



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**MANUAL DE BACTERIOLOGIA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ASESOR: M en C. MARIA GUADALUPE AVILÉS  
ROBLES**

**CUAUTILÁN IZCALLI. EDO DE MÉX. 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

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

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

Manual de Bacteriología

Que presenta el pasante: Miguel Angel Silva Sánchez

Con número de cuenta: 300050839 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Junio de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
SECRETARIO	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alma Susana García Barrón	

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

HHA/pm

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM “mi segunda casa” por permitirme ser parte de esta maravillosa Institución y con gran ORGULLO puedo decir “SOY UNIVERSITARIO”, por todo lo que me enseñó y por todo lo aprendido dentro y fuera de sus aulas.

A mi Asesora “*la maestra lupita*” por su paciencia y dedicación, la Maestra Andrea por su tiempo y consejos, a mis sinodales por tomarse el tiempo de revisar y enriquecer este trabajo.

A todos mis compañeros de escuela CCH y Universidad.

A mi Angelito de la guarda q ahora cuida mis sueños desde el cielo†.

A todas aquellas personas que creyeron en mí a lo largo de todo este tiempo y de este camino, pues me dieron las fuerzas necesarias para seguir adelante y a todos aquellos que nunca creyeron en mí “*mil gracias*” por sus críticas porque así puede corregir muchos de mis errores y crecer aún más como persona y como profesionista, gracias por cerrarme las puertas, ya que así tuve la fortuna de encontrar nuevas y mejores oportunidades.

A mi Familia.

A mi Padre:  
Por todo tu apoyo y comprensión,  
Por todos tus sabios consejos,  
Por enseñarme que las cosas  
Que realmente valen la pena  
Hay que dedicarles un gran esfuerzo.

A mi Madre:  
Por estar siempre pendiente de tu hijo  
Por todas aquellas palabras de aliento  
Por estar siempre presente cuando las fuerzas menguaron,  
Gracias por tus consejos y por tu hombro cuando lo necesité.

A mi Hermano y amigo:  
Gracias por ser mi cómplice a lo largo de este sueño  
Gracias por tus consejos y todo el tiempo  
Que dedicaste a escucharme.

Gracias Familia por ser lo que son, gracias por aguantar mi carácter tan peculiar, gracias por enseñarme que aun en las situaciones más adversas se puede sonreír, gracias por ser parte de este logro ya que sin su apoyo y comprensión no hubiera sido posible.

Las palabras sobran cuando los sentimientos hablan.  
Solo me resta decirles **"MIL GRACIAS FAMILIA LOS AMO"**

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	6
REGLAMENTO.....	8
PRESENTACION.....	10
OBJETIVO.....	11
Práctica 1: Género <i>Staphylococcus</i> .....	12
Practica 2: Género <i>Streptococcus</i> .....	20
Practica 3: Género <i>Listeria</i> .....	28
Práctica 4: Bacterias esporuladas.....	37
(Género <i>Clostridium</i> y <i>Bacillus</i> ).....	37
Práctica 5: Género <i>Brucella</i> .....	45
Práctica 6: Género <i>Vibrio</i> .....	53
Practica 7: <i>Haemophilus</i> .....	62
Practica 8 Enterobacterias.....	69
Practica 9: Género <i>Pseudomonas</i> .....	78
APARTADO 1.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	90
HEMEROGRAFIA.....	91

## INTRODUCCIÓN.

*"Un manual presenta sistemas y técnicas específicas. Señala el o los procedimientos a seguir para realizar y homologar el trabajo de todo el personal de oficina o de cualquier otro grupo de trabajo que desempeña responsabilidades específicas. Incluye un procedimiento por escrito significa establecer debidamente un método estándar para ejecutar algún trabajo". (Graham Kellog) <sup>4</sup>*

Los manuales son importantes porque en ellos se explican de manera detallada los procedimientos dentro de una organización; a través de ellos logramos evitar errores que se suelen presentar dentro de las áreas funcionales de la empresa. Estos pueden detectar fallas que se presentan frecuentemente, evitando la duplicidad de funciones. Además son de gran utilidad cuando ingresan nuevas personas a la organización, ya que le explican todo lo relacionado con la misma, desde su reseña histórica, haciendo referencia a su estructura organizacional, hasta explicar los procedimientos y tareas de determinado departamento.

Las características del manual contemplan:

- Contar con instrucciones apropiadas de uso, manejo y conservación
- Facilitar la localización de las orientaciones y disposiciones específicas
- Diagramación de flujo que contenga su verdadero uso.
- Redacción simple corta y comprensible
- Hacer uso racional y adecuado, por parte de los destinatarios
- Gozar de adecuada flexibilidad para cubrir diversas situaciones
- Tener un proceso continuo de revisión y actualización
- Facilitar a través del diseño, su uso, conservación y actualización

Su propósito como tal es el de describir los procesos y las rutinas de trabajo deben ser agrupadas de tal manera que faciliten las consultas sobre el tema deseado para asegurar las orientaciones para ejecutar adecuadamente las actividades en vigor.

La bacteriología es la rama de la Microbiología que estudia las características morfológicas, fisiológicas, taxonómicas y patológicas de las bacterias en el hombre y los animales, queda incluida la cadena epidemiológica (reservorio, mecanismos de transmisión, inmunidad, factores que hacen que existan más o menos defensas contra ellas).

Son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, salvo excepciones viven de forma libre, poseen toda información genética, sistemas generadores de energía y biosintéticos necesarios para su replicación.

Presentan (por lo general) un tamaño entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  (micras) y diversas formas: esferas, barras y hélices.


Las bacterias son procariotas por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas no tienen núcleo ni orgánulos internos.

Para su estudio son divididas en dos grandes grupos bacterias Gram positivas y Gram negativas según sus características tintoriales.

Las bacterias son microorganismos que se pueden observar mediante técnicas de microscopia óptica en preparaciones teñidas o sin teñir (en fresco), con el objetivo de estudiar su estructura y/o morfología; mientras que tanto las exigencias y/o requerimientos metabólicos son revelados a través de la siembra de estos microorganismos en los medios de cultivo: semisólidos, enriquecidos, diferenciales, selectivos, etc. Mientras que las pruebas bioquímicas: primarias, secundarias y especiales, ayudaran a la obtención del biotipo del microorganismo y es así como se puede determinar tanto el género como la especie y sabiendo todo esto se podrá sugerir la terapia a seguir a través de una prueba de sensibilidad a antimicrobianos.



## REGLAMENTO

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
	REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS

- 1) Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
- 2) Para todo trabajo realizado en el laboratorio deberá utilizarse bata blanca con manga larga.
- 3) La tolerancia para el inicio de la sesión de laboratorio será hasta de 10 minutos a partir de la hora señalada.
- 4) Por seguridad, no deben cerrarse las puertas del laboratorio con llave durante las prácticas.
- 5) En todo momento deberá mostrarse una conducta adecuada en el área de trabajo.
- 6) Queda prohibido en los laboratorios:
  - a) Tirar basura fuera del cesto.
  - b) Ingerir alimentos y/o bebidas.
  - c) Fumar.
  - d) Recibir visitas.
  - e) La entrada a los inter-laboratorios a toda persona ajena a los mismos.
  - f) Realizar reuniones o convivios en los laboratorios.
  - g) Salir del laboratorio en el horario asignado para la sesión experimental.
  - h) Sentarse sobre las mesas de trabajo.
  - i) Mover el mobiliario de su lugar.
  - j) Utilizar las gavetas para guardar material que no corresponda a la asignatura.
- 7) Los residuos peligrosos deben depositarse en los contenedores destinados para tal fin, entendiéndose por residuo peligroso: elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representan un riesgo para el ambiente, la salud o los recursos naturales, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas (Art. 3º de la Ley General del Equilibrio y Protección del Ambiente).
- 8) Dentro del laboratorio no se permite el uso de teléfonos celulares, reproductores de sonido o cualquier medio electrónico de entretenimiento. El uso de las computadoras portátiles queda restringido a temáticas relacionadas con la asignatura.
- 9) El acceso al laboratorio se permitirá únicamente cuando esté presente un profesor.
- 10) El uso del laboratorio para trabajo extraordinario, deberá programarse con el profesor responsable en un horario que no interfiera con aquel destinado para el desarrollo de las prácticas.
- 11) Para solicitar material y equipo, es requisito indispensable que el alumno llene debidamente el vale de material (FPE-CB-DEX-01-09) y lo entregue a la persona responsable, dejando como depósito la credencial vigente de la UNAM.

12) El alumno deberá revisar el material y/o equipo al momento de recibirlo indicando cualquier anomalía (faltante o material dañado) y será devuelto en las condiciones en que se recibió, de no hacerlo, se hará acreedor a las sanciones establecidas en cada laboratorio.

13) Es obligación de todos mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo y todo el laboratorio.

Vo.Bo. Comité de Calidad del Departamento de Ciencias Biológicas	
Jefe del Comité de Calidad: Dr. Carlos Gerardo García Tovar	
Jefes de Sección	Responsables de Calidad
QFB Martha Patricia Campos Peón 	QFB Ladislao Palomar Morales 
Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo 	QEl Guadalupe Kozumil Castro 
M. en E. Susana Elvira García Vázquez 	M. en C. Frank Díaz Ayala 
M. en C. Misael Rubén Oliver González 	M. en F. Germán Isauro Garrido Farfán 
M. en C. Juana Ortega Mondragón 	QFB Juana Alicia Alquicira Camacho 

## PRESENTACION

Este manual ofrece una descripción actualizada, concisa y clara de las actividades contenidas en cada proceso de identificación de los principales microorganismos de interés clínico, así como los residuos que de ello se generen y el tratamiento a seguir según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Este manual es un apoyo para que el educando lleve de manera exitosa el desarrollo práctico de la asignatura Bacteriología de la licenciatura en Bioquímica Diagnóstica. Además de ser la herramienta con la que el estudiante reafirmará los conocimientos adquiridos durante la asignatura previa de acuerdo al plan de estudios "microbiología general" del mismo modo contiene los procedimientos más comunes que se ocuparan en la consecuente asignatura "Bacteriología Diagnóstica."

Contiene información detallada sobre los métodos básicos de identificación para cada género de interés clínico que se estudia, así como las características propias a identificar de cada uno, por lo que será de gran utilidad, no solo durante su instrucción universitaria si no que será aplicable dentro de la vida profesional y su desempeño en el área clínica.

Está estructurado en dos partes principales; la primera dirigida a las bacterias Gram positivas y la segunda parte contempla bacterias Gram negativas, a su vez cada una cuenta con una serie de apartados o prácticas en donde se estudia los géneros y las especies de importancia a nivel clínico.

Estas prácticas se han elaborado bajo el siguiente formato:

- **Título:** Se menciona el género que se estudia en la sesión experimental.
- **Marco teórico:** Se describe brevemente las características generales del microorganismo que se estudia así como los rasgos patológicos de interés clínico.
- **Objetivo:** Es la finalidad con la que se realiza la actividad experimental, su aplicación y como es que se lleva a cabo.
- **Materiales, métodos y disposición de residuos:** se enlistan los materiales y reactivos a usar, además de contener un plan de trabajo en donde se mencionan los medios de cultivo en donde se realizara el sembrado de la bacteria así como las pruebas bioquímicas primarias, secundarias y /o especiales que se emplearan durante la sesión experimental.
- **Resultados:** Esta parte consta de una serie de cuadros y espacios en donde el estudiante podrá vaciar los resultados obtenidos en la sesión experimental, ya sea a través de figuras, tablas y/o una descripción física de lo obtenido.
- **Discusión:** Aquí el alumno podrá analizar los resultados obtenidos así como hacer comentarios sobre lo que haya ocurrido durante la sesión experimental.
- **Conclusiones:** Posteriormente el alumno concluirá sobre el objetivo planteado y de acuerdo a los resultados obtenidos.

## OBJETIVO

Aprender y desarrollar las técnicas y los métodos de identificación comúnmente usados, para reconocer los diferentes géneros que se estudian, a través de la siembra en medios de cultivo y de la utilización de pruebas bioquímicas primarias, secundarias y/o especiales.

Objetivos particulares.

1.- Reafirmar los conocimientos adquiridos previamente sobre el fundamento, uso y manejo de los diferentes medios de cultivo, al sembrar cada uno de los géneros a estudiar a lo largo de este manual, para lograr la identificación del mismo.

2.- Aplicar los conocimientos adquiridos en el fundamento, manejo, uso de la técnica de sembrado e interpretación de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y especiales, al aplicarlas a los géneros que se estudiarán a lo largo del manual, con la finalidad de completar la identificación del biotipo.

3.- Aplicar los conocimientos adquiridos en el uso y manejo de los reactivos de lectura para las pruebas bioquímicas al momento de interpretar las mismas y así obtener resultados confiables.

## Práctica 1: Género *Staphylococcus*.

### INTRODUCCION.

El género *Staphylococcus* son bacterias Gram positivas que tienen gran importancia clínica, tanto humana como veterinaria, por que tienen la capacidad de causar gran diversidad de infecciones en el ser humano y en los animales. *S. aureus* es el prototipo del genero, reconocido desde hace decenas de años como un patógeno importante. Sin embargo, recientemente se ha involucrado el grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativa en numerosas infecciones en seres humanos, tanto intrahospitalarias como comunitarias, así como también en animales domésticos y salvajes.<sup>1</sup>

El diámetro de una célula de *Staphylococcus* es de 0.7 a 1.2 µm. Típicamente, los *Staphylococcus* muestran una reacción positiva a la tinción de Gram. Sin embargo, células en cultivos viejos o fagocitadas pueden mostrarse como Gram-negativos.<sup>2</sup>

En el género *Staphylococcus* hay 55 especies y subespecies, siendo las más importantes desde el punto de vista clínico las siguientes:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Staphylococcus saprophyticus*

El microorganismo más importante por su patogenicidad es *Staphylococcus aureus*, se caracteriza por poseer una enzima que coagula el plasma: la coagulasa. Esta prueba permite distinguir a *S. aureus* del resto de especies de estafilococos que aparecen clínicamente, que no poseen dicha enzima.

Los estafilococos de interés en patología humana que no pertenecen a ninguna de las especies anteriores se informan en el laboratorio como estafilococos coagulasa negativos (SCN) y aunque son colonizadores habituales del ser humano no producen enfermedad tan importante como los anteriores.<sup>2</sup>

Las especies de *Staphylococcus* son metabólicamente muy activas, por lo que generalmente no requieren la adición de nutrientes específicos. Su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 35-37°C aunque crecen también a temperatura ambiente. Los *Staphylococcus* son anaerobios facultativos y usualmente son productores de catalasa. El crecimiento de los *Staphylococcus* es rápido y abundante bajo condiciones aeróbicas.

La mayoría de las especies del género *Staphylococcus* son bacterias no fastidiosas crecen relativamente bien en medios de cultivo sencillos como agar sangre, agar nutritivo, agar tripticasa soya y otros. El crecimiento de las colonias de *Staphylococcus* sobre agar nutritivo son opacas, con bordes definidos, circulares, convexos y de 1 a 4 mm en diámetro.

La producción de coagulasa es una prueba esencial en la identificación de especies de *Staphylococcus* patógenos causantes de infecciones agudas, como *S. aureus* (aislada de humanos y animales) *S. intermedius* y *S. hyicus* (aisladas de animales). Se han diseñado dos pruebas de coagulasa con diferencias importantes entre sí. La prueba de coagulasa en tubo o coagulasa libre detecta la producción de la enzima estafilo-coagulasa, una proteína de 64 KDa con actividad proteolítica.<sup>2</sup>

Las colonias son visibles fácilmente, sobre todo en agar sangre, con forma redonda y aplanada, bordes netos, superficie lisa y brillante, consistencia variable y en algunas ocasiones, hemolíticas.<sup>3</sup>

Normalmente están presentes en la nariz y en la piel del 20 al 30 por ciento de los adultos sanos (y menos frecuentemente en la boca, las glándulas mamarias y los aparatos genitourinario, intestinal

y las vías respiratorias altas), los estafilococos no suelen ser perjudiciales. Sin embargo, la rotura de la piel u otra lesión pueden permitir que las bacterias atraviesen las defensas del organismo y causen una infección.

Los individuos propensos a las infecciones estafilocócicas son los recién nacidos, las mujeres en período de lactancia, las personas con enfermedades crónicas (especialmente afecciones pulmonares, diabetes y cáncer), las que presentan afecciones cutáneas e incisiones quirúrgicas y aquellas cuyo sistema inmunológico está inhibido por el uso de corticosteroides, radioterapia, fármacos inmunodepresores o medicaciones anticancerosas. Dos infecciones cutáneas particularmente graves son la necrólisis epidérmica tóxica y el síndrome de la piel escaldada, procesos en que la piel puede desprenderse en grandes superficies.<sup>1</sup>

La resistencia creciente a antibióticos por parte de los estafilococos es reportada desde hace varios años. Más del 95 % de los aislamientos hospitalarios de *Staphylococcus aureus* son resistentes a penicilina y las cepas multirresistentes de ese germen han crecido en importancia.

De igual manera se comporta el estafilococo coagulasa negativo, aunque con el agravante de que se consideran más resistentes aún que *Staphylococcus aureus*.

Se ha visto que cepas de estafilococos que son resistentes a la meticilina, poseen patrones de resistencia que abarcan a varios antibióticos. De hecho la resistencia a la meticilina (o en su efecto oxacilina) es tomada como índice de referencia o marcador de la resistencia a otros antibacterianos. *Staphylococcus aureus*, al igual que *Staphylococcus epidermidis*, resistentes a la meticilina, son considerados como agentes causales de infecciones de importancia epidemiológica y constituyen un problema mayor de salud.<sup>2</sup>

## OBJETIVO

Aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género *Staphylococcus*.

## MATERIAL POR EQUIPO

### Medios de cultivo

- 1 placa de gar sangre
- 1 placa de agar sales y manitol
- 1 placa de agar Muller –Hinton
- 1 placa de agar AST
- 1 placa de agar DNA-asa

### Bioquímicas.

- 2 pruebas de O/F
- 1 prueba de caldo de urea de Stuart
- 1 prueba de nitratos

### Material para tinción de Gram

- 1 portaobjetos
- 1 mechero con base
- Asa bacteriológica
- 1 tubo con 2 ml de SSF estéril
- Tren de tinción de Gram.
- 1 microscopio compuesto
- Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

- $\alpha$ -naftil amina
- Acido sulfanílico
- Zinc en polvo
- Peróxido de hidrógeno 3%
- 10 ml de HCl 1N
- 1 disco de novobiocina 5 $\mu$ g

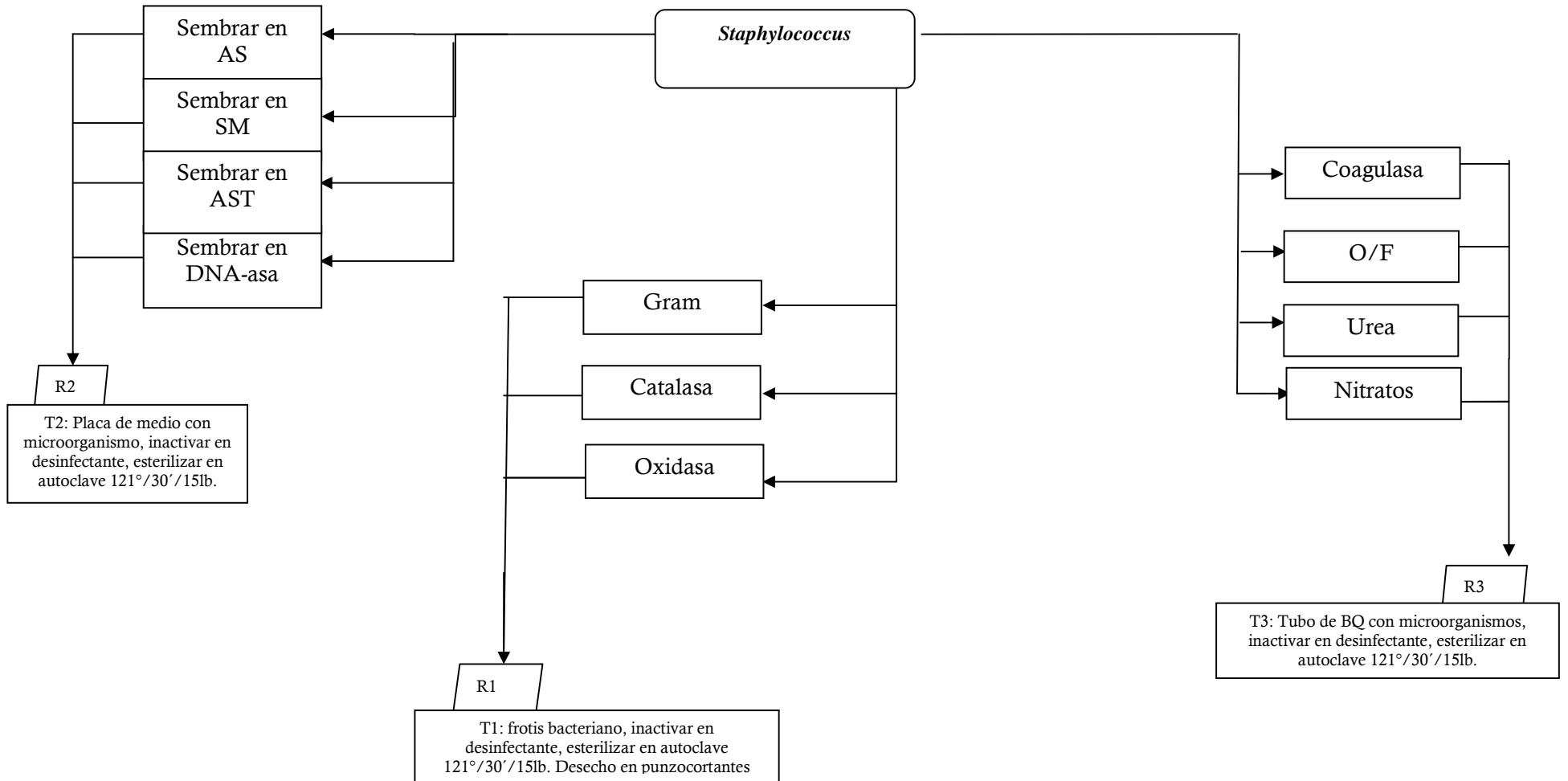
### Otros

- 1 tubo de caldo nutritivo
- 1 tubo con agua estéril
- 1 tubo con tapón de algodón
- 1 pipeta graduada de 1 ml
- Aceite mineral estéril
- Hisopos estériles
- Benzal
- 1 gradilla

### Cepas

- S.aureus
- S.epidermidis
- S.saprophyticus

## MÉTODOS.





## RESULTADOS

### Medios de cultivo

Agar/Resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
AS			
ASM			

### Pruebas bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado		Resultado obtenido		Observaciones
Tinción de GRAM					
Prueba de catalasa					
Prueba de Oxidasa					
Prueba O-F					

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Prueba de coagulasa			
Prueba de urea			
Prueba de nitratos			



## REFERENCIAS

- 1.- Norma Rojas, E. C. (2006). *bacteriología diagnóstica*. costa rica: facultad de microbiología.
- 2.- Dr. Rafael Nodarse, D. L. (2000). *Estafilococos multirresistentes*. La Habana: Instituto Superior de Medician Militar.
- 3.- Martin, A. D. (2009-2010). *fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos cocos gram positivos*. México: Centro de Formación Profesional Instituto Villaverde.
- 4.- Kellog, G. (1962). *Preparación del manual de oficina*. España: Reverte.
- 5.- María de los Angeles Aquihuatl Ramos, M. d. (2004). *Manual de practicas de laboratorio de microbiología general*. México DF: UAM Iztapalapa.

## Practica 2: Género Streptococcus.

### INTRODUCCION.

El género *Streptococcus* incluye un grupo filogenética y fenotípicamente heterogéneo de bacterias que pueden ser frecuentemente encontrados parasitando a humanos y animales. Algunas especies pueden ser patógenas y otras comensales avirulentos forman parte de la flora normal del tracto respiratorio y tracto genital, colonizan además piel y membranas mucosas.

En los esquemas taxonómicos tradicionales la familia *Streptococcaceae* incluye cocos Gram positivos, catalasa-negativos que tienden a crecer en pares o en cadenas, los cuales se diferencian de la familia *Micrococcaceae* (*Staphylococcus* y *Micrococcus*) por ser catalasa positiva. Sin embargo, estudios filogenéticos recientes cuestionan la posición taxonómica real de la familia *Streptococcaceae* y han aumentado considerablemente los géneros y las especies relacionadas a *Streptococcus*.<sup>1</sup>

Las especies del género *Streptococcus* son bacterias anaerobias facultativas esféricas u ovals miden menos de 2 µm de diámetro. Mediante tinción de Gram se pueden observar como cocos de forma esférica, ovoide, diplococos o lanceolada con diámetro de 0.5 a 1 µm. Se pueden encontrar aisladas, en parejas o formando cadenas características (largas en medios líquidos y cortas en medios sólidos), con tendencia a alargarse en los extremos de unión.<sup>2</sup>son bacterias relativamente fastidiosas con requerimientos nutricionales que varían según la especie. La mayoría de las especies crece adecuadamente en medios nutritivos enriquecidos con sangre o suero. Algunas cepas requieren de atmósfera elevada en CO<sub>2</sub> (5-10%), lo cual incrementa el crecimiento y la actividad hemolítica.

Los estreptococos se subdividen en grupos mediante anticuerpos que reconocen a los antígenos de superficie. Estos grupos incluyen una o más especies. Las agrupaciones de estreptococos más importantes son A, B, y D según la clasificación de Lancefield.

Después del crecimiento de estreptococos en agar sangre se observan tres tipos de reacción de hemólisis (alfa, beta, gamma). La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos, produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina). La hemólisis beta produce un halo de hemólisis completamente claro. La hemólisis gama se refiere a la ausencia de hemólisis.<sup>2</sup>

Denominación	Grupo de Lancefield	Hemólisis	Hábitat	Datos de laboratorio de importancia diagnóstica	Enfermedades más frecuentes
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	Beta	Garganta, piel	Inhibición por bacitracina.	Faringitis, piodermitis,
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	Beta	Tracto genital femenino	CAMP positivo, hidrólisis del hipurato	Sepsis y meningitis neonatal
<i>Streptococcus bovis</i>	D	No produce	Colon	Crece en presencia de bilis, hidroliza la esculina, no crece en NaCl al 6,5 % y degrada el almidón	Endocarditis, bacteriemia en cáncer de colon
<i>Streptococcus</i> , grupos C y G	C o G	Beta	Nasofaringe	Resistentes a la bacitracina, sensibles al sulfametoxazol, trimetoprim	Sinusitis, bacteriemia, endocarditis
<i>Streptococcus viridans</i> (grupo integrado por diferentes especies)	Algunas especies poseen sustancia específica de grupo y otras no	Alfa	Garganta, boca, intestino, genital femenino	Resistentes a la optoquina, no solubles en bilis diferentes patrones de fermentación de Carbohidratos (según especie)	Endocarditis, caries dental, ( <i>S. mutans</i> ) abscesos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No poseen sustancia específica de grupo	Alfa	Tracto respiratorio superior	Prueba de hinchazón de la cápsula, lisis por agentes tensoactivos, sensibles a la optoquina	Neumonía, sinusitis, otitis meningitis, endocarditis, artritis séptica

## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género *Streptococcus*.

## MATERIAL POR EQUIPO

### Medios de cultivo

2 placas de AS  
1 placa de ACh

### Bioquímicas.

1 prueba de hipurato de sodio  
1 prueba de bilis-esculina  
1 prueba de NaCl al 6.5%

### Material para tinción de Gram

1 portaobjetos  
1 mechero con base  
Asa bacteriológica  
1 tubo de SSF estéril  
Tren de tinción de Gram.  
1 microscopio compuesto  
Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

Cloruro férrico al 10 %  
Ninhidrina  
Peróxido de hidrogeno al 3%

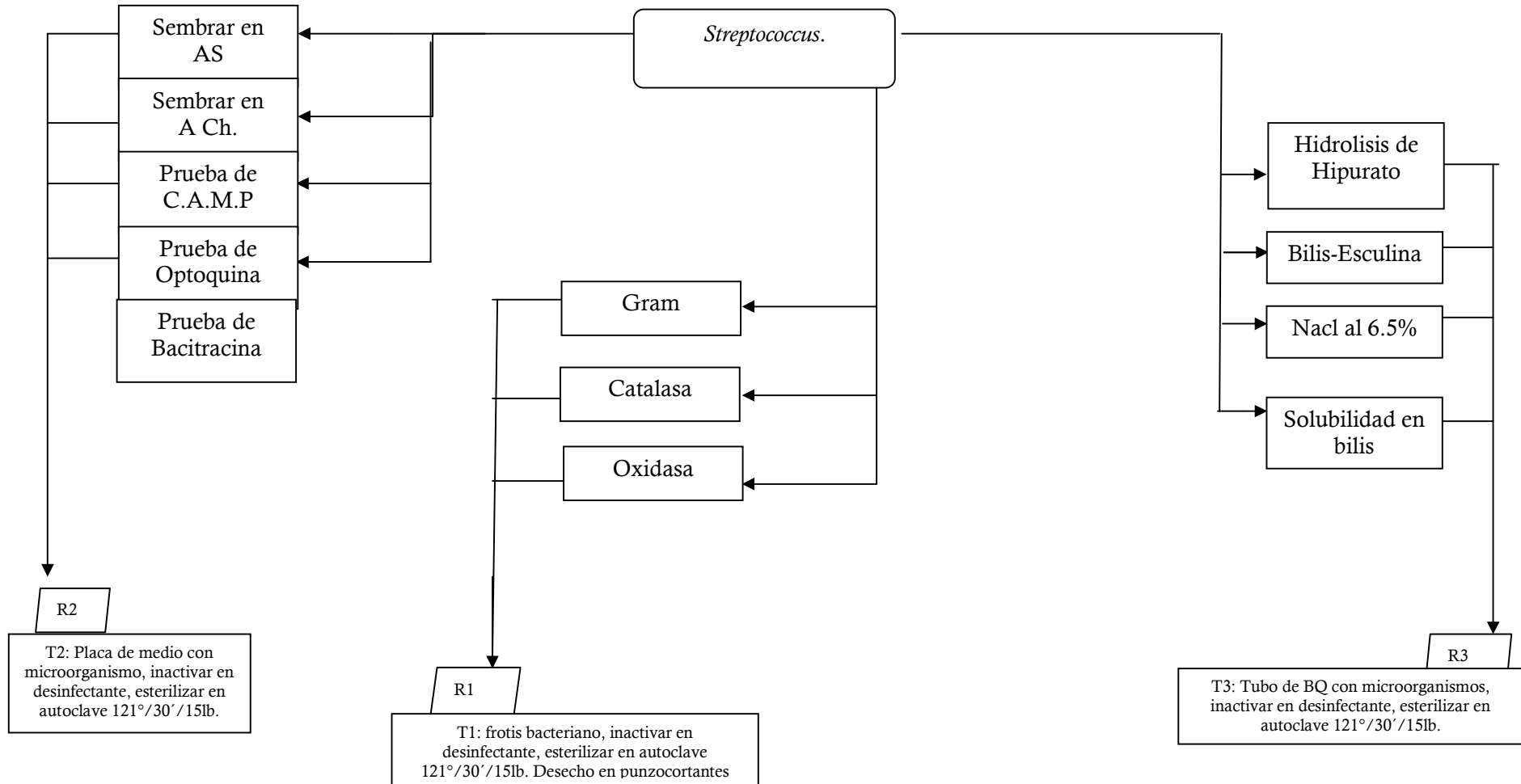
### Otros

1 tubo con 2 ml agua estéril  
Aceite mineral estéril  
Hisopos estériles  
Benzal  
1 gradilla  
1 disco de Optoquina 5µg  
1 disco de bacitracina 0.04 UI

### Cepas

*Streptococcus* grupo A  
*Streptococcus* grupo B  
*Streptococcus* grupo D enterococo  
*Streptococcus* grupo D no enterococo  
*Streptococcus pneumoniae*  
*Staphylococcus* β-lisina

## MÉTODOS.





## RESULTADOS

### Medios de cultivo

Agar/hemólisis	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
AS			
Ach			
C.A.M.P.			
Pba de Optoquina			
Pba de Bacitracina			

## Pruebas bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Tinción Gram			
Prueba de catalasa			
Prueba de oxidasa			
Prueba de hidrólisis de hipurato			
Prueba de bilis esculina			
Crecimiento en NaCl al 6.5 %			



## CONCLUSIONES

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## REFERENCIAS

- 1.- Norma Rojas, E. c. (2006). *bacteriología diagnóstica*. costa rica: facultad de microbiología.
- 2.- Koneman. (2006). *Diagnostico Microbiologico*. Buenos Aires: Panamericana.
- 3.- Janeth, S. G. (2001). *Microbiología "Curso de Microbiología Ambiental"*. México: Universidad del Valle.
- 4.- Murray, P. R. (2010). *Microbiología médica*. Madrid España: Elsevier.
- 5.- Faddin, M. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. buenos Aires: Panamericana.

### Practica 3: Género Listeria

#### INTRODUCCION

Los bacilos Gram-positivos, aerobios y no esporulados son un grupo heterogéneo de bacterias. La detección e identificación de estos microorganismos en el laboratorio puede resultar compleja a pesar de la característica presentación clínica de estas entidades. Otra propiedad de utilidad para la identificación preliminar de la bacteria es su morfología microscópica. Dentro del grupo de bacilos Gram-positivos de forma uniforme figuran *Listeria* y *Erysipelothrix*<sup>2</sup>

El género *Listeria* está compuesto por bacterias Gram positivas relacionado con los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Son bacilos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, no capsulados.

*Listeria* ha sido aislada de diferentes sitios ambientales, como; suelo, agua, efluentes, de una gran variedad de alimentos y de heces humanas y animales. La amplia distribución de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en diferentes medios.

Comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Las dos especies potencialmente patógenas son *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.<sup>1</sup>

Aparecen solos o en cortas cadenas. Las colonias son pequeñas, lisas y de color gris. Las especies del género *Listeria* crecen en un rango de temperatura de 1-45°C, con una temperatura óptima entre 30 y 37°C. Tienen la capacidad de crecer en un rango de pH de 5.5-9.5 y a una concentración de NaCl de hasta 10%. Su metabolismo es anaerobio facultativo. Las especies de *Listeria* presentan un movimiento rotatorio de un extremo a otro a temperatura ambiente (22-25°C), pero no a 37°C debido a que poseen de uno a cinco flagelos dispuestos de forma peritrica que les confieren movilidad. La gran mayoría de los aislamientos son catalasa-positiva y oxidasa-negativa. La clasificación antigénica se basa en la tipificación de los antígenos O y H.<sup>3</sup>

*L. monocytogenes* es un patógeno facultativo intracelular que puede crecer en los macrófagos, las células epiteliales y los fibroblastos en cultivo.

Existen varias formas de presentación clínica de la infección:

Listeriosis feto materna y listeriosis neonatal.

La infección se produce por invasión del feto por vía placentaria y desarrollo de corioamnionitis. Como consecuencia, puede ocurrir el aborto, generalmente a partir de los 5 meses de embarazo, el parto prematuro o el nacimiento a término con infección generalizada del neonato.

Se caracteriza por la presencia de microabscesos piogranulomatosos diseminados en el cuerpo y con alta mortalidad. En la madre, la infección es generalmente asintomática y puede presentarse como un síndrome gripal leve con escalofríos, fatiga, dolor de cabeza, muscular y articular alrededor de 2 a 14 días antes del aborto.

La listeriosis neonatal tardía se observa con menos frecuencia. Generalmente ocurre de 1 a 8 semanas posteriores al parto y se presenta con un síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. La vía de contaminación del neonato es por aspiración de exudados maternos contaminados durante el parto. También se han registrado casos intrahospitalarios en unidades de neonatología por transmisión horizontal a través de instrumental

y las manos del personal de salud. La mortalidad de la listeriosis neonatal tardía es más baja (10 al 20%), pero al igual que la listeriosis temprana, puede dejar secuelas tales como hidrocefalia y retraso psicomotor.

Listeriosis del adulto.

La infección más frecuente en el adulto es la invasión del sistema nervioso central (SNC) (55 al 70% de los casos). Desarrolla generalmente como meningoencefalitis acompañada por cambios severos de la conciencia, desórdenes del movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La mortalidad de la infección del SNC es del 20%, pero puede ser del 40 al 60% si está asociada a una enfermedad de base.

En ciertos grupos de riesgo, como enfermos de cáncer, *L. monocytogenes* es la causa más frecuente de meningitis bacteriana.

Otra forma frecuente de listeriosis es la bacteriemia o sepsis que tiene una alta tasa de mortalidad (hasta el 70%), si está asociada a una enfermedad inmunosupresiva.

*L. monocytogenes* es sensible a penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina, clotrimoxazol y vancomicina. Las fluorquinolonas y las cefalosporinas presentan poca actividad.

Existen hasta el momento 13 serovariedades reconocidas de *L. monocytogenes*; 1/2<sup>a</sup>, 1/2b, 1/2c, 3<sup>a</sup>, 3b, 3c, 4<sup>a</sup>, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7, clasificados en base a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Sin embargo, tres de ellas (1/2<sup>a</sup>, 1/2b y 4b), han sido aisladas en más del 90% de los casos humanos y animales.

Otras serovariedades, como la 1/2c, han sido encontradas como contaminantes de alimentos. Algunas de estas serovariedades son compartidas por *L. innocua* y *L. seeligeri*. *L. innocua* está representada sólo por tres serovariedades y es considerada una variante no patógena de *L. monocytogenes*.

La serotipificación de *L. monocytogenes* es el primer método de subtipificación y permite identificar rápidamente los aislamientos que necesitan ser analizados posteriormente por electroforesis en campo pulsado (PFGE).<sup>1</sup>

## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género *Listeria*

## MATERIAL POR EQUIPO

### Medios de cultivo

1 placa de AS  
1 placa de AST.

### Bioquímicas.

1 prueba de glucosa  
1 prueba de threalosa  
1 prueba de salicim  
1 prueba de KIA  
1 prueba de bilis-esculina  
1 prueba de SIM  
1 prueba de MR-VP  
1 prueba de urea  
2 prueba de O/F

### Material para tinción de Gram

1 portaobjetos  
1 mechero con base  
Asa bacteriológica  
1 tubo de SSF estéril  
Tren de tinción de Gram.  
1 microscopio compuesto  
Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

KOH 40%  
 $\alpha$ -naftol 5%  
Reactivo de Ehrlich  
Discos de oxidasa  
Rojo de metilo  
Peróxido de hidrogeno al 3%

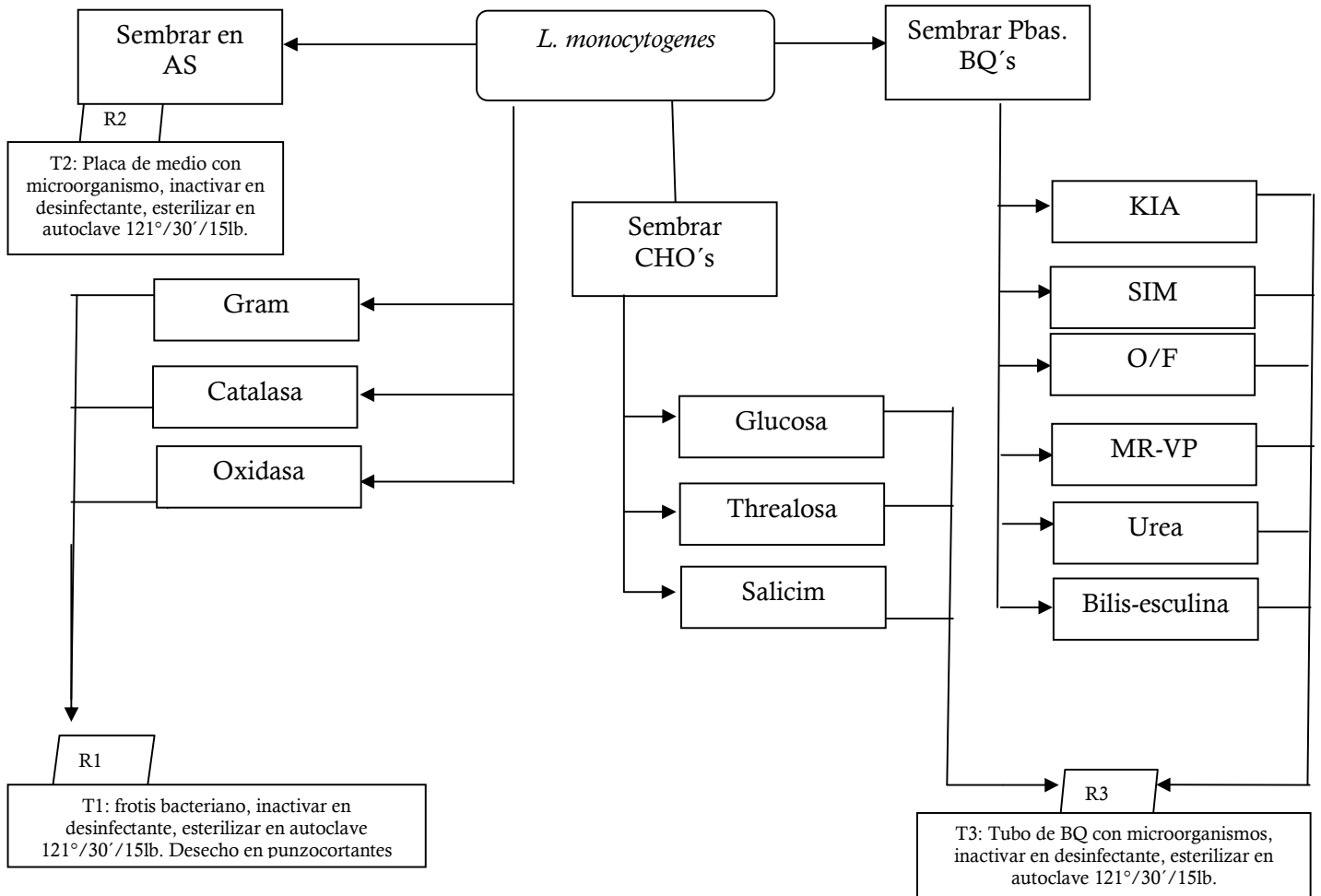
### Otros

1 tubo con 2 ml agua estéril  
Aceite mineral estéril  
Hisopos estériles  
Benzal  
1 gradilla

### Cepas

*Listeria monocytogenes*  
*Staphylococcus*  $\beta$ -lisina

## METODOS.





## RESULTADOS

### Medios de cultivo

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Hemólisis AS			
Prueba CAMP			

### Pruebas bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Tinción de GRAM			
Prueba de catalasa			
Prueba de oxidasa			
KIA			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Producción de H <sub>2</sub> S			
Prueba de indol			
Prueba de motilidad			
Prueba O/F			
Rojo de Metilo			
Voges-Proscauer			
Prueba de urea			
Prueba de bilis-esculina			

## Carbohidratos

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Glucosa			
Threalosa			
Salicim			



## REFERENCIAS

- 1.- Callejo, R. (2008). *Manual de procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de Listeria monocytogenes*. Instituto Nacional de ENfermedades Infecciosas: Centro regional de Referencia del WHO Global Salm Sury para America de sur.
- 2.- Murray, P. R. (2010). *Microbiología médica*. Madrid España: Elsevier.
- 3.- Norma Rojas, E. c. (2006). *bacteriología diagnostica*. costa rica: facultad de microbiología.
4. - Taylor, P. (2008). *Hand bookv of Listeria Monocytogenes*. Dongyou Liu.
- 5.- Zagovalot, K. M. (2005). Determinación de Listeria spp: en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Salud Publica*, Vol. 31, n.3.

## Práctica 4: Bacterias esporuladas (Género *Clostridium* y *Bacillus*)

### INTRODUCCION

Los bacilos Gram positivos formadores de esporas son los *Bacillus* y las especies de *Clostridium*, estos son ubicuos y forman esporas, puede sobrevivir en el ambiente durante muchos años. Las especies *Bacillus* son aeróbicas y los clostridios son anaerobios obligados. De las numerosas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, la mayor parte son no patógenas y no están bien caracterizados en la microbiología médica. Sin embargo, varias especies causan enfermedades importantes en humanos.<sup>1</sup>

El género *Bacillus* está compuesto por más de 40 especies de bacilos gram positivos esporulados, grandes, que crecen mejor en condiciones aerobias. La mayoría de las especies son saprofitas y se encuentran en el suelo, agua, vegetales y aire. La especie de mayor importancia patológica es *B.anthraxis*. La especie que se aísla con mayor frecuencia es *B. cereus*.

El bacilo del ántrax se cultiva en medios nutritivos habituales y aunque es capaz de crecer en condiciones de anaerobiosis, crece mejor y produce esporas en presencia de oxígeno. Las esporas del ántrax son relativamente resistentes al calor y a los desinfectantes químicos. Permanecen viables durante meses en la piel de animales y durante años en tierra seca. Sólo las cepas que producen tanto cápsula como toxina son altamente patológicas. Pueden cultivarse en agar-sangre en atmósfera de CO<sub>2</sub> o en medios con enriquecimiento de suero y bicarbonato.

La capacidad de formar esporas más o menos resistentes al calor se limita, con pocas excepciones, a un grupo de bacilos, la mayoría de los cuales son móviles gracias a flagelos de inserción peritrica. Los bacilos aeróbicos y anaeróbicos facultativos están en el genero *Bacillus* y los anaeróbicos en el genero *Clostridium*.<sup>2</sup>

**Formadores de esporas aeróbicos:** Los formadores de esporas aeróbicos se encuentran en los suelos. Muchos bacilos forman cadenas de células o filamentos. El genero *Bacillus* puede subdividirse en tres grupos atendiendo a la forma de las esporas en la célula madre (Fig. 1.0).

(I) Ovalo cilíndrica no mas ancha que la célula madre. Es la espora de la mayoría de los bacilos (*B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*).

(II) Las esporas ovales son mas anchas que la célula materna; hinchan a esta durante la esporulación (*B. polymyxa*, *B. macerans*, *B.stearothermophilus*, *B. circulans*).

(III) Esporas casi redondas en células hinchadas terminalmente (*B. pasteurii*).

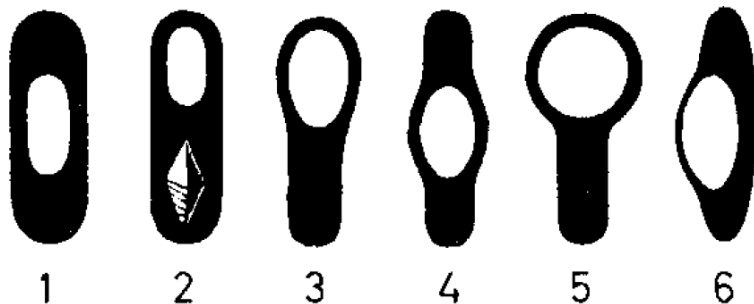


Fig. 1.0 Representación esquemática de las formas típicas de las células formadoras de esporas. 1 Espora central sin deformar al esporangio (*Bacillus megaterium*); 2 Espora terminal sin deformar al esporangio (*Bacillus thuringiensis* con un cuerpo de inclusión proteico); 3 Espora terminal, esporangio deformado en maza (*Bacillus macerans*); 4 Espora central, esporangio deformado en huso = forma de clostridio (*Bacillus polymyxa*); 5 Espora terminal, redonda, esporangio deformado en palillo de tambor = forma de plectridium (*Bacillus sphaericus*); 6 Espora lateral, esporangio deformado en huso (*Bacillus laterosporus*).

**Formadores de esporas anaeróbicos:** Los esporulados anaeróbicos no requieren oxígeno para el crecimiento. Las especies de *Clostridium* no contienen ningún citocromo ni catalasa. Debido al elevado contenido en enzimas flavínicas, muchos clostridios forman peróxido de hidrógeno cuando entran en contacto con el oxígeno del aire que es tóxico para las células.

En los formadores de esporas anaeróbicos la espora es significativamente más ancha que la célula vegetativa. La célula madre presenta distintas formas según la situación de la espora.<sup>3</sup>

Los clostridios son bacilos Gram positivos, largos y pleomórficos. En cultivos de 48 horas muchos de ellos se observan Gram negativos. Todas las especies forman esporas, aunque con variaciones en las condiciones requeridas. Las esporas tienen forma oval o esférica; son, a menudo, más anchas que la célula original, situadas ecuatorial, terminal o subterminalmente. La mayoría de las especies poseen flagelos peritricos y son móviles. Algunos, como *C. perfringens*, son encapsulados.<sup>2</sup>

La mayoría crecen solamente en condiciones de anaerobiosis. La selección de los diversos medios varía con la procedencia y la naturaleza de la muestra. Todos tienen características culturales similares. *C. perfringens* es la más frecuentemente aislada de las especies de clostridios. La identificación de *C. tetani* y *C. botulinum* no se lleva a cabo habitualmente en laboratorios de diagnóstico.<sup>1</sup>

Los clostridios fermentan una gran cantidad de sustratos, (entre ellos polisacáridos, proteínas, aminoácidos y purinas). Por ello, según los grupos de sustratos preferidos puede diferenciarse entre clostridios sacarolíticos (*Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. cellulosa-dissolvens*), pepto-clostridios (*C. histolyticum*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. botulinum*), y clostridios ureolíticos (*C. acidu-urici*).<sup>2</sup>

## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación de las bacterias esporuladas.

## MATERIAL POR EQUIPO

### Medios de cultivo

2 placas de AS  
2 placas de Agar nutritivo.  
1 tubo de cooked-meat

### Bioquímicas

1 prueba de nitratos  
1 prueba de SIM  
1 prueba de MR-VP  
1 prueba de gelatina  
1 prueba de leche tornasol

### Material para tinción de Gram

1 portaobjetos  
1 mechero con base  
Asa bacteriológica  
1 tubo de SSF estéril  
Tren de tinción de Gram  
1 microscopio compuesto  
Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

KOH 40%  
 $\alpha$ -naftol 5%  
 $\alpha$ -naftilamina  
Reactivo de Ehrlich  
Discos de oxidasa  
Rojo de metilo  
Peróxido de hidrogeno al 3%  
Acido sulfanílico  
Zinc en polvo

### Otros

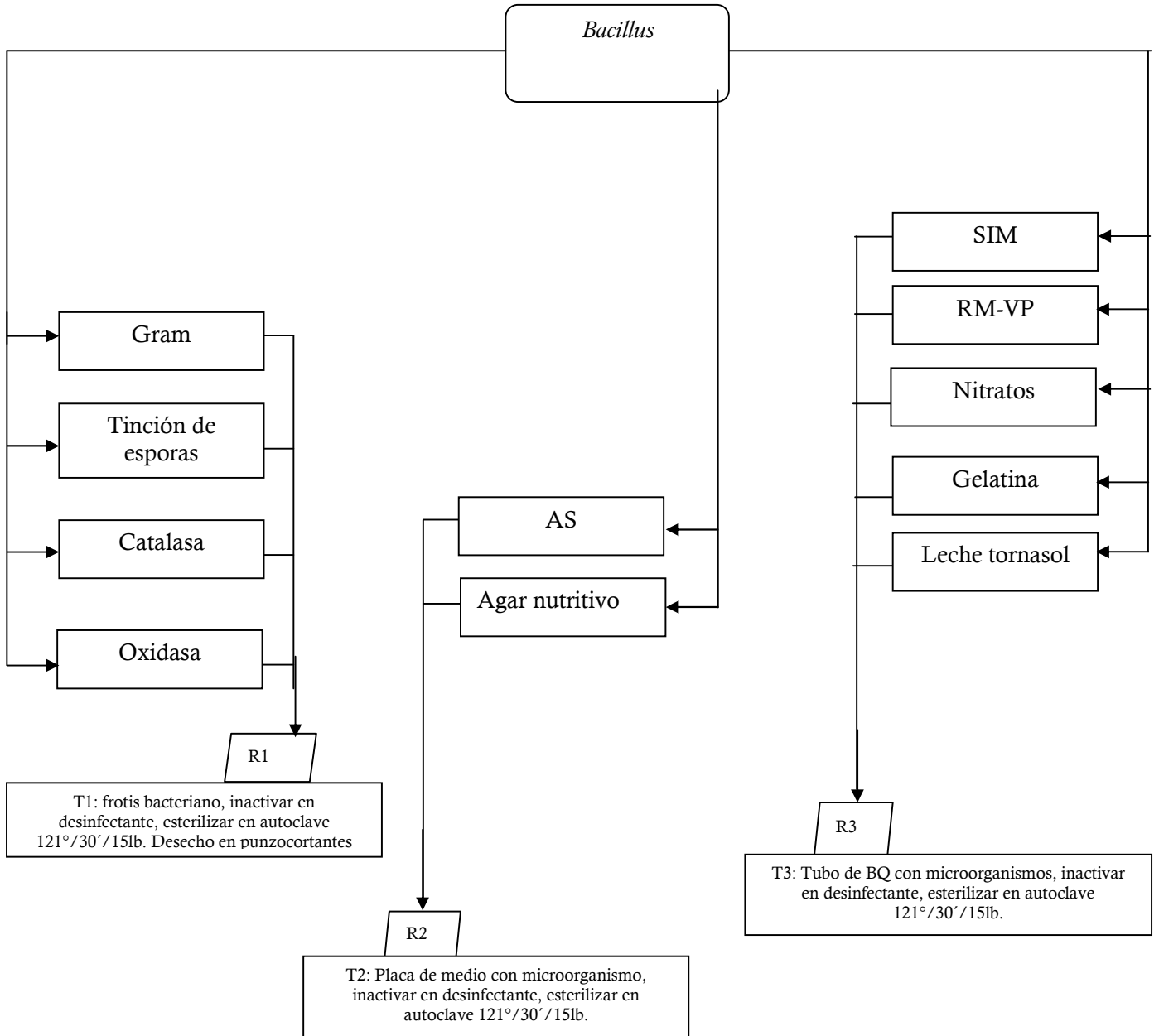
1 tubo con 2 ml agua estéril  
Aceite mineral estéril  
Hisopos estériles  
Benzal  
1 gradilla  
20 ml de verde de malaquita  
1 jarra Gas-pak  
1 Sobre indicador para anaerobiosis

### Cepas

*Bacillus subtilis*  
*Bacillus cereus*



## METODOS



## RESULTADOS

### Medios de cultivo

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
AS			
Agar nutritivo			

### Pruebas bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Tinción de Gram			
Tinción de esporas			
Prueba de catalasa			
Prueba de oxidasa			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Producción de H <sub>2</sub> S			
Prueba de indol			
Prueba de motilidad			
Rojo de Metilo			
Voges-Proscauer			
Prueba de nitratos			
Prueba de gelatina			



## REFERENCIAS

- 1.- Jawetz e, M. (2010). *Manual de Microbiología Médica*. México: El Manual Moderno.
- 2.- Alina Llop Hernández, M. M. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas* (Vol. 1). Ciencias Medicas.
3. - Schaechter, M. (2004). *The Desk Encyclopedia of microbiology*. Elsevier.
4. - Kayser, F. H. (2005). *Medical microbiology*. Zurich: Thieme.
5. - Prescott, L. M. (2002). *Microbiology*. The Mc Graw-Hill.

## Práctica 5: Género Brucella

### INTRODUCCIÓN

El género *brucella* son cocobacilos gram negativos de pequeño tamaño (0.5 x 0.6 a 1.5 $\mu$ m) no encapsulados e inmóviles. El microorganismo crece lentamente en cultivo (requiere una semana o más) y necesita medios de cultivo complejos; es aerobio estricto y el crecimiento de algunas cepas exige la adición de dióxido de carbono; no fermenta hidratos de carbono. Las colonias adoptan morfologías lisas (traslúcidas, homogéneas) y rugosas (opacas, granulares o pegajosas) determinadas por el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular.

*Brucella*, recibe su nombre de Sir David Bruce, investigador que reconoció por primera vez el microorganismo como causa de la «fiebre ondulante» *B. abortus*, aborto (este microorganismo es responsable de los abortos en los animales infectados) *B. melitensis*, relativo a la isla de Malta (Melita), donde Bruce reconoció la primera epidemia *B. suis*, porcino (un patógeno del cerdo) *B. canis*, canino (un patógeno del perro).

En el ser humano, la brucelosis se adquiere mediante contacto directo con el microorganismo (p.ej., exposición en un laboratorio), ingestión (consumo de alimentos contaminados) o inhalación. La posible utilización de *Brucella* como arma biológica, en la que la exposición a esta bacteria tendría lugar por inhalación, supone un motivo de preocupación.

La enfermedad humana se debe por lo general a la infección por *B. melitensis*, fundamentalmente por consumo de leche y otros productos lácteos no pasteurizados contaminados.<sup>1</sup>

Los miembros del género *Brucella*, de la familia *Brucellaceae*, son parásitos intracelulares de mamíferos. Originalmente fueron descritos por *David Bruce*, en 1887, en bazo e hígado de soldados ingleses fallecidos en la Isla de Malta con una enfermedad llamada fiebre ondulante o fiebre de Malta. La fuente de los microorganismos fue establecida en 1904, cuando se aisló a partir de la leche y la orina de cabras enfermas. El segundo aislamiento fue realizado en Dinamarca, por *Bang*, en 1887, a partir de ganado con infección abortiva (enfermedad de Bang); y el tercero se realizó en Estados Unidos, en 1914, a partir de fetos de cerdos de partos prematuros. Aunque se han descrito seis especies (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*), recientes estudios de hibridación del ADN indican que todas son biovariantes de la misma especie *B. melitensis*.

El hábitat más común para estos organismos es el ganado bovino (*B. abortus*), ovejas y cabras (*B. melitensis*), sólo ovejas (*B. ovis*), ganado porcino (*B. suis*), perros (*B. canis*) y las ratas del desierto (*B. neotomae*). Aunque existe un reservorio animal para cada especie, pueden ocurrir superposiciones, por ejemplo, se ha aislado *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* de ganado bovino.

Los microorganismos pueden existir en estos animales sin enfermedad aparente, aunque algunas especies ocasionen grandes pérdidas económicas.

El hombre adquiere la infección a través de la ingestión de leche no pasteurizada o sus derivados, o mediante la manipulación de tejidos de animales infectados.

*Brucella* es parásito obligado de animales y el hombre, y su localización es intracelular característica. Son relativamente inactivas desde el punto de vista metabólico.<sup>2</sup>

En los cultivos jóvenes el aspecto varía desde cocos hasta bacilos de 1.2 micras de longitud, con predominio de formas cocobacilares cortas. Son gramnegativos, pero con frecuencia se tiñen de manera irregular y son aerobios, carecen de motilidad y no forman esporas.

Las brucelas utilizan carbohidratos, pero no producen ácidos y gas en cantidad suficiente para clasificarlas según ese criterio. Las cuatro especies que infectan al ser humano producen catalasa y oxidasa. Muchas cepas producen sulfuro de hidrogeno y reducen los nitratos a nitritos.

Las vías comunes de infección en humanos son el intestino (ingestión de leche contaminada), mucosas (gotas, aerosoles) y piel (contacto con tejidos de animales infectados).

El control se basa en limitar la propagación y en la posible erradicación de la infección en animales, pasteurización de la leche y productos lácteos, y la reducción de riesgos ocupacionales siempre que sea posible.<sup>3</sup>

## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género *Brucella*.

## MATERIAL POR EQUIPO

### Medios de cultivo

- 1 placa de AS
- 1 placa de AS con suero de caballo y glucosa

### Bioquímicas.

- 1 prueba de MR-VP
- 1 prueba de Nitratos
- 1 prueba de Gelatina
- 1 prueba de BHI "inclinado"
- 1 prueba de urea de "Christensen"

### Material para tinción de Gram

- 1 portaobjetos
- 1 mechero con base
- Asa bacteriológica
- 1 tubo de SSF estéril
- Tren de tinción de Gram
- 1 microscopio compuesto
- Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

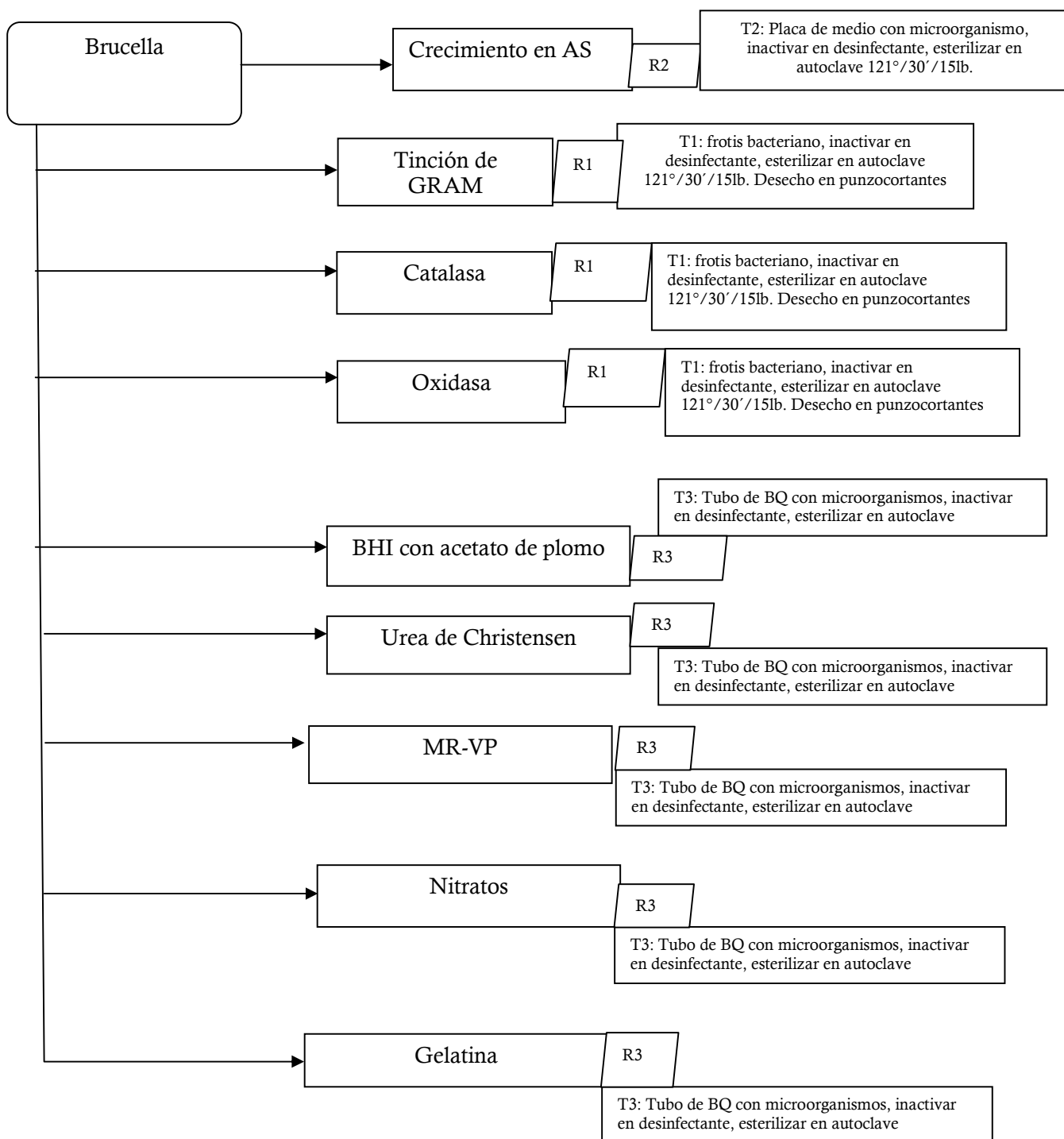
- 1 disco de oxidasa
- Peróxido de Hidrógeno al 3%
- Rojo de metilo
- KOH al 40%
- $\alpha$ -naftilamína
- Acido sulfanílico
- Zinc en polvo

### Otros

- 1 tubo con 2 ml agua estéril
- Aceite mineral estéril
- Hisopos estériles
- Benzal
- 1 gradilla
- 1 tira impregnada con acetato de plomo estéril



## METODOS.



## RESULTADOS

### Medios de cultivo

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
AS			
AS enriquecido			

### Pruebas bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Tinción de GRAM			
Prueba de catalasa			
Prueba de oxidasa			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Rojo de Metilo			
Voges-Proscauer			
Prueba de nitratos			
Prueba de urea de Christensen			
Prueba de gelatina			
BHI/acetato de plomo			



## REFERENCIAS

- 1.- Murray, P. R. (2010). *Microbiología médica*. Madrid España: Elsevier.
- 2.- Alina Llop Hernández, M. M. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas* (Vol. 1). Ciencias Medicas.
- 3.- Jawetz e, M. (2010). *Manual de Microbiología Médica*. México: El Manual Moderno.

## Práctica 6: Genero *Vibrio*

### Introducción.

Los bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa positiva, pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas*, ubicados taxonómicamente en las familias *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae*, respectivamente. Es reconocido el incremento de las infecciones por los microorganismos pertenecientes a los mencionados géneros, como agentes etiológicos de procesos infecciosos en órganos y sistemas vitales para el organismo, comprometiendo en ocasiones la vida del paciente. A pesar de los adelantos en el control de las enfermedades transmisibles, cada día son más frecuentes las infecciones intestinales, extra-intestinales y nosocomiales por las especies de los géneros descritos anteriormente, constituyendo una amenaza grave para la salud de la población mundial, por el amplio espectro de expresiones clínicas que producen (endocarditis, septicemia, bacteriemia, meningoencefalitis, neumonía, peritonitis e infección hepato-biliar, celulitis, etc.)<sup>4</sup>

El género *Vibrio* es uno de los cuatro géneros que conforman la familia *Vibrionaceae*; Sus miembros son habitantes naturales de las aguas y el ambiente marino. Hasta 1960, *V. cholerae* era el único reconocido como patógeno humano. Fue primeramente descrito por Pacini en 1854, que lo encontró en el intestino de un paciente fallecido por el cólera, y en ese momento fue designado como *V. cholerae*. En 1906, Gotschlich, en el Tor, Sinaí, aisló unos microorganismos muy semejantes a *V. cholerae*, pero que diferían de este en su actividad hemolítica, a los cuales llamó *V. eltor*, en la actualidad se considera este microorganismo como una variante de *V. cholerae*. Se reconocen más de 30 especies de *Vibrio*, de las cuales 12 se consideran como patógenas humanas, estas son: *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii* y *V. vulnificus*. Algunas de estas especies se limitan a producir enfermedad intestinal, otras provocan enfermedad extra intestinal, y otras tienen ambas localizaciones.<sup>1</sup>

El género *Vibrio* ha sufrido un gran número de modificaciones a lo largo de los últimos años, y se han descrito o clasificado de nuevo algunas de las especies menos frecuentes. En el momento actual, el género se compone de más de 60 especies de bacilos curvados, de las que 10 ocasionan enfermedad en el ser humano. Las más importantes son *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*.

Las especies de *Vibrio* son bacilos gram negativos curvados de pequeño tamaño (0,5 x 1,5 a 3  $\mu\text{m}$ ). Estos microorganismos no se suelen observar en las muestras de heces ni de heridas teñidas con Gram; no obstante, un observador con experiencia puede ser capaz de detectar, mediante un microscopio de campo oscuro, la presencia de los característicos bacilos móviles en las muestras de heces.

Los microorganismos de *Vibrio* sobreviven con dificultad en un ambiente ácido o seco. Las muestras se deben obtener en la fase inicial del proceso e inocularse rápidamente en los medios de cultivo. Si el cultivo se va a retrasar, la muestra se debe mezclar con el medio de transporte de Cary-Blair y refrigerarse. Los vibrios sobreviven mal en el tampón de glicerol salino, el medio de transporte que se usa para la mayoría de los patógenos entéricos. Los vibrios crecen en la mayor parte de los medios que se usan en los laboratorios clínicos para los coprocultivos, incluyendo el agar sangre y el agar Mac Conkey. Se pueden usar también medios de agar selectivos especiales para vibrios (p. ej., agar de tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa [**TCBS**]), así como caldos enriquecidos (p. ej., medio alcalino enriquecido con agua de peptona; pH 8,6). Las cepas se pueden identificar por medio de pruebas bioquímicas selectivas y se puede establecer el serotipo utilizando antisueros polivalentes.<sup>2</sup>

Las especies de *Vibrio* crecen en presencia o ausencia de oxígeno. Todas estas especies producen la enzima citocromo C oxidasa (excepto la especie *Vibrio metschnikovi*), fermentan la

glucosa y algunos producen gas. El cloruro de sodio estimula el crecimiento y algunas especies son estrictamente halofílicas.

El patógeno más reconocido de la familia Vibrionaceae es *Vibrio cholerae* por la diarrea fatal que puede llegar a producir, otras especies del género *Vibrio*, como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. mimicus* se asocian tanto a infecciones intestinales como a extra intestinales.

El medio de aislamiento primario más recomendado para la recuperación de las especies de *Vibrio* es el agar TCBS. Las placas de agar TCBS se incuban hasta por 48 horas antes de descartarlas. Es importante examinar cuidadosamente el crecimiento y el color de las colonias en las placas de agar TCBS.<sup>6</sup>

El cólera es una enfermedad intestinal y el agente infeccioso es el *Vibrio Cholerae*. Dicho vibrio contiene distintos biotipos y serotipos que activan las epidemias. Los biotipos O1 y El Tor, y los serotipos Inaba y Ogawa son los que más comúnmente se presentan en las epidemias.

Si bien el cólera no es fatal cuando se aplica el tratamiento sintomatológico adecuado, el índice de mortalidad alcanza al cincuenta por ciento cuando la enfermedad no es tratada a tiempo. En algunos casos menores al uno por ciento, se presentan factores de disminución de las defensas que pueden ser letales a pesar del tratamiento sintomático.

Los medios por los que se transmite el cólera son fundamentalmente el agua y alimentos contaminados, pero también se pueden presentar casos de transmisión por contacto. Dado que el reservorio natural del vibrio es el hombre, esta enfermedad es una de las de mayor preocupación en el marco de los controles de la Organización Mundial de la Salud.

Los síntomas del cólera demoran entre uno y cinco días en manifestarse e incluyen diarrea, vómitos, deshidratación, acidosis y problemas de orden circulatorio. La confirmación de la infección se produce a través de pruebas microscópicas realizadas en excretas y/o vómitos del paciente afectado, cuando se detectan los distintos biotipos y/o serotipos del *Vibrio Cholerae*.<sup>8</sup>

## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género *Vibrio*

## MATERIAL POR EQUIPO

### Medios de cultivo

1 placa de AST  
1 placa de TCBS

### Bioquímicas.

1 prueba de KIA  
1 prueba de TSI  
1 prueba de SIM  
2 pruebas de O/F  
1 prueba de citratos  
1 prueba de MR-VP  
1 prueba de MIO  
1 prueba de LIA  
1 prueba de arginina  
1 prueba de gelatina

### Material para tinción de Gram

1 portaobjetos  
1 mechero con base  
Asa bacteriológica  
1 tubo de SSF estéril  
Tren de tinción de gram.  
1 microscopio compuesto  
Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

1 disco de oxidasa  
Peróxido de hidrógeno al 3%  
 $\alpha$  naftol  
KOH al 40%  
Reactivo de Kovac o Erlich

### Otros

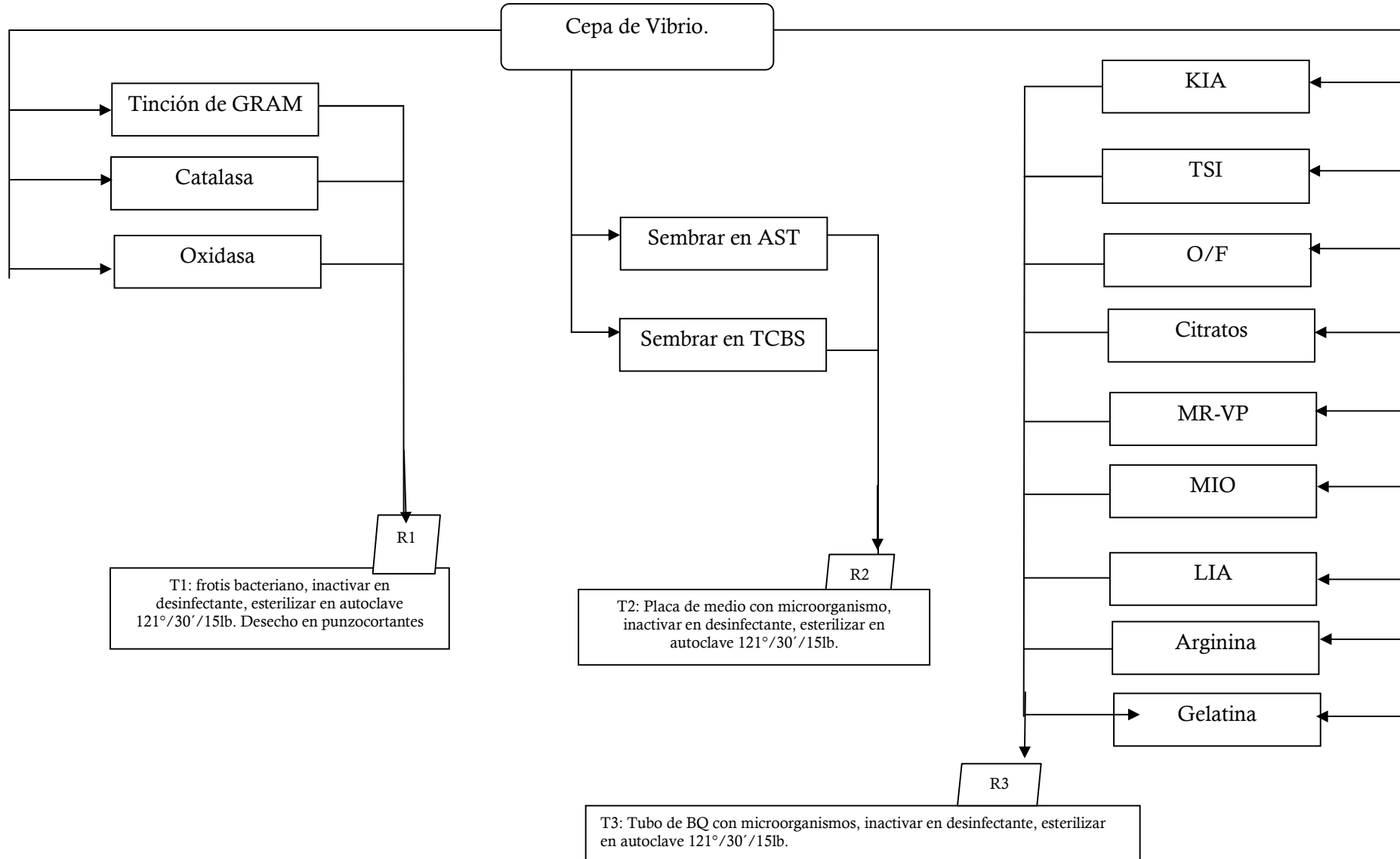
1 tubo con 2 ml agua estéril  
Aceite mineral estéril  
Hisopos estériles  
Benzal  
1 gradilla  
Desoxicolato de sodio al 0.5%

### Cepas

*Vibrio cholerae*



## METODOS



## RESULTADOS

### Medios de Cultivo

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
AST			
TCBS			

### Pruebas Bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Gram			
Prueba de oxidasa			
Prueba de catalasa			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
KIA			
TSI			
Producción de H <sub>2</sub> S			
Prueba de índol			
Motilidad			
Rojo de metilo			
Voges-Proskauer			
Prueba de O/F			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Prueba de citratos			
Prueba de gelatina			
Prueba de lisina			
Prueba de ornitina			
Prueba de arginina			



## REFERENCIAS

- 1.- Alina Llop Hernández, M. M. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas* (Vol. 1). Ciencias Medicas.
- 2.- Murray, P. R. (2010). *Microbiología médica*. Madrid España: Elsevier.
- 3.- Terrago, M. I. (2007). *Manual de Procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de vibrio cholerae*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas: Centro Regional del WHO Global Salm Survy para America del Sur.
- 4.- Rev Chil Infect 2007; 24 (3): 204-208. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros Aeromonas, Vibrio y Plesiomonas procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba Luis E. Cabrera R., Graciela Castro E., M. Margarita Ramírez A., Alina Llop H., Rafael Llanes C., Neisideismy Castañeda E., Anabel Fernández A. y Laura Bravo F.
- 5.- OMS, 2002: *Vibrio cholerae*. En: *Guías para la calidad del agua potable*, 2.ª ed. *Apéndice: Microbiological agents in drinking water*. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud.
- 6.- Norma Rojas, E. c. (2006). *bacteriología diagnostica*. costa rica: facultad de microbiología.
- 7.- Koneman. (2006). *Diagnostico Microbiologico*. Buenos Aires: Panamericana.

## Practica 7: Haemophilus

### INTRODUCCIÓN

El género *Haemophilus* está conformado por varias especies, unas son patógenas humanas y otras forman parte de la flora normal o nativa de la nasofaringe. El término deriva del griego *haemo*: sangre y *philos*: afinidad, amor. Los microorganismos de este grupo son bacterias pleomórficas, gram negativas, pequeñas, que requieren factores de crecimiento proporcionados por la sangre. La especie tipo, *Haemophilus influenzae*, causa diversas enfermedades humanas, que van desde las respiratorias crónicas hasta infecciones invasivas. El *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* incluye el género *Haemophilus* en la sección denominada "Bacilos gram-negativos anaerobios facultativos". El género *Haemophilus* es uno de los tres de la familia *Pasteurellaceae*. Un microorganismo dado es asignado habitualmente a este género sobre la base de sus requerimientos de los factores X o V (o ambos), derivados de la sangre. El factor X (termoestable) es protoporfirina IX en el caso de *H. influenzae* o hemina, en el caso de *H. aegyptius*, ya que este último carece de la enzima ferroquelatasa. Este factor es necesario para la síntesis de enzimas respiratorias que contienen hierro, citocromos, citocromo-oxidasa, catalasa y peroxidasa. El factor V (termolábil) es dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), una coenzima necesaria para las reacciones de oxidación-reducción.

Se conocen 16 especies de *Haemophilus* y tres de ubicación incierta (*incertae sedis*). Las siguientes especies han sido relacionadas con enfermedad en humanos: *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. ducreyi*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. aphrophilus*, *H. segnis*, *H. haemolyticus* y *H. paraphrophilus*.<sup>2</sup>

Características del crecimiento. La identificación de los miembros del grupo depende, en parte, de que se demuestre la necesidad de ciertos factores de crecimiento, llamados X y V. Los organismos que requieren el factor V no crecen bien en agar-sangre de carnero convencional. Esto se atribuye a que ese factor no difunde bien en el medio a partir de los eritrocitos y a que los glóbulos de carnero poseen una NAD-asa que inactiva el factor V disponible. Para utilizar este medio en aislamiento primario, es necesario proporcionar algún otro microorganismo, como, por ejemplo, estafilococo, suministrador de grandes cantidades de factor V, que es excretado al medio. Las colonias alrededor de la estría de estafilococo (o de otros microorganismos como *Neisseria* y *Pseudomonas*, que tienen esa característica) crecen mucho más grandes. A esto se le conoce como *fenómeno del satelitismo*.<sup>2</sup>

Los tres géneros más importantes de la familia *Pasteurellaceae* son *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*. Los miembros de esta familia son bacilos gram-negativos pequeños (0,2 a 0,3 x 1 a 2  $\mu\text{m}$ ) no esporulados inmóviles y aerobios o anaerobios facultativos. La mayoría tiene necesidades de crecimiento exigentes y precisas de medios enriquecidos para su aislamiento. Las especies pertenecientes al género *Haemophilus* constituyen el patógeno humano más frecuente y relevante.

Los *Haemophilus* son bacilos gram negativos pequeños y, en ocasiones, pleomorfos. *Haemophilus influenzae* es la especie que se asocia con mayor frecuencia a enfermedad y las infecciones en pacientes pediátricos eran las más frecuentes con anterioridad a la introducción de la vacuna frente a *H. influenzae* tipo b. *Haemophilus aegyptius* es una causa importante de conjuntivitis aguda purulenta. Desde el punto de vista taxonómico, *H. aegyptius* pertenece a la especie *H. influenzae*, aunque tradicionalmente se ha separado de esta. Para complicar aún más esta clasificación, *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* presenta una relación fenotípica con *H. aegyptius*, si bien difiere de esta especie a nivel taxonómico. El biogrupo *aegyptius* es el agente etiológico de la enfermedad pediátrica fulminante conocida como fiebre purpúrica brasileña. Aunque se aísla con menor frecuencia, *Haemophilus ducreyi* es el agente etiológico bien conocido de la enfermedad de transmisión sexual chancro blanco o chancroide. De acuerdo con los análisis genómicos, *H. ducreyi* pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, pero no al género *Haemophilus*. *H. ducreyi* aparece en esta sección debido a que no se ha clasificado de nuevo en ningún otro género. *Haemophilus aphrophilus* es una causa infrecuente, pero importante, de endocarditis. Los restantes miembros

del género se suelen aislar en las muestras clínicas (p. ej., *Haemophilus parainfluenzae* representa la especie más frecuente en la cavidad bucal), aunque rara vez son patógenos y fundamentalmente originan infecciones oportunistas.

La mayoría de las especies de *Haemophilus* necesita medios complementados con los siguientes factores de crecimiento:

- 1) hemina (también conocido como factor X por factor desconocido).
- 2) nucleótido de nicotinamida y adenina (NAD, también llamado factor V por «vitamina»).
- 3) ambos.

Aunque estos dos factores están presentes en los medios enriquecidos con sangre, el agar sangre de carnero se debe calentar ligeramente con el fin de destruir los inhibidores del factor V. Por este motivo, el agar sangre calentado («chocolate») se usa *in vitro* para el aislamiento de *H. influenzae*.

<b>Especies</b>	<b>Requerimientos X</b>	<b>Requerimientos V</b>	<b>Hemolisis</b>
<i>H. influenzae</i> ( <i>H. aegyptius</i> )	+	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-

3



## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género *Haemophilus*.

## MATERIAL POR EQUIPO

### Medios de cultivo

1 placa de AS  
1 placa de ACh  
1 placa de BHI o AST

### Bioquímicas.

1 prueba de urea de Christensen

### Material para tinción de Gram

1 portaobjetos  
1 mechero con base  
Asa bacteriológica  
1 tubo de SSF estéril  
Tren de tinción de Gram.  
1 microscopio compuesto  
Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

1 disco de oxidasa  
Peróxido de hidrógeno al 3%

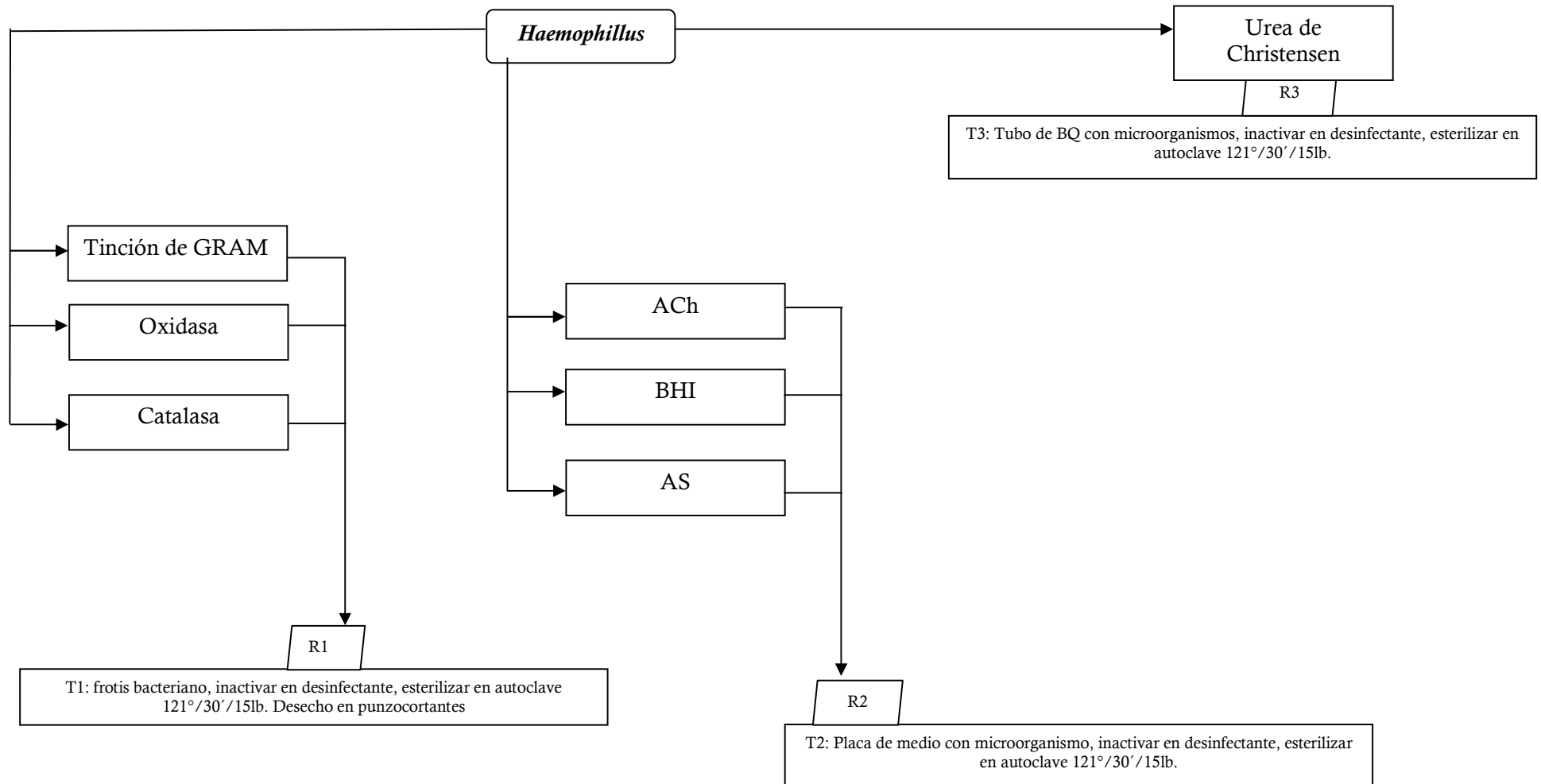
### Otros

1 tubo con 2 ml agua estéril  
Aceite mineral estéril  
Hisopos estériles  
Benzal  
1 gradilla  
Sobre generador de anaerobiosis  
Sobre indicador de anaerobiosis  
1 vela  
1 alka-seltzer

### Cepas

*H.influenzae*

**METODOS.**



## RESULTADOS

### Medios de cultivo

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
AS			
ACh			
BHI			

### Pruebas Bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Tinción de gram			
Prueba de oxidasa			



## CONCLUSIONES

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## REFERENCIAS

- 1 Murray, P. R. (2010). *Microbiología médica*. Madrid España: Elsevier.
- 2.- Alina Llop Hernández, M. M. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas* (Vol. 1). Ciencias Medicas.
- 3.- Jawetz e, M. (2010). *Manual de Microbiología Médica*. México: El Manual Moderno.

## Practica 8 Enterobacterias

### INTRODUCCIÓN.

Las enterobacterias son el grupo más común de los bacilos gram-negativos cultivados en el laboratorio clínico y se encuentran entre las bacterias patógenas más comunes junto con los estafilococos y estreptococos. La taxonomía de las enterobacterias es compleja y ha cambiado con rapidez desde la introducción de técnicas que miden la distancia evolutiva, como hibridación y secuenciación de ADN. Se han definido más de 25 géneros y 110 especies o grupos sin embargo las enterobacterias clínicamente significativas comprenden 20 a 25 especies otras especies aparecen con poca frecuencia. Poseen un contenido de 39 a 59% G-C en el ADN.<sup>1</sup>

Las bacterias que conforman la familia *Enterobacteriaceae* están constituidas por bacilos gram-negativos no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indol fenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hallan ampliamente distribuidos por la naturaleza; muchas de sus especies tienen como hábitat el intestino del hombre y los animales, mientras que otras pueden parasitar a plantas o tener vida saprofítica. Pueden ser móviles por medio de flagelos peritricos, o pueden carecer de estos y ser inmóviles.

Las especies que se encuentran en ella son de las que más frecuentemente se identifican en los laboratorios de microbiología clínica como causa de infecciones tanto comunitarias como nosocomiales.

Entre las infecciones que ocasionan, se señalan: infecciones entéricas o infecciones fuera del tracto intestinal.

Los géneros que conforman esta familia son: *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rhanella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Tatumella*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* y grupos entéricos.

Cada uno de estos grupos está conformado por una o más especies bacterianas con características fenotípicas y genotípicas muy similares, que a su vez están ampliamente distribuidas en la naturaleza, en el agua, en la tierra y en el intestino del hombre y los animales, así como en sus superficies expuestas al medio ambiente.

No todos los géneros y especies que integran esta gran y compleja familia se hallan como frecuente causa de enfermedad; de ellos, alrededor de 25 especies han sido confirmadas como presentes en patología humana.<sup>2</sup>

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal incluido el ser humano. Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, como el 30% al 35% de las sepsis, más del 70% de las infecciones del aparato urinario (IAU) y muchas infecciones intestinales. Algunos microorganismos (p. ej., *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Yersinia pestis*) se asocian siempre a enfermedad, mientras que otros (p. ej., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) forman parte de la microflora comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas. Existe un tercer grupo de enterobacterias: normalmente son microorganismos comensales, pero se pueden convertir en patógenas cuando adquieren genes con factores de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad (p. ej., *E. coli* asociada a gastroenteritis). Las infecciones por enterobacterias se pueden originar de un reservorio animal (p. ej., la mayoría de *Salmonella*, *Yersinia*), de un portador humano (p. ej., *Shigella*, *S. typhi*) o de la diseminación endógena de los microorganismos en un paciente vulnerable (p. ej., *E. coli*) y pueden afectar virtualmente a todas las zonas corporales

La familia *Enterobacteriaceae* tiene requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa-positivos y oxidasa-negativos.<sup>3</sup>

## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género que se estudia.

## MATERIAL

### Medios de cultivo

1 placa de medio AST o BHI  
1 placa de medio MC  
1 placa de medio EMB  
1 placa de medio SB  
1 placa de medio XLD  
1 placa de medio DN-asa  
1 placa de medio VB  
1 placa de medio SS

### Bioquímicas

2 pruebas de O/F  
1 prueba de Nitratos  
1 prueba de SIM  
1 prueba de MR-VP  
1 prueba de citratos  
1 prueba de urea  
1 prueba de malonatos  
1 prueba de medio KIA  
1 prueba de medio MIO  
1 prueba con caldo Arginina  
1 prueba de LIA  
1 prueba de Manitol  
1 prueba de D-xilosa  
1 prueba de Gelatina  
1 prueba de ONPG  
1 prueba de fenilalanina

### Material para tinción de Gram.

1 portaobjetos  
1 tren de tinción de "GRAM"  
Microscopio óptico  
1 tubo con 2 ml de agua estéril.  
Aceite de inmersión

### Reactivos de lectura

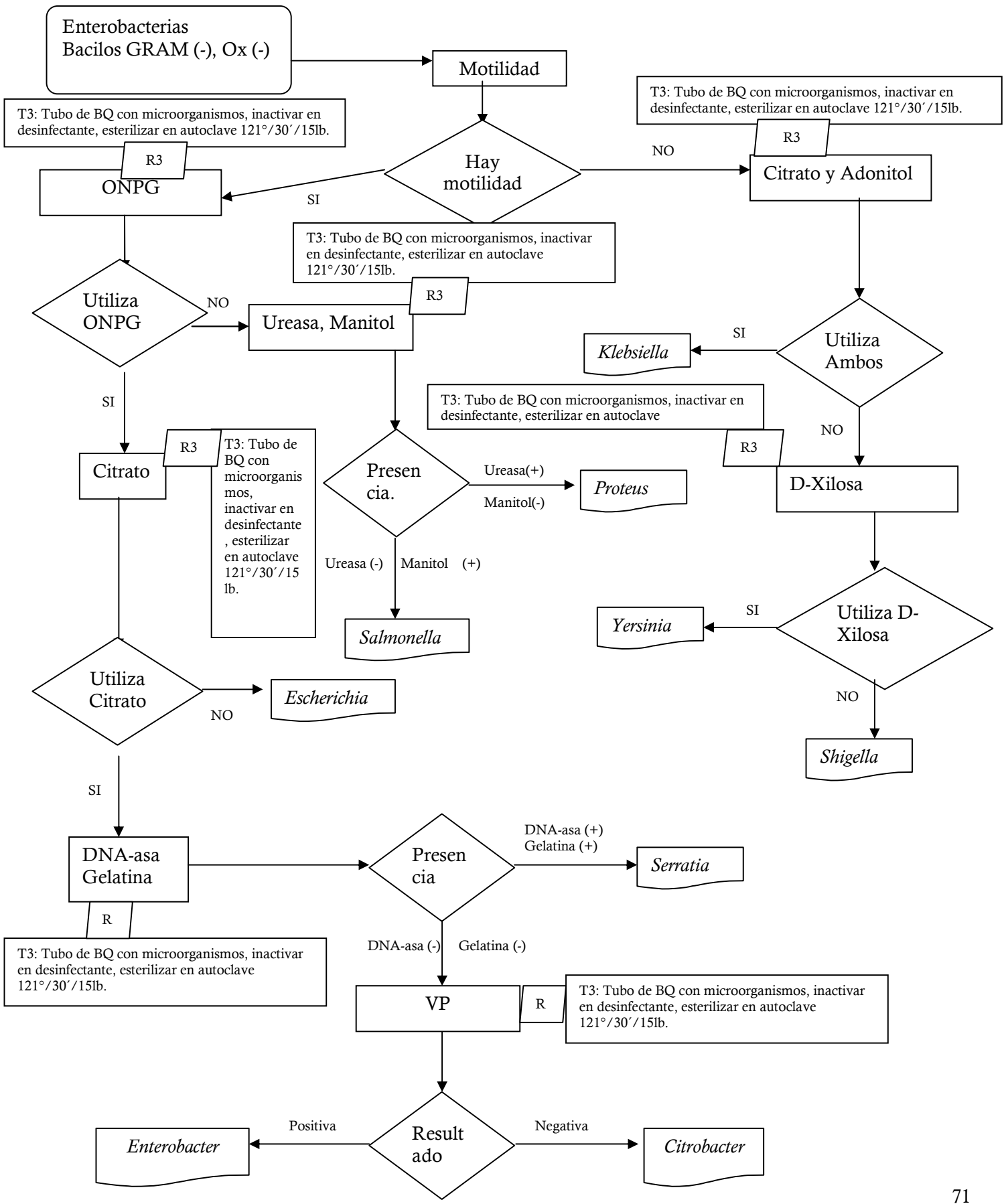
$\alpha$ - naftilamina  
Acido sulfanílico  
Zinc  
Rojo de metilo  
Alfa naftol al 5%  
Hidróxido de sodio al 40%  
Reactivo de Kovac o Erlich  
Peróxido de hidrógeno al 3%

### Otros

Asa bacteriológica  
Gradilla para tubos  
Palillos de madera estériles  
Mechero  
Fenol  
Encendedor  
Hisopos estériles  
Aceite mineral estéril

### Cepas

*Enterobacter aerogenes*  
*Enterobacter cloacae*  
*Escherichia coli*  
*Citrobacter freundii*  
*Proteus vulgaris*  
*Proteus mirabilis*  
*Shigela*  
*Salmonela*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*K. oxytoca*  
*Serratia marcescens*  
*Morganella morganii*





## RESULTADOS

### Medios de Cultivo

Prueba/resultado	Resultado esperado.	Resultado obtenido	Observaciones
AST/BHI			
MC			
EMB			
VB			
SS			
XLD			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
SB			
DNA-asa			

### Pruebas Bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Tinción de gram			
Prueba de oxidasa			
Prueba de catalasa			
KIA			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Prueba de O/F			
Prueba de Nitratos			
Producción de H <sub>2</sub> S			
Prueba de indol			
Motilidad			
Rojo de Metilo			
Voges-Proscauer			
Prueba de citratos			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Prueba de urea			
Prueba de malonatos			
Prueba de ornitina			
Prueba de arginina			
Prueba de lisina			
Prueba de manitol			
Prueba de D-Xilosa			
Prueba de adonitol			





## Practica 9: Género Pseudomonas

### INTRUDUCCIÓN

Se ha generalizado denominar "*pseudomonas*" a todos los bacilos Gram negativos de flagelación polar. De esta forma se hace referencia frecuentemente a eubacterias fisiológicamente tan extremadamente especializadas como *Nitrosomonas*, *Methylomonas*, los tiobacilos y también las bacterias fototrofas (*Rhodospseudomonas*). La palabra en este sentido amplio solo tiene un significado morfológico y no hace referencia a ninguna característica taxonómica. En la familia de las *Pseudomonadaceas* se incluyen los bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, de flagelación polar, incapaces de formar esporas y que crecen aeróbicamente. La ganancia energética tiene lugar por respiración aeróbica, en algunas especies por respiración anaeróbica (desnitrificación, respiración de nitratos), pero no por fermentación. Las *pseudomonas* son quimioorganotrofos, aunque algunos crecen quimiolitotroficamente de forma facultativa.

Desde el punto de vista fisiológico y metabólico las *pseudomonas* se caracterizan por el amplio espectro de sustratos orgánicos utilizables. También utilizan un gran número de compuestos heterocíclicos y aromáticos, que no son atacados por otras bacterias. Los azúcares se degradan generalmente por la vía de Entner-Duodoroff.

Algunas especies de *Pseudomonas* oxidan los azúcares de forma incompleta y excretan los ácidos correspondientes (gluconato, 2-oxogluconato). Debido a su falta de requerimientos las *pseudomonas* se encuentran en todas partes: tanto en suelos como en aguas, aguas residuales o en el aire.

Si un medio de cultivo con sales minerales y ácidos orgánicos o azúcares queda expuesto al aire, por lo general las *pseudomonas* son los primeros colonizadores. Frecuentemente se reconocen por la formación de pigmentos hidrosolubles, como la pioquina, derivado azul verdoso de la fenazina, y pigmentos amarillo verdosos fluorescentes. Algunos de los pigmentos fluorescentes liberados tienen función de sideroforos.

Especies de *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* (antes *P. pyocvanea*) es una bacteria acuática, puede atacar también al hombre como oportunista y desencadenar inflamaciones del oído medio, infecciones de heridas con formación de un pus azul verdoso y en los individuos debilitados puede provocar incluso bacteriemias. *P. fluorescens* y *P. putida* son bacterias de aguas y suelos ampliamente distribuidas, que pueden oxidar un número insólitamente alto de sustancias orgánicas distintas. Muchas de las cepas patógenas de vegetales se reunieron hace poco en una especie, *P. syringae*. En *P. saccharophila*, una bacteria del hidrógeno, se descubrió la vía de Entner-Duodoroff de la degradación de la glucosa.<sup>1</sup>

Las especies de éstos géneros pueden encontrarse ampliamente distribuidos en el ambiente; suelos, agua y formando parte de la flora normal de animales y del hombre. Debido a su habilidad de sobrevivir en ambientes húmedos y de poseer una resistencia innata a los antibióticos, este patógeno es particularmente importante en infecciones intrahospitalarias. Como son agentes patógenos oportunistas, pueden producir infecciones serias en pacientes con compromiso inmunológico; convirtiéndose así en agentes importantes de infecciones nosocomiales. La virulencia de éstos agentes radica en su capacidad de colonizar varios sitios anatómicos humanos, la propiedad para invadir tejidos y producir daño tisular. Además de la tendencia característica de invadir torrente sanguíneo.<sup>2</sup>

Una gran variedad de especies habitan en el suelo y las aguas estancadas, algunas forman parte de la flora residente del intestino de varias especies de animales y del hombre. Son de vida libre, se encuentran en materiales orgánicos en descomposición y tienen un importante papel en la degradación de dicho material.<sup>3</sup>

*Pseudomonas aeruginosa* es el patógeno más importante dentro del género *Pseudomonas*, teniendo en cuenta la cantidad y tipos de infecciones (invasivas y tóxicas) que produce, así como la morbilidad y mortalidad que ocasiona.

En este organismo es inherente la resistencia a la mayoría de los antibióticos, se considera un importante patógeno en la infección intrahospitalaria, reportándose por encima del 20 % de esas infecciones.

*Pseudomonas aeruginosa* es un aerobio obligado, que crece con facilidad en los medios de cultivos y produce, en ocasiones, un olor dulzón, o de uvas. Se desarrolla a temperatura entre 10 y 42 0C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35° a 37°C. Algunas cepas producen hemólisis. Las mismas emiten pigmentos de “fenazina” en agar nutritivo, después de 24 horas de incubación a 37°C y posteriormente a temperatura ambiente; los mismos pueden ser azul (piocianina), amarillo verdoso (pioverdina), rojo (piorrubina) y negro (piomelanina).

Existe, aproximadamente, un 10 % de *Pseudomonas aeruginosa* que son apigmentadas. Los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* pueden mostrar varios tipos de colonias: lisas, rugosas, mucoides, redondas, alargadas, con pigmentos verde metálico y olor dulzón, presentan, además, características bioquímicas enzimáticas y de susceptibilidad antimicrobiana diferentes.

*Pseudomonas aeruginosa* crece bien a temperaturas oscilantes entre 37° y 42°C. El crecimiento a 42°C con formación de velo en medio líquido, ayuda a distinguirla de otras especies. Produce ácidos de una serie de carbohidratos, pero no de disacáridos en medio OF de Hugh-Leifson, y pigmentos en agar nutritivo, sobre todo en medio de King A y King B. La mayoría crece en medios mínimos, sin factores orgánicos de crecimiento, usando los iones amonio como única fuente de nitrógeno y la glucosa como única fuente de carbono y energía. Su metabolismo es estrictamente aerobio.<sup>3</sup>



## OBJETIVO

Desarrollar y aprender los métodos y técnicas más comúnmente empleados a través de las pruebas bioquímicas primarias secundarias y/o especiales así como la siembra en los diversos medios de cultivo para la identificación del género *Pseudomonas*.

## MATERIAL

### Medios de cultivo

- 1 placa de medio AST.
- 1 placa de medio Mac Conkey.
- 1 placa de medio Cetrimida
- 1 placa de medio F
- 1 placa de medio P

### Bioquímicas

- 1 prueba de MR-VP.
- 2 pruebas de O/F.
- 1 prueba de KIA.
- 1 prueba de Nitratos con campana "Durham"
- 1 prueba de citratos.
- 1 prueba de urea.
- 1 prueba de malonatos.
- 1 prueba de KIA.
- 1 prueba de LIA.
- 1 prueba de arginina.
- 1 prueba de gelatina.
- 1 prueba de MIO.
- 1 prueba de SIM.
- 1 prueba de fenilalanina.

### Reactivos de lectura

- $\alpha$  -naftilamina
- Acido sulfanílico
- Zinc
- Reactivo de Kóvac o Erlich
- Discos para prueba de oxidasa
- Peróxido de hidrógeno al 3 %

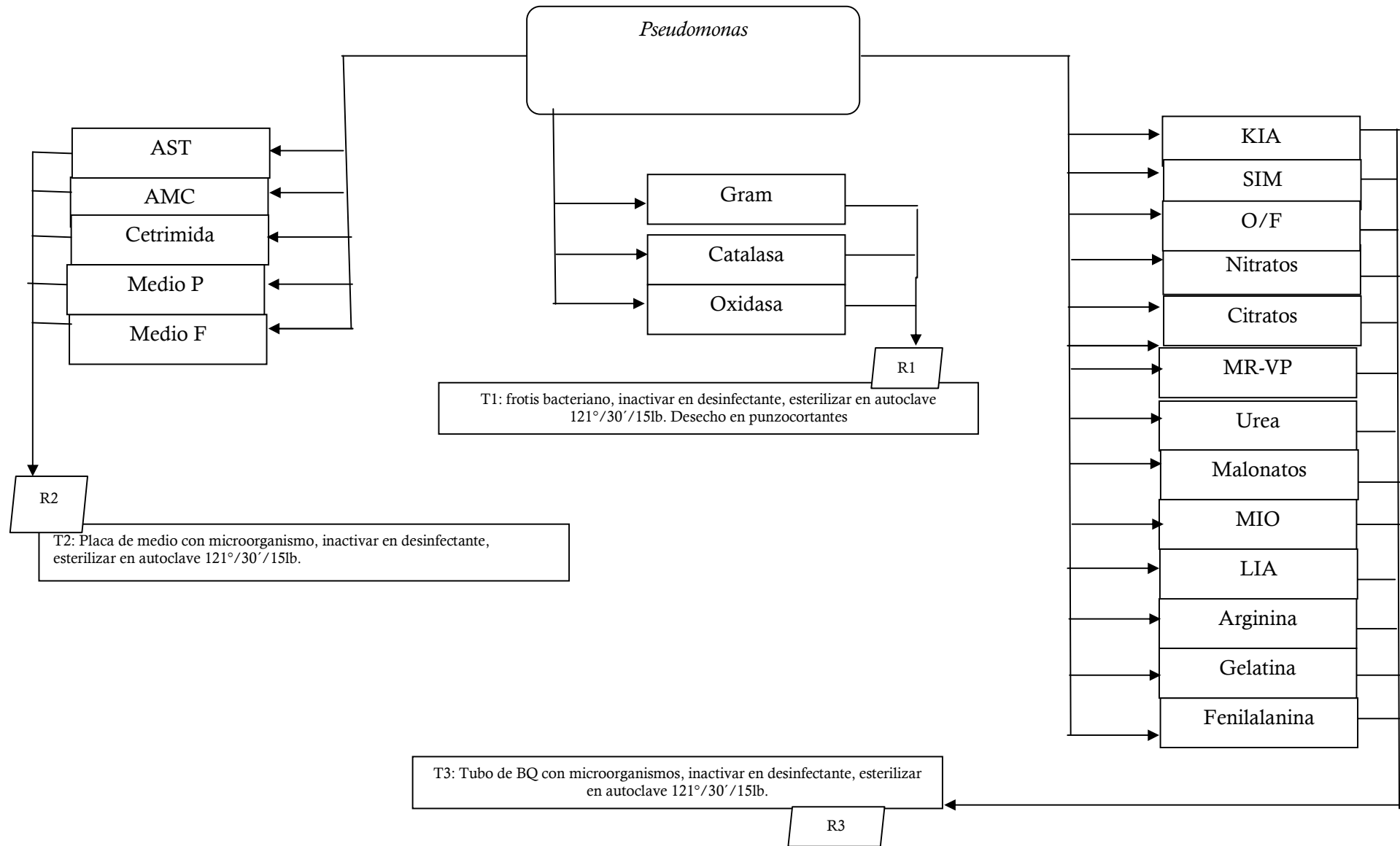
### Otros

- Asa bacteriológica
- Gradilla para tubos
- Palillos de madera estériles
- Mechero
- Fenol
- Encendedor
- Hisopos estériles
- Aceite mineral estéril

### Material para tinción de Gram.

- 1 portaobjetos
- 1 tren de tinción de Gram
- Microscopio óptico
- 1 tubo con 2 ml de agua estéril.
- Aceite de inmersión

**METODOS.**



## RESULTADOS

### Medios de Cultivo

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
AST			
Cetrimida			
Mac Conkey			
Medio P			
Medio F			

## Pruebas Bioquímicas

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Tinción de Gram			
Prueba de oxidasa			
Prueba de catalasa			
KIA			
Prueba de motilidad			
Prueba de indol			
Producción de H <sub>2</sub> S			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Prueba de O/F			
Prueba de citratos			
Prueba de Nitratos			
Prueba de rojo de metilo			
Prueba de Voges-Proscauer			
Prueba de urea			
Prueba de malonatos			
Prueba de MIO			

Prueba/resultado	Resultado esperado	Resultado obtenido	Observaciones
Prueba de LIA			
Prueba de arginina			
Prueba de gelatina			
Prueba de fenilalanina			



## REFERENCIAS

1. - Schlegel, H. G. (1997). *Microbiología general*. Barcelona: Omega.
- 2.- Norma Rojas, E. c. (2006). *bacteriología diagnóstica*. costa rica: facultad de microbiología.
- 3.- Alina Llop Hernández, M. M. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas* (Vol. 1). Ciencias Medicas.
- 4.- Murray, P. R. (2010). *Microbiología médica*. Madrid España: Elsevier.



## APARTADO 1

### TRATAMIENTO DE RESIDUOS SEGÚN LA NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

Protección Ambiental - Salud Ambiental - Residuos Peligrosos  
 Biológico-Infeciosos - Clasificación y Especificaciones de Manejo

#### ¿Cómo deberán ser envasados los RPBI?

Una vez que los residuos han sido clasificados o separados según sus características, deben ser envasados como se muestra en la tabla siguiente.

¿Cómo deberán ser envasados los RPBI?				
CLASIFICACIÓN	Estado Físico	Envasado	Tipo de envase	Color
<b>Sangre</b>	Líquido	Recipientes Herméticos		rojo
<b>Cultivos y cepas de agentes infecciosos</b>	Sólidos	Bolsas de polietileno		rojo
<b>Patológicos</b>	Sólidos Líquidos	Bolsas de polietileno Recipientes herméticos		amarillo
<b>Residuos no anatómicos</b>	Sólidos Líquidos	Bolsas de polietileno Recipientes herméticos		rojo
<b>Objetos punzocortantes</b>	Sólidos	Recipientes rígidos de polipropileno		rojo

Durante el envasado, los RPBI no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos.

RESIDUO	DESCRIPCION	CLASIFIACION	TRATAMIENTO
1	PORTAOBJETOS CON TINCION DE GRAM Y MO.	PUNZOCORTANTE	ESTERILIZACION 121°/30'/15b
2	PLACA DE MEDIO DE CULTIVO	CULTIVOS Y CEPAS DE AGENTES INFECCIOSOS	ESTERILIZACION 121°/30'/15b
3	TUBOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS	RESIDUOS NO ANATOMICOS	ESTERILIZACION 121°/30'/15b
4	PALILLOS DE MADERA CON MO.	RESIDUOS NO ANATOMICOS	ESTERILIZACION 121°/30'/15b

## BIBLIOGRAFIA.

- Alina Llop Hernández, M. M. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas* (Vol. 1). Ciencias Medicas.
- Callejo, R. (2008). *Manual de procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de Listeria monocytogenes*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas: Centro regional de Referencia del WHO Global Salm Sury para America de sur.
- Diaz, G. A. (2009-2010). Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. *Laboratorio de Diagnostico Clínico 2° Curso*.
- Dr. Rafael Nodarse, D. L. (2000). *Estafilococos multirresistentes*. La Habana: Instituto Superior de Medicin Militar.
- Faddin, M. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clinica*. buenos Aires: Panamericana.
- Janeth, S. G. (2001). *Microbiología "Curso de Microbiología Ambiental"*. México: Universidad del Valle,.
- Jawetz e, M. (2010). *Manual de Microbiología Médica*. México: El Manual Moderno.
- Kayser, F. H. (2005). *Medical microbiology*. Zurich: Thieme.
- Kellog, G. (1962). *Preparación del manual de oficina*. España: Reverte.
- Koneman. (1983). *Diagnostico Microbiologico*. Buenos Aires: Panamericana.
- María de los Angeles Aquihuatl Ramos, M. d. (2004). *Manual de practicas de laboratorio de microbiologia general*. México DF: UAM Iztapalapa.
- Martin, A. D. (2009-2010). *fundamentos y tecnicas de analisis microbiologicos cocos gram positivos*. México: Centro de Formación Profesional Instituto Villaverde.
- Murray, P. R. (2010). *Microbiología médica*. Madrid España: Elsevier.
- Norma Rojas, E. c. (2006). *bacteriologia diagnostica*. costa rica: facultad de microbiologia.
- Prescott, L. M. (2002). *Microbiology*. The Mc Graw-Hill.
- Schaechter, M. (2004). *The Desk Encyclopedia of microbiology*. Elsevier.
- Schlegel, H. G. (1997). *Microbiología general*. Barcelona: Omega.
- Taylor, P. (2008). *Hand book pf Listeria Monocytogenes*. Dongyou Liu.
- Terrago, M. I. (2007). *Manual de Procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de vibrio cholerae*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas: Centro Regional del WHO Global Salm Sury para America del Sur.
- Zaborosch, H. G. (1997). *Microbiología General*. Barcelona: Omega.
- Zagovalot, K. M. (2005). Determinación de Listeria spp: en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Salud Publica*, Vol. 31, n.3.

## HEMEROGRAFIA.

Kely Martino Zagovalov, Tamara et al. Determinación de *Listeria* spp: en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Rev. Cubana Salud Pública* [online]. 2005, Vol.31, n.3

Manual de Procedimientos Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio cholerae* 2007. María Inés Caffer. Raquel Terragno. Sol González Fraga. María Rosa Viñas. Mariana Pichel. Norma Binsztein. Departamento Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur

OMS, 2002: *Vibrio cholerae*. En: *Guías para la calidad del agua potable*, 2.ª ed. *Apéndice: Microbiological agents in drinking water*. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud.

Rev Chil Infect 2007; 24 (3): 204-208. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba Luis E. Cabrera R., Graciela Castro E., M. Margarita Ramírez A., Alina Llop H., Rafael Llanes C., Neisideismy Castañeda E., Anabel Fernández A. y Laura Bravo F.