas complementarias adecuadas ¹⁵.



Imagen 12. Medio chromID *Salmonella* Elite con siembra de *Salmonella thypi*¹²

Medio cromogénico chromID ESBL

Para screening directo de *Enterobacterias* productoras de β -Lactamasa de espectro extendido (ESBL)

El agar chromID ESBL (pendiente de patente) contiene:

- Una mezcla de antibióticos, incluido cefpodoxima, que permite el crecimiento selectivo de *Enterobacterias* productoras de ESBL.
- Dos sustratos cromogénicos y un sustrato natural que permiten la identificación directa de las *Enterobacterias* productoras de ESBL más frecuentes:
 - *Escherichia coli*: Desarrollo espontáneo de color (rosa a rojizo) de cepas productoras de β -glucuronidasa (β -GUR).
 - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC): Desarrollo espontáneo de color verde, marrón verdoso o azul de cepas que expresan β -glucosidasa (β -GLU).
 - *Proteae* (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*): Desarrollo espontáneo de color marrón oscuro o marrón claro de cepas que expresan una desaminasa.

Viabilidad

Identificación directa e inmediata de las *Enterobacterias* después de 18-24 horas de incubación

Obtención de resultado en menor tiempo debido a la reducción de confirmaciones innecesarias ¹⁶.

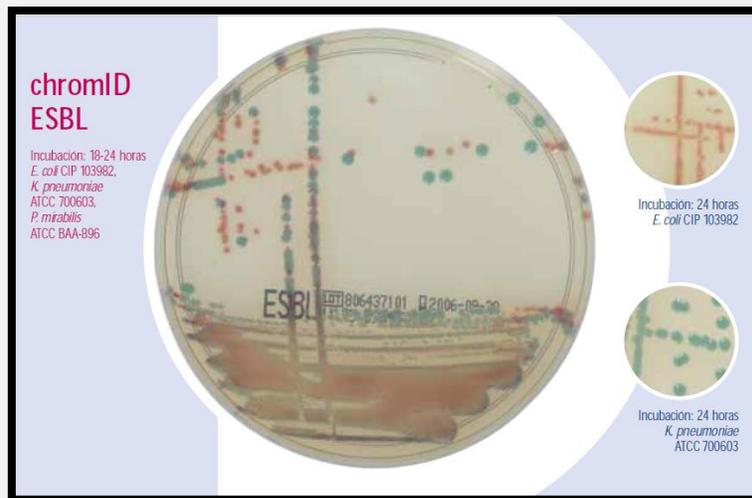


Imagen 13. chromID ESBL identificación de *E.coli*, *K.pneumoniae* y *P.mirabilis*¹³

Medio cromogénico CPS

Medio listo para el aislamiento, recuento e identificación directa en un solo paso de *E. coli*, *Proteus* y *Enterococos* en muestras urinarias, aislamiento y recuento de todos los patógenos del tracto urinario, buen aislamiento y fácil identificación de las colonias con colores realmente diferenciadores. El recuento microbiano se optimiza con un fondo incoloro.

Características e identificación de microorganismos en el medio CPS

- *E.coli*: β -glucuronidasa (β - GUR). No requiere prueba del indol.
- *Proteus*: coloración espontánea de las colonias productoras de desaminasa. No requiere la prueba adicional de TDA.
- *Enterococos*: β -glucosidasa (β - GLU).
- La capacidad nutritiva, principalmente para *Estafilococos* y levaduras.
- La sensibilidad de la detección y la especificidad de la coloración para los principales organismos habitualmente encontrados en orina.
- Identificación del grupo de bacterias KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*): mejor intensidad de la coloración, debido al aumento de la actividad β -glucosidasa.
- Orientación en la identificación de *Streptococcus agalactiae*¹⁷.

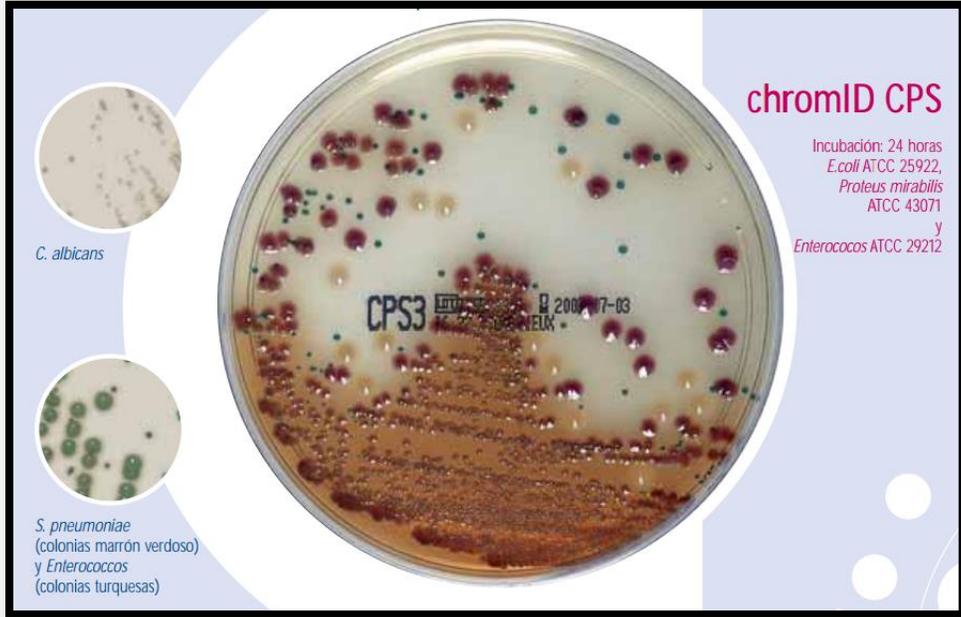


Imagen 14. Medio chromID CPS identificación *Candida albicans*, *E.coli*, *Proteus* y *Enterococcus*¹⁴



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

A hand wearing a yellow nitrile glove holds a petri dish containing a red agar medium with white bacterial streaks. A blue inoculation loop is positioned over the streaks. The background is a solid dark blue.

**Aislamiento e
identificación de
*Enterobacterias***



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Género *Escherichia*

Género *Escherichia*

Es un bacilo corto Gram negativo ¹⁸ y se diferencia de otros miembros de enterobacterias por su rápida fermentación de lactosa, con ácido y gas, y la clásica reacción IMViC Indol (+), Rojo de metilo (+), Voges Proskauer (-) y Citrato de Simmons (-). Sin embargo existen algunas cepas que no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente. Se presentan tanto formas móviles como inmóviles ¹⁹.

Escherichia coli

E.coli es un anaerobio facultativo y forma parte de la flora intestinal normal de los animales y humanos, fermenta la lactosa y produce rápidamente ácido y gas a partir de este azúcar. *E.coli* crece muy bien en medios de gran simplicidad (EMB, MacConkey, Agar Nutritivo); forma un brillo verdoso sobre el agar de eosina y azul de metileno; tiene actividad descarboxilasa de lisina; utiliza el acetato como única fuente de carbono e hidroliza el triptófano para formar indol ¹². Forma ácido y gas de la lactosa a 44 °C y a temperaturas inferiores, es indol positivo a 44 °C y 37 °C, RM (rojo de metilo) positivo, Voges Proskauer negativo, no crece en medios de citrato y KCN y es malonato y gluconato negativos ²⁰.

La estructura antigénica de *E.coli* es compleja. Existen cuatro antígenos: el antígeno H (flagelar), el antígeno K (capsular), el antígeno O (somático) y el antígeno F (fimbrias/pili); de los que existen 75,102, 167 y 12 variantes, respectivamente ²¹.

En función del síndrome que provocan, se reconocen actualmente cinco grupos de *E. coli* productores de diarrea ¹⁸.

- *E.coli*. enteropatógena
- *E.coli*. enterotoxigenica
- *E.coli*. enteroinvasiva
- *E.coli*. enterohemorrágica
- *E.coli*. enteroagregativa

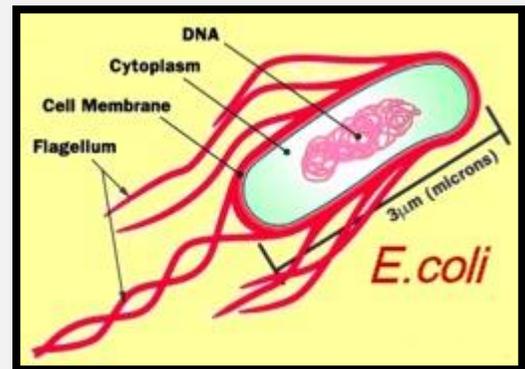


Imagen 15. Estructura característica de *E.coli*¹⁵

Es la especie bacteriana con mayor prevalencia en los aislamientos clínicos y es responsable de diversas enfermedades infecciosas. Causante de sepsis y shock Inducido por endotoxinas, también provoca infección en vías urinarias, neumonía en pacientes inmunosuprimidos y meningitis en recién nacidos.²²

Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*

Cuadro 2. Morfología colonial de *E.coli* en agar Verde Brillante

Característica	Agar Verde Brillante
Color	Amarillo
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Plana
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa
Otras	Fermentación de lactosa



Fotografía 1. *E.coli* en agar Verde Brillante colonias amarillas debido a la fermentación de lactosa

Cuadro 3. Morfología colonial de *E.coli* en agar EMB

Característica	Agar EMB
Color	Verde metálico
Tamaño	1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Cremosa
Otras	Formación de pigmento verde metálico



Fotografía 2. *E.coli* en agar EMB se observan colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado

Cuadro 4. Morfología colonia de *E.coli* en agar MacConkey

Característica	Agar Mac Conkey
Color	Rosa intenso
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Cremosa
Otras	Fermentación de lactosa



Fotografía 3. *E.coli* en agar MacConkey colonias rosadas debido a la fermentación de lactosa

Cuadro 5. Morfología colonial de *E.coli* en agar chromID CPS

Característica	Agar chromID CPS
Color	Rojo-cafe
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa
Otras	Formación de color debido a la acción de β -glucuronidasa



Fotografía 4. *E.coli* en agar chromID CPS coloración de las colonias debido a la acción de β -glucuronidasa

Cuadro 6. Morfología colonial de *E. coli* en agar chromID ESBL

Característica	Agar chromID ESBL
Color	Rojo-rosado
Tamaño	1 mm
Forma	Granular
Borde	Ondulado
Elevación	Plana
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Opaca
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa
Otras	Desarrollo de color de las colonias Rojo-rosado debido a la acción de β -glucuronidasa



Fotografía 5. *E. coli* en agar chromID ESBL colonias de color rojo-rosado que evidencian la producción de β -glucuronidasa

Observación microscópica



Fotografía 6. *E. coli* tinción de Gram Bacilos Gram negativos delgados alargados

Pruebas bioquímicas

Cuadro 7. Resultados pruebas bioquímicas para la identificación de *E.coli*

Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Ácido/Ácido; Gas
TSI	Ácido/Ácido; Gas
LIA	Descarboxilacion de lisina: (+) Pico púrpura/Fondo púrpura
SIM	Sulfuro: (-) Indol: (+) Motilidad: (+)
I	Indol: (+)
M	Rojo de Metilo: (+)
V	Voges Proskauer: (-)
I	Citrato: (-)
C	

Cuadro 8. Fotografías de pruebas bioquímicas para la identificación de *E.coli* parte 1

Batería de pruebas bioquímicas <i>E.coli</i>			
<p>Fotografía 7. LIA <i>E.coli</i>, descarboxilación de lisina (+)</p>	<p>Fotografía 8. citrato de Simmons no hay (-) <i>E.coli</i> no utiliza los citratos como fuente de carbono</p>	<p>Fotografía 9. TSI Fermentación de carbohidratos <i>E.coli</i></p>	<p>Fotografía 10. Rojo de metilo <i>E.coli</i>, coloración roja debido a la presencia de productos ácidos</p>

Cuadro 9. Fotografías de pruebas bioquímicas para la identificación de *E.coli* parte 2

Batería de pruebas bioquímicas <i>E.coli</i>			
<p>Fotografía 11.- KIA <i>E.coli</i>, fermentación de glucosa y lactosa</p>	<p>Fotografía 12.- SIM <i>E.coli</i>, Sulfuro (-), Movilidad (+)</p>	<p>Fotografía 13.- SIM <i>E.coli</i>, Indol (-)</p>	<p>Fotografía 14.- Voges Proskauer (-) <i>E.coli</i>, no hay oxidación del acetilmetil carbinol</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Género
Klebsiella

Género *klebsiella*

Descubierta por el microbiólogo Edwin Klebs a finales del siglo XIX. El género *Klebsiella* es un miembro de la familia Enterobacteriaceae. Forma parte de la flora del tracto gastrointestinal, pero actúa como patógeno oportunista provocando neumonía; al lograr entrar en los pulmones. Las infecciones causadas por este microorganismo afectan a pacientes con enfermedades subyacentes como la diabetes o alcohólicos y fumadores crónicos ²³.

Los miembros del género *Klebsiella* son bastoncillos gramnegativos cortos, inmóviles en forma de varilla, encapsuladas. La cápsula que cubre una célula de *Klebsiella* le ayuda a ser resistente a muchos antibióticos. Estas bacterias tienen dos tipos de antígenos en la superficie de la célula. Estos antígenos incluyen el lipopolisacárido (antígeno O) y el polisacárido capsular (antígeno K). Hay alrededor de 9 antígenos O y 77 antígenos K presentes en una célula *Klebsiella* ¹⁹.

El género *Klebsiella* presenta dos especies patógenas *klebsiella pneumoniae* y *klebsiella oxytoca*. Los miembros de del género *Klebsiella* son microorganismos entéricos, células aisladas que fermentan la lactosa, descarboxilan la lisina pero no la ornitina. *Klebsiella pneumoniae* es notable por qué forma colonias mucoides de gran tamaño, húmedas debido a la presencia de material capsular ¹⁵. La presencia de este material capsular se puede determinar mediante una tinción de capsula se trata de una tinción negativa usando tinta china, las partículas de carbón no penetran la célula bacteriana si no que tiñen su entorno y la bacteria aparece como un cuerpo retráctil sin teñir ⁸.

Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae puede aislarse a partir de sangre, orina, líquido pleural y heridas. La obtención de una muestra de esputo, en el caso de infecciones del sistema respiratorio, sirve para la identificación de bacilos Gram negativos mediante la tinción de Gram y la observación del material capsular se puede determinar mediante una tinción de capsula la cual consiste de una tinción negativa usando tinta china en donde las partículas de carbón no penetran la célula bacteriana si no que tiñen su entorno y la bacteria aparece como un cuerpo retráctil sin teñir.⁸



Imagen 16. Colonias características de *Klebsiella pneumoniae* en agar MacConkey¹⁶

K.pneumoniae es inmóvil, indol negativo, MR positivo, VP negativo, crece en medio de citrato pero no en medio de KCN, no produce sulfuro de hidrogeno, pero da positiva la prueba de la lisina descarboxilasa ⁹. En agar Mac Conkey fermenta la lactosa y forma colonias mucoides, mientras que en agar XLD se observan colonias amarillas ²⁴.

Aislamiento e identificación de *Klebsiella pneumoniae*

Cuadro 10. Morfología colonial de *K.pneumoniae* en agar Verde Brillante

Característica	Agar Verde Brillante
Color	Amarillas
Tamaño	3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucosa
Otras	Fermentación de lactosa



Fotografía 15. *K.pneumoniae* en agar Verde Brillante colonias amarillas debido a la fermentación de lactosa

Cuadro 11. Morfología colonial de *K.pneumoniae* en agar EMB

Característica	Agar EMB
Color	Purpura
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Elevada
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucosa
Otras	Fermentación de lactosa



Fotografía 16. *K.pneumoniae* en agar EMB colonias mucosas rosa purpuras debido a la fermentación de lactosa

Cuadro 12. Morfología colonial de *K.pneumoniae* en agar MacConkey

Característica	Agar Mac Conkey
Color	Rosa intenso
Tamaño	3-5 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucosa y adherente
Otras	Fermentación de lactosa



Fotografía 17. *K.pneumoniae* en agar MacConkey colonias adherentes y mucosas de color rosa debido a la fermentación de lactosa

Cuadro 13. Morfología colonial de *K.pneumoniae* en agar cromID ESBL

Característica	Agar chromID ESBL
Color	Verde
Tamaño	1-3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	
Consistencia	Mucosa
Otras	Producción de β -glucosidasa



Fotografía 18. *K.pneumoniae* en agar chromID ESBL colonias color verde que evidencian la producción de β -glucosidasa

Cuadro 14. Morfología colonial de *K.pneumoniae* en agar chromID CPS

Característica	Agar chromID CPS
Color	Verde
Tamaño	1 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Ligeramente elevada
Superficie	Brillosa lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Traslúcida
Consistencia	Ligeramente mucosa
Otras	Intensidad de color de las colonias debido a la mayor actividad de β -glucosidasa



Fotografía 19. *K.pneumoniae* en agar chromID CPS intensidad de color verde de las colonias debido a una mayor actividad de β -glucosidasa

Identificación microscópica



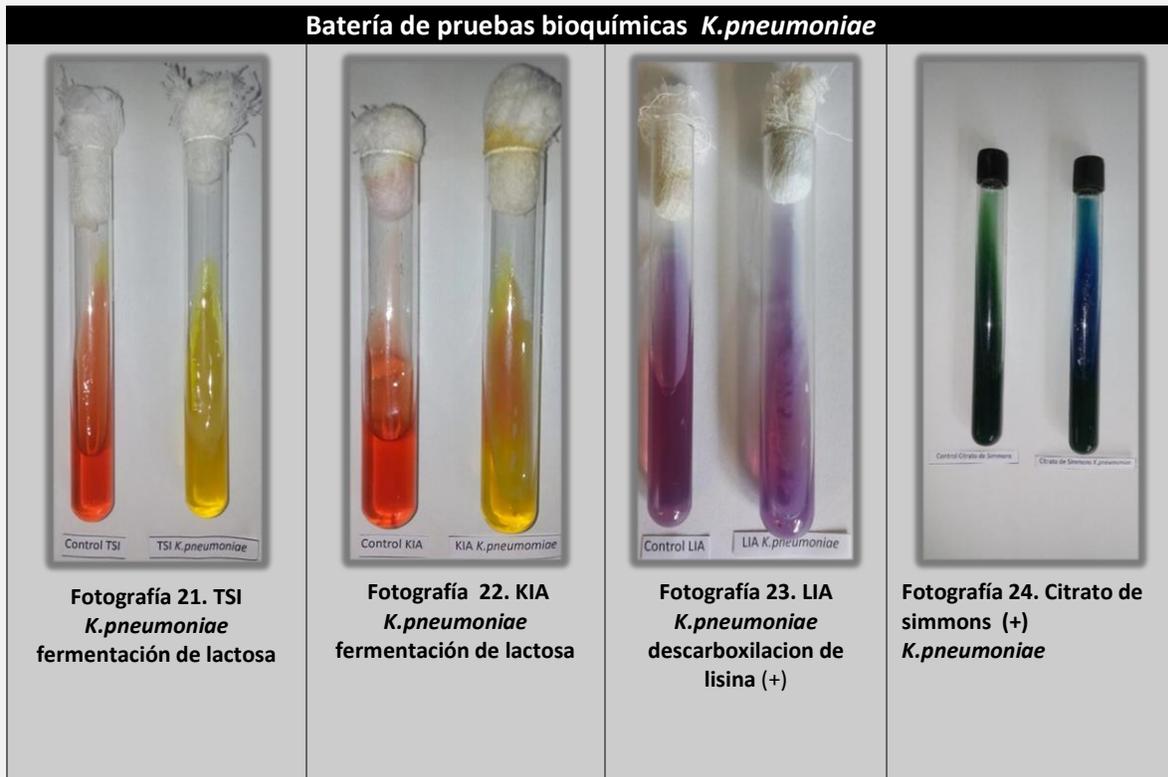
Fotografía 20. *K.pneumoniae* tinción de Gram Bacilos Gram negativos en pares

Pruebas bioquímicas

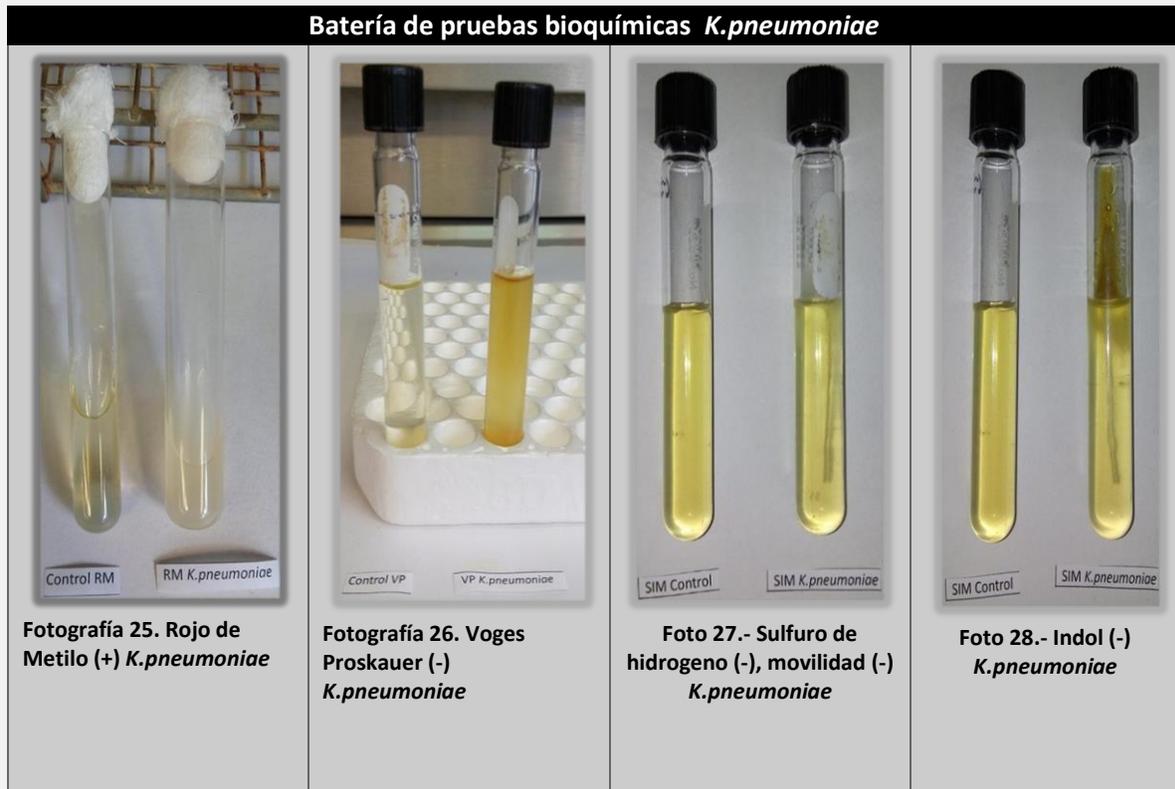
Cuadro 15. Pruebas bioquímicas para la identificación de *K.pneumoniae*

Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Ácido/Ácido
TSI	Ácido/Ácido
LIA	Descarboxilación de Lisina: (-); pico violeta/fondo violeta
SIM	Sulfuro: (-) Indol: (-) Motilidad: (-)
I	Indol: (+)
M	Rojo de Metilo: (-)
V	Voges Proskauer: (+)
I	Citrato: (+)
C	

Cuadro 16. Fotografías de las pruebas para la identificación de *K.pneumoniae* parte 1



Cuadro 17. Fotografías de las pruebas para la identificación de *K.pneumoniae* parte 2





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Género
Salmonella

Género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos gramnegativos móviles que no fermentan la lactosa, aunque la mayoría producen sulfuro de hidrógeno o gas por fermentación de los hidratos de carbono. Inicialmente, se agruparon en más de 2000 especies (serotipos) en función de sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (esquema de Kauffman-White). Actualmente se considera que esta clasificación está por debajo del nivel de especie: en realidad sólo hay dos o tres especies (*Salmonella enterica* o *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella bongori* y *Salmonella typhi*) y los serotipos se consideran subespecies. Todos los agentes patógenos entéricos, excepto *S. typhi*, pertenecen a la especie *S. enterica*. Por convención, las subespecies se abrevian, de modo que el serotipo *S. enterica* paratyphi A se transforma en *S. paratyphi* A.

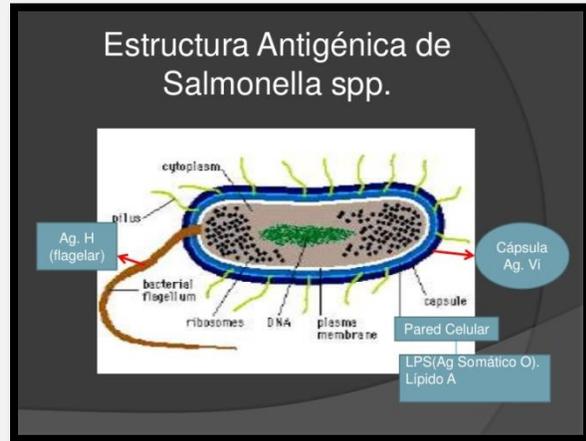


Imagen 17. Estructura antigénica del Género *Salmonella*¹⁷

El género *Salmonella* está ampliamente distribuido en el medio ambiente, pero algunas especies o serotipos presentan especificidad de hospedador. En concreto, *S. typhi* y, por lo general, *S. paratyphi* están restringidas al ser humano, aunque *S. paratyphi* puede infectar ocasionalmente al ganado. Muchos serotipos, incluidos *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, infectan a las personas y a múltiples especies de animales, como aves de corral, vacas, cerdos, ovejas, otras aves e incluso reptiles.

Los agentes patógenos típicamente acceden a los sistemas de distribución de agua mediante su contaminación fecal por descargas de aguas residuales, o por el ganado y los animales silvestres. Se ha detectado contaminación en una gran variedad de alimentos, incluida la leche ²⁵.

Salmonella tiene la capacidad de colonizar la pared intestinal, donde da lugar a desprendimientos de la mucosa y en ocasiones produce pequeñas úlceras que pueden sangrar ²⁶.

Salmonella puede clasificarse en si son móviles o no, además de ser lactosa negativa ²⁷.

Salmonella enteritidis

Salmonella enteritidis, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Bacilo Gram negativo, no esporulado. Este agente es ampliamente reconocido como causa de brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), especialmente a través de alimentos de origen aviar. Desde los años noventa la *Salmonella enteritidis* ha sido frecuentemente reportada como causa de brotes en países desarrollados como en vías de desarrollo. *Salmonella enteritidis*, es un patógeno entérico que provoca un cuadro de enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal, Esta enfermedad tiene un corto período de incubación que no supera los 3 días y que generalmente se expresa en menos de 24 horas. Su duración es autolimitada, alcanzando en promedio 8 días ²⁸.

S. enteritidis incluye más de 2,500 serotipos basados en las diferentes combinaciones de sus antígenos O, K, H. La mayoría de ellos causan gastroenteritis al hombre ²⁹.

Aislamiento e identificación de *Salmonella enteritidis*

Cuadro 18. Morfología colonial de *S. enteritidis* en agar Verde Brillante

Característica	Agar Verde Brillante
Color	Incoloras
Tamaño	1-2 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Traslucida
Consistencia	Membranosa



Fotografía 29. *S. enteritidis* en agar Verde Brillante colonias transparentes sobre fondo rojo debido a la ausencia de fermentación de carbohidratos

Cuadro 19. Morfología colonial de *S.enteritidis* en agar EMB

Característica	Agar EMB
Color	Incoloras
Tamaño	1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Redondo
Elevación	Plana
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa



Fotografía 25. *S.enteritidis* en agar EMB colonias incoloras debido a la ausencia de fermentación de lactosa

Cuadro 20. Morfología colonial de *S.enteritidis* en agar MacConkey

Característica	Agar Mac Conkey
Color	Incoloras
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa



Fotografía 30. *S.enteritidis* en agar Mac Conkey colonias incoloras debido a la ausencia de fermentación de lactosa presente en el medio

Cuadro 21. Morfología colonial de *S. enteritidis* en agar *Salmonella/Shigella*

Característica	Agar S-S
Color	Transparentes centro negro
Tamaño	1 mm
Forma	Irregular
Borde	Ondulado
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Opaca
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Membranosa
Otras	Fermentación de lactosa y formación de ácido sulfhídrico



Fotografía 31. *S. enteritidis* en agar *Salmonella Shigella*, centro negro en las colonias debido a la formación de sulfuro de hierro

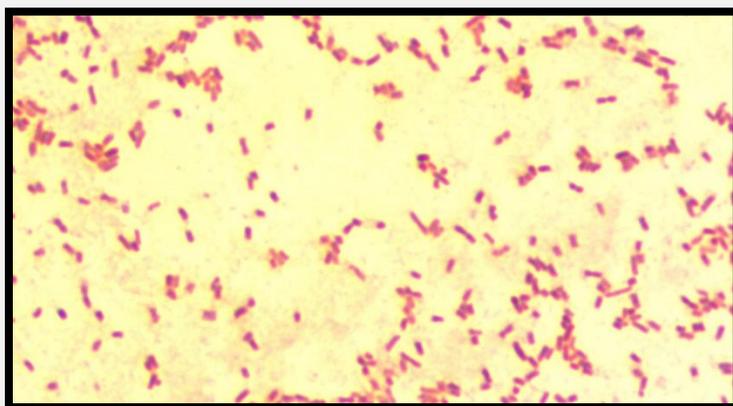
Cuadro 22. Morfología colonial de *S. enteritidis* en agar *Salmonella elite*

Característica	Agar <i>Salmonella elite</i>
Color	Malva
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Cremosa
Otras	Producción de color malva en las colonias debido a la producción de C8-esterasa



Fotografía 32. *S. enteritidis* en agar chromID *Salmonella elite* colonias color morado intenso debido a la producción de C8-esterasa

Identificación microscópica



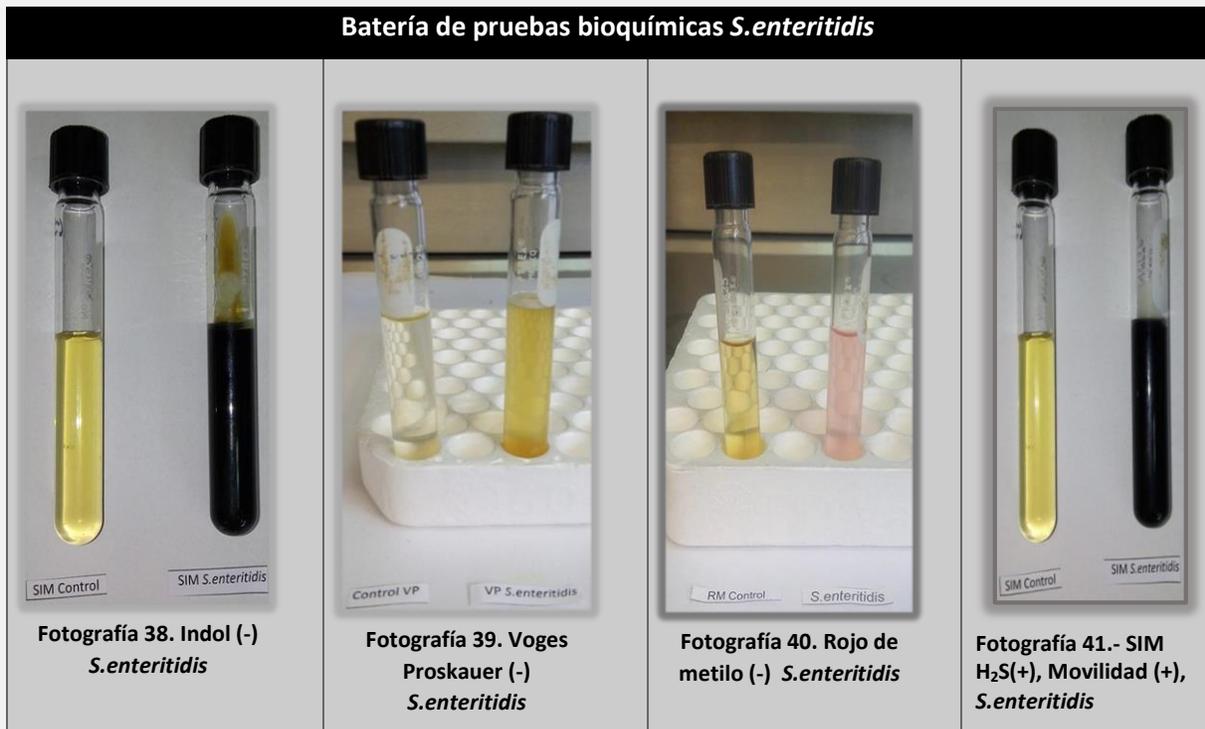
Fotografía 33. *S. enteritidis* tinción de Gram. Bacilos Gram negativos

Pruebas bioquímicas

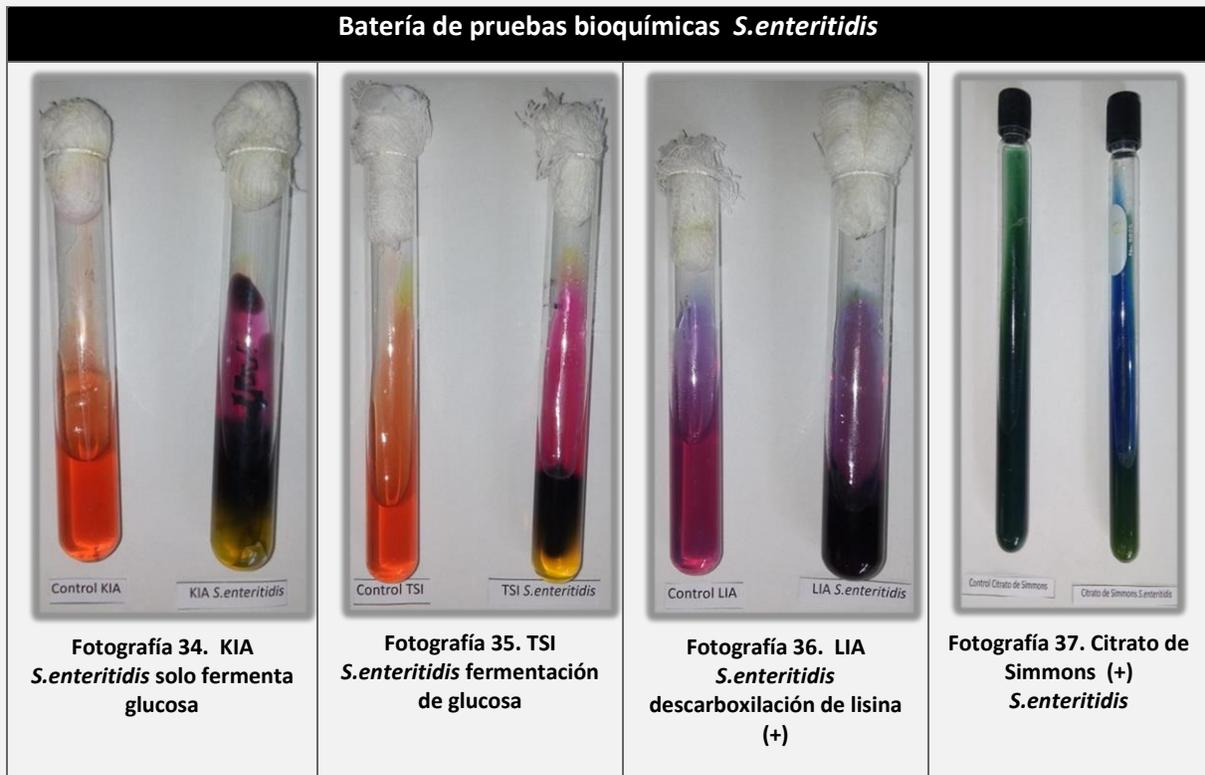
Cuadro 23. Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. enteritidis*

Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Ácido/Básico:
TSI	Ácido /Básico: Gas
LIA	Básico/Básico: Gas
SIM	Sulfuro: (+) Indol: (-) Motilidad: (+)
I	Indol: (-)
M	Rojo de Metilo: (+)
V	Voges Proskauer: (-)
I	Citrato: (+)
C	

Cuadro 24. Fotografías de las pruebas para la identificación de *S. enteritidis* parte 1



Cuadro 25. Fotografías de las pruebas para la identificación de *S. enteritidis* parte 2





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Género *Proteus*

Género *Proteus*

El género *Proteus* está incluido en la tribu Proteeae, junto con los géneros *Providencia* y *Morganella*, y sus miembros se describen como bacilos gramnegativos, móviles con flagelos peritricos, aerobios y anaerobios facultativos²⁹, es un género de bacterias que incluye patógenos responsables de muchas infecciones del tracto urinario²⁴. Este género está formado por las especies *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* y *Proteus myxofaciens*²⁶.

Los organismos del género *Proteus* crecen en medios del cultivo simples, donde sus colonias tienden a extenderse o diseminarse por la superficie (swarming)³⁰.

Proteus mirabilis y *Proteus vulgaris* comparten la capacidad de pulular sobre la superficie de los medios de cultivo en vez de conservarse confinados a colonias definidas, esto los hace fácil de identificar en el laboratorio³².

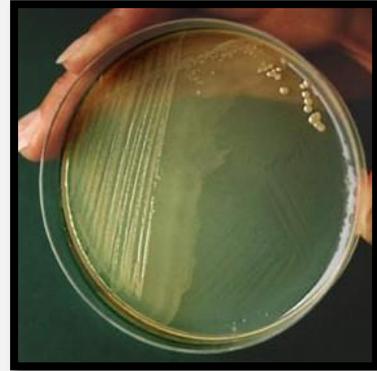


Imagen 18. Crecimiento característico de *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*¹⁸

Proteus vulgaris

Proteus vulgaris es una bacteria Gram-negativa en forma de varilla. El tamaño de las células individuales varía de 0.4-0.6 μm por 1.2 -2.5 μm . *P.vulgaris* posee flagelos peritricos, por lo que es activamente móvil. Habita en el suelo, el agua contaminada, carne cruda, tracto gastrointestinal de los animales, y el polvo³⁰.

Aislamiento e identificación de *Proteus vulgaris*

Cuadro 26. Morfología colonial de *P.vulgaris* en agar Verde Brillante

Característica	Agar Verde Brillante
Color	Blancas
Tamaño	1 mm
Forma	Circular
Borde	Arrisado
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Traslucida
Consistencia	Cremosa
Otras	Efecto swarming



Fotografía 42. *P.vulgaris* en agar Verde Brillante colonias blancas no hay fermentación de carbohidratos

Cuadro 27. Morfología colonial de *P.vulgaris* en agar EMB

Característica	Agar EMB
Color	Incoloras
Tamaño	1 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Rugosa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa
Otras	No hay fermentación de lactosa



Fotografía 43. *P.vulgaris* en agar EMB, colonias incoloras debido a la ausencia de fermentación de lactosa

Cuadro 28. Morfología colonial de *P.vulgaris* en agar MacConkey

Característica	Agar Mac Conkey
Color	Incoloras transparentes
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Plana
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Traslucida
Consistencia	Cremosa
Otras	Efecto swarming



Fotografía 44. *P.vulgaris* en agar MacConkey colonias incoloras debido a la ausencia de fermentación de lactosa

Cuadro 29. Morfología colonial de *P.vulgaris* en agar chromID CPS

Característica	Agar chromID CPS
Color	Café
Tamaño	1-3 mm
Forma	Redonda
Borde	Entero
Elevación	Convexa
Superficie	Brillante lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Ligeramente cremosa
Otras	Producción de desaminasa



Fotografía 45. *P.vulgaris* en agar chromID CPS coloración de las colonias café debido a la acción de desaminasa

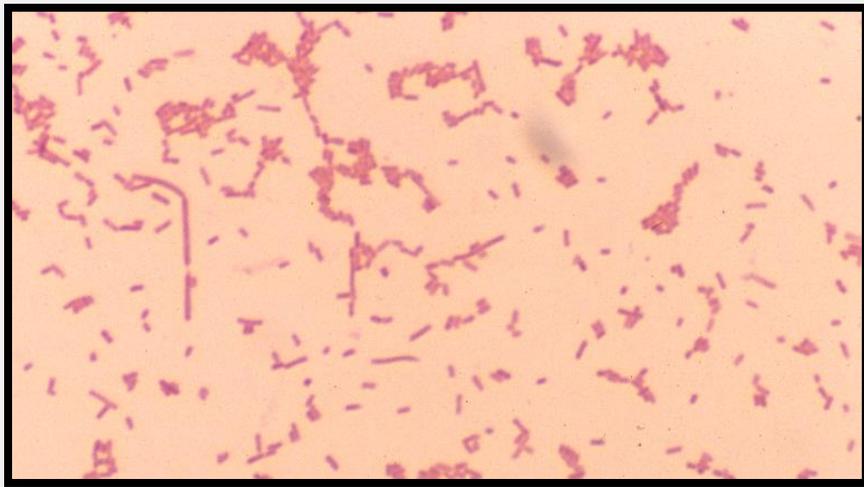
Cuadro 30. Morfología colonial de *P.vulgaris* en agar chromID ESBL

Característica	Agar chromID ESBL
Color	Marrón
Tamaño	1-2 mm
Forma	Redonda
Borde	Entero
Elevación	Ligeramente elevada
Superficie	Lisa brillante
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Cremosa
Otras	Coloración marrón debido a la producción de desaminasa



Fotografía 46. *P.vulgaris* en agar chromID ESBL la producción de desaminasa se evidencia por la formación de colonias color marrón-pardo

Identificación microscópica



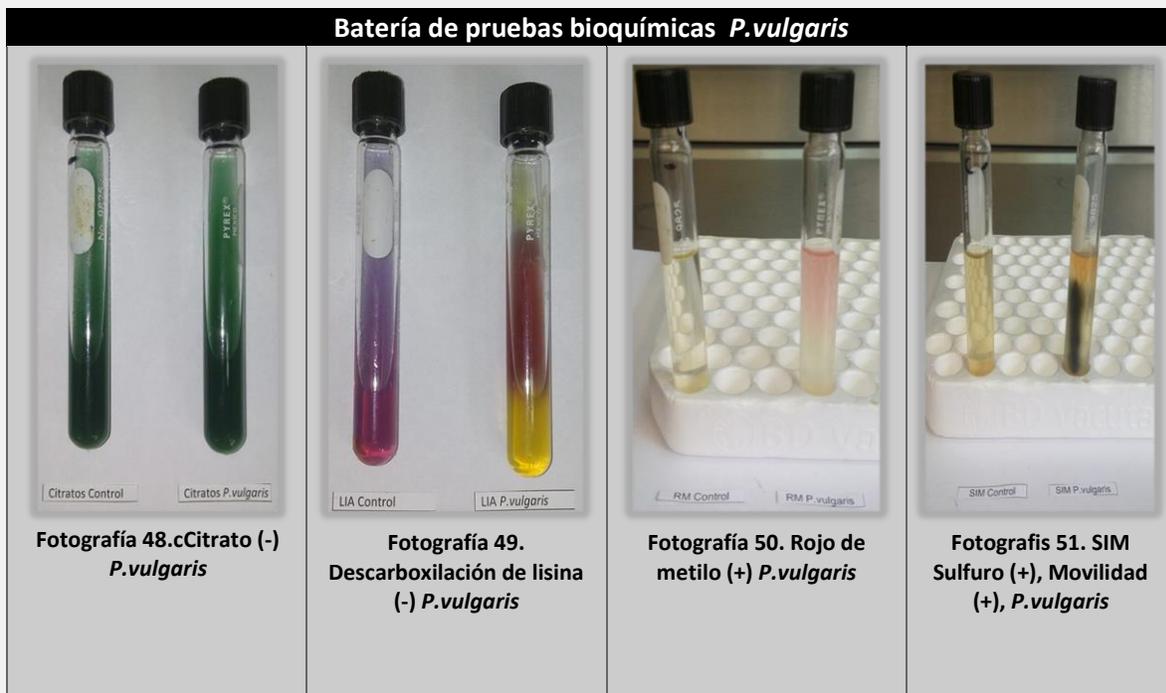
Fotografía 47. *P.vulgaris* tinción de Gram. Bacilos Gram negativos en cadena

Pruebas bioquímicas

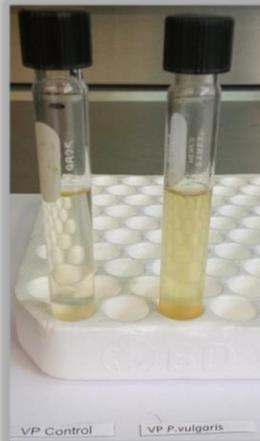
Cuadro 31. Pruebas bioquímicas para la identificación de *P.vulgaris*

Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Básico/ácido: H ₂ S
TSI	Ácido /Ácido: H ₂ S
LIA	Básico/Ácido: Lisina (-)
SIM	Sulfuro: (+) Indol: (+) Motilidad: (+)
I	Indol: (+)
M	Rojo de Metilo: (+)
V	Voges Proskauer: (-)
I	Citrato: (-)
C	

Cuadro 32. Fotografías de las Pruebas bioquímicas para *P.vulgaris* parte 1



Cuadro 33. Fotografías de las pruebas bioquímicas para *P.vulgaris* parte 2

Batería de pruebas bioquímicas <i>P.vulgaris</i>			
			
<p>Fotografía 52. TSI Fermentación de glucosa <i>P.vulgaris</i> fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa</p>	<p>Fotografía 53. Indol (+) <i>P.vulgaris</i></p>	<p>Fotografía 54. Voges Proskauer (-) <i>P.vulgaris</i></p>	<p>Fotografía 55. KIA <i>P.vulgaris</i> fermentación de glucosa</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

The background of the page is a collage of several petri dishes containing different colored agar media. The colors include purple, red, orange, blue, green, and yellow. The text is overlaid on this background.

**ANEXO DE
MEDIOS DE
CULTIVO Y
PRUEBAS
BIOQUÍMICAS**

Medio de cultivo Verde Brillante

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.

Es de un valor excepcional cuando se investiga un gran número de muestras de heces o alimentos, por su alta capacidad de diferenciación de las colonias sospechosas ³³.

Fundamento

En el medio de cultivo, la pluripectona y el extracto de levadura, constituyen la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. La lactosa y la sacarosa son los hidratos de carbono fermentables, el rojo fenol es el indicador de pH, que vira al amarillo cuando hay producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el verde brillante actúa como agente selectivo.

Siembra

Sembrar en superficie por estriado a partir de una dilución del material a investigar o de un cultivo previo en un medio de enriquecimiento ²⁹.

Incubación

Incubar 24 horas a 35-37 °C ³³.



Imagen 19. Agar Verde Brillante sin inocular¹⁹

Medio de cultivo EMB (eosina azul de metileno)

Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae ³⁴.

Fundamento

Este medio combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de Enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras ³⁴.

Siembra

En superficie, por estriado a partir de un inóculo poco denso, para obtener colonias aisladas ³⁴.

Incubación

De 24 a 48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis ³⁴.



Imagen 20. Agar EMB sin inocular²⁰

Medio de cultivo MacConkey

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo ³⁵.

Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras ³⁵.

Siembra

Sembrar en superficie ³⁵.

Incubación

Durante 18-48 horas, a 35-37 °C, en atmósfera aeróbica ³⁵.



Imagen 21. Agar MacConkey sin inocular²¹

Agar *Salmonella-Shigella*

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. y de algunas especies de *Shigella* spp a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia ³².

Fundamento

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial. La selectividad, está dada por la sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp. Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. *Salmonella*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen bien en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes. La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro ³⁶.

Siembra

Sembrar por estriado la superficie del medio de cultivo ³⁶.

Incubación

Durante 24-48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis ³⁶.

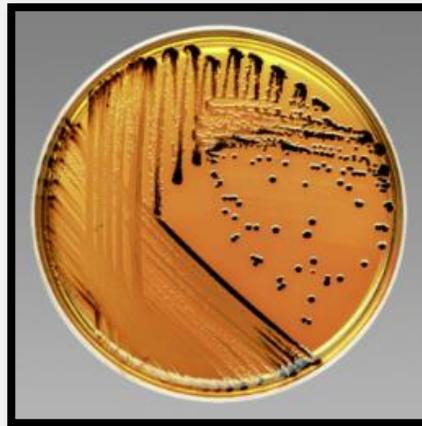


Imagen 22. Agar *Salmonella-Shigella*, colonias con centro negro debido a la formación de ácido sulfhídrico²²

Prueba de citrato

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante ³⁷.

Esta prueba nos permite diferenciar un grupo de bacterias que son capaces de crecer con citrato como única fuente de carbono y sales amónicas inorgánicas como única fuente de nitrógeno, provocando la alcalinización del medio.

El medio a utilizar es agar Citrato de Simmons, que contiene citrato de sodio, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador de pH.

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa ³⁸.

Interpretación de resultados



Imagen 23. Resultados citrato de Simmons a) negativo sin crecimiento ni cambio de color del indicador, b) Positivo crecimiento en el pico de flauta y viraje del indicador (azul)²³

LIA (lisina hierro agar)

Detecta si los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* descarboxilan o desaminan la lisina ³⁷.

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8.

Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo.

La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro ³⁹.

Interpretación de resultados

Descarboxilación de lisina.

- a) Positivo: pico de flauta púrpura/extremo inferior púrpura, con H₂S o sin él.
- b) Negativo: pico de flauta púrpura/extremo inferior amarillo, solo fermentación de glucosa.

Desaminación de lisina.

Pico de flauta rojo/extremo inferior amarillo. La reacción en el extremo inferior se debe a la fermentación de la glucosa ³⁷.

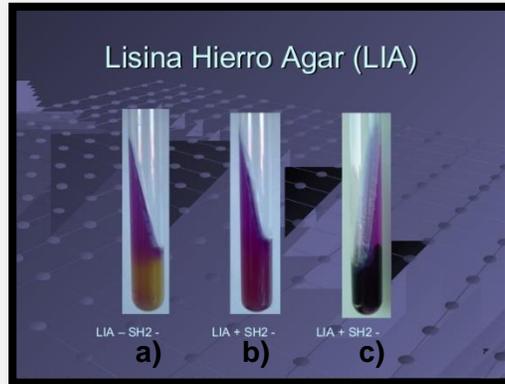


Imagen 24. Resultados LIA a) Descarboxilación de lisina (-), descarboxilación de lisina (+) c) Descarboxilación de lisina (+) con producción de H₂S²⁴

KIA (kliger hierro agar) y TSI (triple azúcar de hierro)

El agar con hierro de Kigler (KIA) y el agar con azúcar triple y hierro (TSI) son medios de cultivo diferenciales en tubo que cumplen un doble propósito: a) la determinación de fermentaciones de hidratos de carbono y b) la determinación de la producción de H₂S. Un microorganismo puede usar varios sustratos incorporados en el medio; el patrón de sustratos metabolizados se usa para diferenciar entre los diversos grupos, géneros o especies, principalmente entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae.

El KIA contiene dos hidratos de carbono 1% de lactosa y 0.1% de glucosa. El TSI puede sustituir el KIA; la diferencia primaria es el agregado de un tercer hidrato de carbono, la sacarosa, a una concentración del 1%. La bioquímica es básicamente igual a la del KIA por eso solo se discute en detalle el KIA. En el KIA, algunos microorganismos pueden fermentar ambos hidratos de carbono, otros fermentan solo la glucosa; incluso otros no pueden fermentar ni la lactosa ni la glucosa. La fermentación de los hidratos de carbono puede ocurrir con o sin producción de gas³⁷.

Patrones de fermentación en el medio

Fermentación sólo de la glucosa (alcalino/acido)

Se presenta sólo en los microorganismos que no fermentan la lactosa pero si la glucosa, se observa un pico de flauta alcalino y un fondo ácido.

El pico de flauta es alcalino (rojo), lo cual indica la degradación aerobia de la glucosa la baja concentración de esta provoca que el microorganismo empiece a usar peptonas del medio, provocando la liberación de amoniaco que alcaliniza el medio. El fondo vira a color amarillo debido a la degradación anaerobia de la glucosa con la subsecuente producción de ácidos que mantienen el pH³⁷.

Es importante cuidar los tiempos de incubación para evitar lecturas erróneas; ácido/ácido (poco tiempo de incubación) o alcalino/alcalino (exceso de tiempo).

Fermentación de carbohidratos lactosa y glucosa (ácido/ácido)

Algunos microorganismos pueden fermentar la lactosa y la glucosa para obtener sus nutrientes y producen una reacción en el KIA con un pico de flauta (ácido/ácido) pico amarillo fondo amarillo, después de 18-24 horas de incubación ³⁷.

Ausencia de fermentación de lactosa y glucosa (alcalino/alcalino; alcalino/sin cambios)

Algunos bacilos Gram negativos no entéricos, no pueden fermentar los carbohidratos del medio por lo que utilizan las peptonas del medio. Estos microorganismos no entéricos pueden usar la peptona de manera aerobia o anaerobia y son capaces de producir dos reacciones. Alcalino/alcalino; degrada la peptona tanto aeróbica como anaeróbicamente, mientras que una reacción de pico alcalino y sin cambios en el fondo es provocado por un microorganismo que puede degradar la peptona sólo aeróbicamente ³⁷.

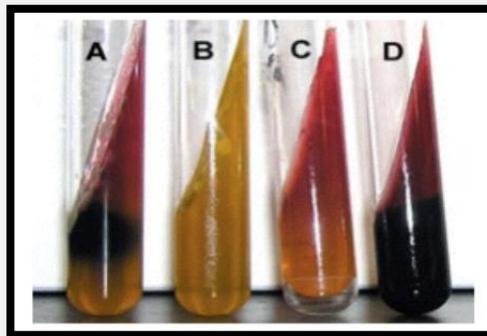


Imagen 25. Resultados de las pruebas KIA y TSI²⁵

Cuadro 33. Resultados de las pruebas KIA Y TSI ³⁷

Patrón de fermentación	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D
Fermentación Glucosa	+	+	+	+
Fermentación Lactosa	-	+	-	-
Producción H ₂ S	+	-	-	+
Producción gas	-	+	+	-

Medio SIM (sulfuro indol motilidad)

Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Fundamento

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2 ⁴⁰.

Interpretación de resultados

Cepas móviles: producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.

Cepas inmóviles: el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.

Cepas H₂S positivas: ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.

Cepas H₂S negativas: el medio permanece sin cambio de color.

Cepas indol positivas: desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's o de Erlich.

Cepas indol negativas: sin cambio de color ⁴⁰.

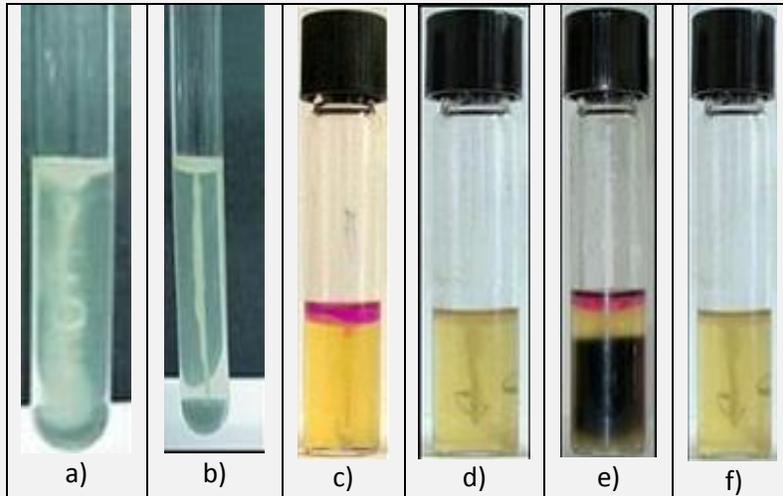


Imagen 26. Resultados SIM a)movilidad positivo, b) movilidad negativo, c)indol positivo, d)indol negativo, e)H₂S positivo, f)H₂S negativo²⁶

Rojo de metilo-Voges Proskauer

Medio utilizado para la realización del ensayo de Rojo de Metilo y Voges Proskauer. Es particularmente útil para la clasificación de Enterobacterias.

En el medio de cultivo, la pluripectona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol). Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros. Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa. Esta coloración se debe a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo ⁴¹.

Siembra

Por inoculación directa, a partir del cultivo en estudio.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37°C por 3 días.

Revelado de pruebas

a- Prueba del rojo de metilo:

Añadir unas gotas de una solución de rojo de metilo al 0.04%, observar el color del medio.

b- Prueba del Voges Proskauer:

Añadir 0,6 ml de alfa naftol al 5% en alcohol etílico absoluto y 0.2 ml de hidróxido de potasio al 40% a 2.5 ml de cultivo. Agitar vigorosamente el tubo, y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Observar el color de la superficie del medio ⁴¹.

Interpretación de resultados

1-Prueba del rojo de metilo:

Positivo: color rojo.

Negativo: color amarillo.

2-Prueba de Voges Proskauer:

Positivo: desarrollo de un color rojo en pocos minutos después de una completa agitación del tubo.

Negativo: ausencia de color rojo ⁴¹.

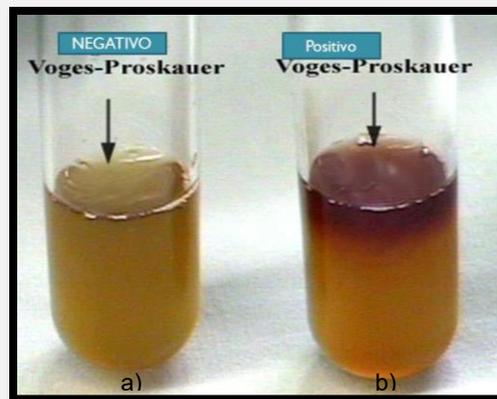


Imagen 27. Resultados prueba Voges Proskauer a) negativo, b) positivo²⁷

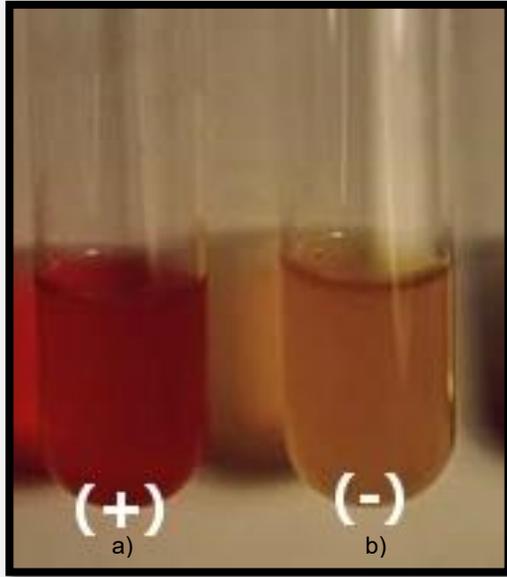


Imagen 28. Resultados rojo de metilo a) prueba positiva b) prueba negativa²⁸

Referencias

Libros, páginas de internet y blogs

1. Biodiversidad mexicana. Bacterias [internet]. No date [consulta 2016 Sep 19]. Disponible en: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/Bacterias/bacteria.html
2. Ecured. Bacteria [internet]. No date [consulta 2016 19 Sep]. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Bacteria>
3. Universidad nacional autónoma de México. Departamento de microbiología y parasitología [internet]. No date [consulta 2016 Sep 25]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidad.es.html>
4. Metabolismo bacteriano [internet]. c2016 [actualizado 2014 Oct 14; consulta 2016 Oct 2]. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/metabolismo-bacteriano.html>
5. Willey M, Sherwood M, Woolverton J, Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª ed. España: Editorial Mc Graw Hill., 2009.
6. Puerta F, Mateos R. Enterobacterias Unidad de Enfermedades Infecciosas. 2ª ed. España: Editorial Albacete; 2009.
7. García A, Rodríguez F. Enterobacterias [Monografía en internet]. Albacete; España: Medicine; 2010 [acceso 20 de septiembre 2015]. Disponible en; www.facmed.unam.mx
8. Tortora G. Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.
9. Flores S, Pérez L, Marjorie K. Infección urinaria intrahospitalaria en los servicios de hospitalización de Medicina de un Hospital General. Revista Médica Herediana. Vol.19 No.2; 2008.
10. García P, Fernández M, Paredes F. Microbiología Clínica Aplicada. 3ª ed. Editorial Díaz de Santos. México: 1998.
11. García MJ, Cárdenas MP, Urbano AF. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias. Vol1. 1ª edición. España: Omniascience; 2012.
12. Kenneth JR. Microbiología Médica. Vol 1.5ª edición. México: Mc Graw Hill; 2010.
13. Biomerieux. Medios cromogénicos chromID [internet]. No date [consulta 9 Sep 2016]. Disponible en: <http://www.biomerieux.com.co/servlet/srt/bio/colombia/dynPage?open=CLM>

[_CLN_PRD&doc=CLM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_41&pubparams.sform=1
&lang=es_co](http://www.biomerieux.com.co/servlet/srt/bio/colombia/dynPage?open=CLM_CLN_PRD&doc=CLM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_41&pubparams.sform=1&lang=es_co)

14. Gotas microbiológicas. Medios cromogénicos [internet].c 2011 [actualizado 2011 Feb 7; consulta 2011 Mar 9]. Disponible en: <http://gotasmicrobiologicas.blogspot.mx/2011/02/medios-cromogenicos.html>
15. Biomerieux. Medios cromogénicos: chromID Salmonella elite [internet]. c2016 [Actualizado 2016 Sep 04; consulta 2017 Enero 02]. Disponible en: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/14-chromid-salmonella-elite>
16. Biomerieux. Medios cromogénicos: Aislamiento de colonias ESBL [internet]. c2016 [Actualizado 2016 Jun 14; consulta 2016 Ago 7]. Disponible en: http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_58&pubparams.sform=10&lang=es_ar
17. Biomerieux. Medios cromogénicos: Medio chromID CPS [internet]. c2016 [Actualizado 2016 Sep 02; consulta 2016 Nov 05]. Disponible en: http://www.biomerieux.com.co/servlet/srt/bio/colombia/dynPage?open=CLM_CLN_PRD&doc=CLM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_41&pubparams.sform=2&lang=es_co
18. Serrano S, Marfil R, Jodral M. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio porcino; fundamentos de seguridad alimentaria. Editorial Díaz de Santos. España; 2009.
19. Finegold SM, Martin WJ. Diagnostico Microbiológico. 6ª Ed. Buenos aires: Editorial medica panamericana;1983.
20. Walker ST. Microbiologia.1ª Ed. Mexico: Editorial McGraw Hill;2000.
21. Collins CH, Lyne PM. Métodos microbiológicos. 5ª Ed. España: Editorial Acribia; 1989.
22. Espinal P, Mantilla J, Saavedra C. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa de espectro extendido. Biomédica. Vol.24 No.23; 2004.
23. García P, Fernández M, Paredes F. Microbiología Clínica Aplicada. 3ª ed. Editorial Díaz de Santos. México: 1998.
24. Bailey & Scott. Diagnostico microbiológico. 12ª Ed. Buenos aires: Editorial médica panamericana; 2009.
25. Salmonella descripción general Genero salmonella [internet]. c2002 [actualizado 2002 Julio 1; consulta 2016 Sep 8]. Disponible en: http://www.bvsde.paho.org/cdgdwq/docs_microbiologicos/bacterias%20pdf/salmonella.pdf
26. Romero R. Microbiología y parasitología humana. 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.
27. Murray P. Microbiología Médica. 5ª ed. España: Elsevier España: 2006.

28. Instituto de salud pública Ministerio de salud [internet]. c2011 [actualizado 2011 Agos 30; Consulta 2016 Agos 28]. Disponible en:
<http://www.ispch.cl/content/15049>
29. Prats G. Microbiología Clínica. España: Medica Panamericana; 2007.
30. Cantón R. *Proteus penneri*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24(1):8-13
31. EcuRed. Conocimiento con todos y para todos: *Proteus* (bacteria) [internet]. c1999 [Actualizado 1999 Ene 20; consulta 2016 Sep 7]. Disponible en:
[https://www.ecured.cu/Proteus_\(bacteria\)](https://www.ecured.cu/Proteus_(bacteria))
32. Rosenthal K, Pfaüer M. Microbiología médica. 5ª ed. Madrid, España: Elsevier, 2007.
33. Britanialab. Verde brillante agar [internet]. No date [consulta 2016 Oct 12]. Disponible en:
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/verdebrillagar.htm>
34. Britanialab. EMB agar [internet]. No date [consulta 2016 Oct 12]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/embagar.htm>
35. Britanialab. Macconkey agar [internet]. No date [consulta 2016 Oct 12]. Disponible en:
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/maconkeyagar.htm>
36. Britanialab. Salmonellashigella agar [internet]. No date [consulta 2016 Oct 12]. Disponible en:
<http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/salmoshigagar.htm>
37. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª Ed. Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2004.
38. Catálogo de prácticas de laboratorio para la docencia en microbiología [internet]. España: Vicerrectorado de estudios; c2010 [consulta 19 de julio 2016]. Disponible en: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/identificacion-bacteriana/utilizacion-del-citrato>
39. Britanialab. Lisinahierro agar [internet]. No date [consulta 2016 Oct 12]. Disponible en:
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm>
40. Britanialab. SIM medio [internet]. No date [consulta 2016 Oct 12]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simedio.htm>
41. Britanialab. MR-VP [internet]. No date [consulta 2016 Oct 12]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/mr-vpmedio.htm>

Imágenes de internet

Imagen 1.- Bacteria vista al microscopio Disponible en:

<http://www.duiops.net/seresvivos/bacterias.html>

Imagen 2.- Fisión binaria Disponible en:

<http://masalladelabiologia.blogspot.mx/2015/04/las-bacterias-se-reproducen-en-forma.html>

Imagen 3.- Metabolismo bacteriano Disponible en: <http://omarleo168-microbiologia.blogspot.mx/2011/01/metabolismo-bacteriano.html>

Imagen 4.- *Mycobacterium tuberculosis* en esputo Disponible en:

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.html>

Imagen 5.- Imagen bacteria Disponible en:

http://www.science20.com/news_articles/common_respiratory_infection_bacteria_on_verge_of_becoming_superbugs-154311

Imagen 6.- Bacteria miembro de la familia *Enterobacteriaceae* Disponible en:

<https://espanol.umich.edu/noticias/2016/09/13/lo-que-necesita-saber-acerca-de-la-neumonia/>

Imagen 7.- Estructura de *Enterobacterias* Disponible en:

<http://higienealimentis.blogspot.mx/2011/04/enterobacterias.html>

Imagen 8.- Pruebas bioquímicas para la identificación de *Enterobacterias*

Disponible en: http://bagginis.blogspot.mx/2014/07/guia-practica-del-laboratorio_21.html

Imagen 9.- Sistema API para la identificación bacteriana Disponible en:

<http://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/apirid32>

Imagen 10.- Microscan panel Disponible en:

https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?_nfpb=true&_windowLabel=UCM_RENDERER&_urlType=render&wlpUCM_RENDERER_path=%2Fwsr%2Fcountry-selector%2Findex.htm&_WRpath=%252Fwsr%252Fdiagnostics%252Fclinical-products%252Fmicrobiology%252Fmicroscan-panels%252Fconventional-panels%252Findex.htm&intBp=true

Imagen 11.- Medio de cultivo Cromocen Disponible en:

http://www.bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol22_4_06/mgi05406.htm

Imagen 12.- Medio cromogénico *Salmonella* elite Disponible en:

<http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/14-chromid-salmonella-elite>

Imagen 13.- Medio cromogénico ESBL Disponible en:

http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_58&pubparams.sform=10&lang=es_ar

Imagen 14.- Medio cromogénico CPS Disponible en: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/9-chromid-cps-elite>

Imagen 15.- Estructura característica de *E.coli* Disponible en:

<https://www.google.com.mx/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=0ahUKEwilyl-C5M7PAhXBpYMKHViuDc0QjhwIBQ&url=http%3A%2F%2Fwww.nature-education.org%2Fwater-ecoli.html&bvm=bv.135258522,d.amc&psig=AFQjCNEI9pLV-xeek-A4-KancCHZmZ0pug&ust=1476138873981760>

Imagen 16.- *Klebsiella pneumoniae* en agar Mac Conkey Disponible en:

<https://www.google.com.mx/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=0ahUKEwjcr2-4s7PAhUByoMKHaF6A-wQjhwIBQ&url=http%3A%2F%2Fmicrobitosblog.com%2F2010%2F06%2F14%2Fmorfologia-colonial-bacteriana%2F&bvm=bv.135258522,d.amc&psig=AFQjCNGkijLFk0jEyQz1lnHwMcBAdvqNDw&ust=1476138471419542>

Imagen 17.- Estructura del género *Salmonella* Disponible en:

<http://es.slideshare.net/CesarCastorFretesTorales/ctedra-de-microbiologa-y-parasitologa-mdica-2>

Imagen 18.- Crecimiento característico de *Proteus* Disponible en:

http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/MicroBio_Interpreting_Plates.shtml

Imagen 19.- Agar Verde Brillante sin inocular Disponible en:

<http://microbitosblog.com/2010/06/24/pruebas-bioquimicas-y-medios-de-cultivo-para-enterobacterias/>

Imagen 20.- Agar EMB sin inocular Disponible en:

<http://visionlaboratorista.blogspot.mx/2014/12/emb-agar-eosina-y-azul-de-metileno.html>

Imagen 21.- Agar Mac Conkey sin inocular Disponible en:

<https://www.flickr.com/photos/medmicro/2439287109>

Imagen 22.- Agar *Salmonella-Shigella* Disponible en:

<https://www.google.com.mx/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=>

[0ahUKEwi945if89XPAhVMTSYKHVTtBysQjhwIBQ&url=https%3A%2F%2Fmicroblog.org%2F2016%2F05%2F09%2Fknow-your-culture-a-quick-reference-guide%2F&psig=AFQjCNHB6OxNwvyZpdAArqfVRbq48BJoEg&ust=1476383488293352](https://microblog.org/2016/05/09/2Fknow-your-culture-a-quick-reference-guide%2F&psig=AFQjCNHB6OxNwvyZpdAArqfVRbq48BJoEg&ust=1476383488293352)

Imagen 23.- Resultados citrato de Simmons Disponible en:
<http://perso.wanadoo.es/microdominguez/a.htm>

Imagen 24.- LIA Resultados Disponible en:
<http://es.slideshare.net/StephaneLovon/pruebasbioquimicasdeidentificacion243338506-16283374>

Imagen 25.- Resultados KIA y TSI Disponible en:
<http://es.slideshare.net/Prymer/medios-bioquimicos>

Imagen 26.- Resultados medio SIM Disponible en: <http://microbiologia-monitoria.weebly.com/medios-diferenciales.html>

Imagen 27.- Resultado Voges Proskauer Disponible en:
<http://slideplayer.es/slide/1086518/>

Imagen 28.- Resultados prueba rojo de metilo Disponible en:
<http://dianayjulian.galeon.com/bioquimicas.htm>

Fotografías tomadas en el laboratorio no. 1 Planta Alta UMIEZ. FES Zaragoza

Foto 1.- *E.coli* en agar Verde Brillante

Foto 2.- *E.coli* en agar EMB

Foto 3.- *E.coli* en agar MacConkey

Foto 4.- *E.coli* en agar chromID CPS

Foto 5.- *E.coli* en agar chromID ESBL

Foto 6.- *E.coli* tinción de Gram

Foto 7.- LIA *E.coli*

Foto 8.- Citrato de Simmons *E.coli*

Foto 9.- TSI *E.coli*

Foto 10.- Rojo de metilo *E.coli*

Foto 11.- KIA *E.coli*

Foto 12.- SIM *E.coli*

- Foto 13.- SIM *E.coli* (INDOL)
- Foto 14.- Voges Proskauer *E.coli*
- Foto 15.- *K.pneumoniae* en agar Verde Brillante
- Foto 16.- *K.pneumoniae* en agar EMB
- Foto 17.- *K.pneumoniae* en agar MacConkey
- Foto 18.- *K.pneumoniae* en agar chromID ESBL
- Foto 19.- *K.pneumoniae* en agar CPS
- Foto 20.- *K.pneumoniae* tinción de Gram
- Foto 21.- TSI *K.pneumoniae*
- Foto 22.- KIA *K.pneumoniae*
- Foto 23.- LIA *K.pneumoniae*
- Foto 24.- Citrato de Simmons *K.pneumoniae*
- Foto 25.- Rojo de metilo *K.pneumoniae*
- Foto 26.- Voges Proskauer *K.pneumoniae*
- Foto 27.- SIM *K.pneumoniae*
- Foto 28.- SIM *K.pneumoniae* (INDOL)
- Foto 29.- *S.enteritidis* en agar Verde Brillante
- Foto 30.- *S.enteritidis* en agar EMB
- Foto 31.- *S.enteritidis* en agar MacConkey
- Foto 32.- *S.enteritidis* en agar chromID Salmonella elite
- Foto 33.- *S.enteritidis* tinción de Gram
- Foto 34.- *S.enteritidis* KIA
- Foto 35.- *S.enteritidis* TSI
- Foto 36.- *S.enteritidis* LIA
- Foto 37.- *S.enteritidis* citrato de Simmons
- Foto 38.- *S.enteritidis* SIM (INDOL)
- Foto 39.- *S.enteritidis* Voges Proskauer
- Foto 40.- *S.enteritidis* Rojo de metilo

- Foto 41.- *S. enteritidis* SIM
- Foto 42.- *P. vulgaris* en agar Verde Brillante
- Foto 43.- *P. vulgaris* en agar EMB
- Foto 44.- *P. vulgaris* en agar MacConkey
- Foto 45.- *P. vulgaris* en agar chromID CPS
- Foto 46.- *P. vulgaris* en agar chromID ESBL
- Foto 47.- *P. vulgaris* tinción de Gram
- Foto 48.- *P. vulgaris* citrato de Simmons
- Foto 49.- *P. vulgaris* LIA
- Foto 50.- *P. vulgaris* rojo de metilo
- Foto 51.- *P. vulgaris* SIM
- Foto 52.- *P. vulgaris* TSI
- Foto 53.- *P. vulgaris* SIM (INDOL)
- Foto 54.- *P. vulgaris* Voges Proskauer
- Foto 55.- KIA *P. vulgaris*