

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**PROPUESTA DE GUÍA DE APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE
MICROBIOLOGÍA (BACTERIAS Y HONGOS) PARA SER UTILIZADO EN
MICROBIOLOGÍA GENERAL.**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
HEYDI ARACELY BENAVIDES MARTINEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

OCTUBRE DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. María Isabel Rodríguez

Secretaria general

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

Decano

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

Coordinadora General

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesor de área de Microbiología:

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

Asesor de área de Alimentos:

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Docente Director

MSc. María del Carmen de Medrano

INDICE

Resumen.	
I INTRODUCCION.	xv
II OBJETIVOS.	17
2.1 Objetivo General.	18
2.2 Objetivos Específicos.	18
III MARCO TEORICO.	19
3.1 Morfología celular.	20
3.1.1 Tamaño morfología y disposición de las celulas bacterianas.	21
3.1.2 Tamaño y morfología de hongos (mohos y levaduras).	28
3.2 Técnicas de tinción en bacterias y hongos.	31
3.3 Exámen de muestras al microscopio.	34
3.3.1 Descripción del microscopio óptico de campo claro.	37
3.4 Cultivo y proliferación de microorganismos para su identificación.	38
3.5 Ensayos bioquímicos API.	40
3.6 Pruebas bioquímicas.	42
3.7 Métodos rápidos PETRIFILM®.	44

IV DISEÑO METODOLÓGICO.	46
4.1 Tipo de Estudio: Teórico y prospectivo.	47
4.2 Investigación Bibliográfica.	47
4.3 Investigación de campo.	48
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	50
VI PROPUESTA DE GUIA EN LA APLICACIÓN DE TECNICAS DE MICROBIOLOGIA (BACTERIAS Y HONGOS) PARA SER UTILIZADA EN MICROBIOLOGIA GENERAL.	58
VII CONCLUSIONES.	209
VIII RECOMENDACIONES.	212
BIBLIOGRAFÍA.	
GLOSARIO.	
ANEXOS.	

INDICE DE TABLAS

Tabla N°

1.	Beneficios comparativos de PETRIFILM®.	45
2.	Número de estudiantes inscritos año lectivo 2006.	49
3.	Sexo de los encuestados.	51
4.	Porcentaje de técnicas microbiológicas más utilizadas por los encuestados.	52
5.	Bibliografía más consultada por los estudiantes de diversas carreras en el estudio de la microbiología.	53
6.	Porcentaje de estudiantes que han utilizado una guía práctica en el estudio de la microbiología.	54
7.	Opiniones de los encuestados con respecto al contenido de una guía práctica sobre microorganismos.	55
8.	Lectura API Staph.	122
9.	Composición química de reactivos para API Strep.	123
10.	Lectura API 20 Strep.	128
11.	Reacciones bioquímicas de Enterobacterias.	136
12.	NMP para diferentes resultados positivos y negativos cuando se utilizan cinco porciones de 10 ml.	144
13.	NMP cuando se utilizan cinco porciones de 10 ml, cinco porciones de 1 ml y cinco porciones de 0.1 ml.	147
14.	Lectura API 20 E.	153
15.	Lectura API 20 NE.	156

INDICE DE FIGURAS

Figura N°

1. Forma elipsoidal o esférica denominados cocos.	22
2. Bacteria cilíndrica o en forma de barra, bastoncillo denominado bacilo .	23
3. Bastoncillo curvado helicoidal, denominado espirilo.	23
4. Filamento axial y microfotografía de una espiroqueta.	25
5. Fimbrias, esta célula de <i>E. coli</i> aparece erizada de fimbrias comunes.	26
6. Estructura y componentes de la pared celular	28
7. Aspecto colonial de una levadura (Rhodotorula) en Agar Papa dextrosa.	30
8. Aspecto colonial de <i>Trichoderma viridae</i> , un mohó en Agar Papa dextrosa.	31
9. <i>Candida albicans</i> en un exámen al fresco.	35
10. <i>Cryptococcus neoformans</i> en una tinción con tinta china.	36
11. Morfologías microscópicas de bacterias Gram (+) y de Gram (-).	37
12. Microscopio óptico de campo claro.	38
13. Cepas ATCC de <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> en galerías de API 20E.	42
14. Conocimiento de técnicas microbiológicas por sexo.	51
15. Nivel de conocimiento de los estudiantes sobre las técnicas microbiológicas.	52

16. Tipo de bibliografía consultada por los estudiantes en el estudio de la microbiología.	53
17. Porcentaje de la población que ha utilizado una guía práctica en el estudio de la microbiología.	54
18. Opiniones de los estudiantes acerca del contenido de la guía microbiológica.	55
19. Tinción de Gram de <i>E. coli</i> .	72
20. Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> .	72
21. Morfologías fúngicas.	77
22. Morfología de <i>Aspergillus sp.</i>	78
23. Morfología de <i>Aspergillus flavus</i> .	78
24. Morfología de <i>Penicillium sp.</i>	78
25. Mechero bunsen y asa bacteriológica.	84
26. Fluorocult LMX positivo para indol (centro) con el reactivo de Kovacs.	95
27. Catalasa visible por las burbujas que se presentan en test de la izquierda.	114
28. Prueba de la coagulasa positiva. (tubo izquierdo).	115
29. <i>Staphylococcus aureus</i> positivo colonias color violeta.	116
30. Producción del indol, reacción positiva (tubo izquierdo).	130
31. <i>Listeria monocytogenes</i> en Agar Movilidad.	133
32. Prueba Voges Proskauer positivo (tubo izquierda) y negativo (tubo de derecho).	134

33. Prueba de la ureasa positiva (tubo izquierdo) negativa (tubos restantes).	135
34. Bacterias coliformes en Placa PETRIFILM [®] .	138
35. Bacterias Acido lácticas en placas PETRIFILM [®] .	140
36. <i>Escherichia coli</i> en placa PETRIFILM [®] .	141
37. Enterobacterias en placa PETRIFILM [®] .	143
38. Preparación de frotis bacteriano.	160
39. Tinción simple de bacterias.	161
40. Tinción de Gram.	162
41. Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> .	163
42. Tinción de Gram de <i>Streptococcus</i> .	163
43. <i>Streptococcus pyogenes</i> .	164
44. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	164
45. <i>Streptococcus agalactiae</i> .	165
46. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	165
47. <i>Staphylococcus aureus</i> .	166
48. <i>Staphylococcus aureus</i> .	166
49. <i>Propionibacterium acnes</i> .	167
50. <i>Nocardia sp.</i>	-
51. <i>Mobiluncus sp.</i>	168
52. <i>Listeria monocytogenes</i> .	168
53. <i>Lactobacillus sp.</i>	169

54. <i>Enterococcus faecalis</i> .	169
55. <i>Corynebacterium diphtheriae</i> .	170
56. <i>Clostridium botulinum</i> .	170
57. <i>Clostridium tetani</i> .	171
58. <i>Clostridium perfringens</i> .	171
59. <i>Bacillus anthracis</i> .	172
60. <i>Bacillus subtilis</i> .	172
61. <i>Streptococcus oralis</i> .	173
62. <i>Micrococcus sp.</i>	173
63. <i>Acinetobacter sp.</i>	174
64. <i>E. coli</i> .	174
65. <i>Haemophilus sp.</i>	174
66. <i>Fusobacterium sp.</i>	175
67. <i>Salmonella thypi</i> .	175
68. <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	176
69. <i>Aeromonas hydrophyla</i> .	176
70. <i>Vibrio cholerae</i>	177
71. <i>Filtración por membrana</i> .	178
72. Técnica de la estría cruzada en placa de Petri.	-
73. Técnica de dilución y cuenta en placa.	180
74. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .	181
75. Inoculación del sistema API Staph.	182

76. Inoculación del sistema API Strep.	183
77. Determinación de coliformes totales y fecales por el método del NMP.	184
78. Identificación de <i>E. coli</i> y bacterias coliformes.	185
79. Inoculación del sistema API 20 E.	186
80. Inoculación del sistema API 20 NE.	187
81. <i>Bacillus cereus</i> en Agar Plate Count.	188
82. <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Baird Parker.	188
83. <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Cerebro Corazón.	189
84. <i>Streptococcus pyogenes</i> en Agar Sangre.	189
85. <i>Bacillus cereus</i> en Agar Sangre.	190
86. <i>Salmonella</i> en Agar nutritivo.	190
87. <i>Escherichia coli</i> en Agar EMB.	191
88. <i>E. coli</i> y <i>Proteus</i> en Agar MacConkey.	191
89. <i>Alcaligenes</i> en Agar MacConkey.	192
90. <i>Enterobacter</i> en Agar MacConkey.	192
91. <i>Escherichia coli</i> en Agar EMB.	193
92. <i>Flavobacterium</i> en Agar Sangre.	193
93. <i>Klebsiella pneumoniae</i> en Agar MacConkey.	194
94. <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Movilidad.	-
95. <i>Pseudomona aeruginosa</i> en medio Cetrimide.	195
96. <i>Salmonella</i> en Agar MacConkey.	195
97. <i>Shigella</i> en Agar X.L.D.	196

98. <i>Yersinia enterocolitica</i> en Agar MacConkey.	196
99. Técnica de identificación microscópica para hongos (mohos y levaduras).	197
100. Cultivo y descripción morfológica macroscópica de mohos.	198
101. Tinción de <i>Fusarium solani</i> .	199
102. Tinción de <i>Blastomyces dermatiditis</i> .	200
103. Tinción de <i>Candida albicans</i> .	200
104. Tinción de <i>Exophiala werneckii</i> .	201
105. Tinción de <i>Histoplasma capsulatum</i> .	201
106. <i>Aspergillus niger</i> .	202
107. <i>Basidiomicetes</i> .	202
108. <i>Blastomyces dermatiditis</i> .	203
109. <i>Candida albicans</i> .	203
110. <i>Cephalotrichium sp.</i>	204
111. <i>Cladosporum sp.</i>	204
112. <i>Exophiala sp.</i>	205
113. <i>Aspergillus niger</i> en Agar PDA.	206
114. <i>Alternaria sp.</i> En Agar PDA.	206
115. <i>Aspergillus niger</i> en Agar Papa Dextrosa.	207
116. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Agar Papa Dextrosa.	207
117. <i>Alternaria sp</i> en Agar Czapek Dox.	208

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Encuesta.
2. Interpretación de resultados API Staph.
3. Interpretación de resultados API Strep.
4. Interpretación de resultados API 20 E.
5. Interpretación de resultados API 20 NE.
6. Hoja de resultados API 20 E.
7. Hoja de resultados API 20 NE.
8. Hoja de resultados API Staph.
9. Hoja de resultados API Strep.

RESUMEN

La presente investigación se desarrollo reuniendo técnicas de identificación y aislamiento de bacterias y hongos de más uso en el estudio de microbiología general. Así como aquellas técnicas de importancia actual como las bioquímicas estandarizadas API y PETRIFILM. Esto se realizó con el objetivo de servir como un apoyo bibliográfico para ser utilizado por estudiantes en las carreras relacionadas con la salud en la Universidad de El Salvador. Se realizó una encuesta dirigida a estudiantes que han cursado la cátedra de microbiología general, las preguntas que se les realizaron fueron sobre el conocimiento y manejo de las técnicas microbiológicas; cuyos resultados sustentan la necesidad de la elaboración de un documento que reúna todas estas técnicas. Por lo que se presenta una colección de procedimientos para la identificación, manipulación, proliferación y aislamiento de bacterias y hongos, en forma de una guía. Se concluye que este trabajo servirá como un recurso disponible para los estudiantes y profesionales de la Universidad de El Salvador u otra persona interesada en la materia, por lo que se recomienda que la guía sea utilizada como un apoyo didáctico de fácil consulta para cualquier nivel de estudio de la microbiología general.

I. INTRODUCCION

La microbiología es una rama de la biología, de las más estudiadas debido a su importancia en el campo de la salud pública. Existe una extensa gama de análisis o técnicas básicas para su estudio, que se encuentran dispersas en diversas fuentes muchas veces poco comprensibles. Es por eso que se vuelve necesario, plasmar toda esta información en forma de un consolidado, que recopile el conjunto de técnicas básicas tales como: tinciones bacterianas y fúngicas, identificación y aislamiento de bacterias y hongos, preparación y tipo de medios de cultivo, pruebas bioquímicas IMVIC, así como las innovadoras técnicas estandarizadas API y PETRIFILM^{MTM}. Todo lo anterior se elaboró en el presente trabajo con el fin de suplir las necesidades existentes en la población estudiantil y profesional en la Universidad de El Salvador, en la obtención de recursos didácticos de microbiología general. Debido a esto se realizó una encuesta de opinión a cierto número de estudiantes que actualmente cursan carreras aplicadas a diversas áreas de la Salud y que en cierto nivel cursan la asignatura de Microbiología General. Las preguntas formuladas fueron relacionadas con el grado de conocimiento que poseen los estudiantes sobre el manejo de las técnicas microbiológicas básicas, este diagnóstico se realizó para corroborar la necesidad de la elaboración del presente manual, que se empleará para ser consultado y como un apoyo didáctico para estudiantes, profesionales y personas interesadas en la materia.

II OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer una guía de aplicación de técnicas de microbiología (bacterias y hongos) para ser utilizado en microbiología general.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Determinar por medio de encuesta(s) los conocimientos básicos de microbiología general de estudiantes de la Universidad de El Salvador.

2.2.2 Describir técnicas de identificación, manipulación, proliferación, y aislamiento de bacterias y hongos, métodos tradicionales e innovadores (pruebas API, pruebas rápidas).

2.2.3 Recopilar imágenes morfológicas de microorganismos (bacterias y hongos) comúnmente utilizados.

2.2.4 Reunir técnicas de preparación y uso de los medios de cultivo nutritivo, selectivo y diferenciales más útiles y adecuados para la investigación microbiológica.

2.2.5 Esquematizar métodos microbiológicos oficiales, basados normativas nacionales e internacionales.

III MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

La microbiología es una ciencia reciente con respecto a otras ramas de la Biología. El estudio de los microorganismos se inició a partir de la invención del microscopio en 1670, y con los estudios de Louis Pasteur en 1876, se logro el mayor desarrollo y reconocimiento de los microorganismos como responsables de una diversidad de procesos, que en la actualidad son de mucha importancia en la salud publica en especial en las áreas de alimentos, medicamentos y cosméticos, para ahondar en cada una de estas ramas o especialidades de la microbiología es necesario primero conocer las nociones fundamentales de esta ciencia; por lo cual se presentan a continuación las bases en el estudio de la Microbiología general que serán de utilidad para la comprensión del contenido de la guía microbiológica de técnicas básicas de microbiología presentada, con énfasis en la definición de conceptos microbiológicos de bacterias y hongos así como de sus técnicas en la identificación y aislamiento de los mismos.

3.1 Morfología Celular.

En base a su estructura todas las células vivas pueden dividirse en dos grupos las procariontas y las eucariotas; en el mundo microbiano la mayoría de bacterias son procariontas, los otros microbios celulares son eucariotas como los hongos (levaduras y mohos), protozoos y algas verdaderas.

La principal diferencia entre eucariotas y procariontas reside en la estructura de las paredes celulares, de las membranas y los organelos. En las células

procariotas el material genético no está encerrado dentro de una membrana especial, además sus organelos carecen de membranas, casi siempre sus paredes celulares contienen péptido glucano y suelen dividirse por fisión binaria (proceso en que se copia el DNA y la célula se divide en dos).

Las células eucarióticas (del griego Eukarion, núcleo verdadero) poseen estructuras de DNA llamadas cromosomas, las que se encuentran en un núcleo celular envueltas en la membrana nuclear, además las células eucariotas presentan un aparato mitótico (varias estructuras celulares que participan en un tipo de división nuclear llamada mitosis) además de otros organelos como mitocondrias, retículo endoplásmico y a veces cloroplastos. Se revisan a continuación las características de bacterias (células procarióticas) y hongos (células eucarióticas).

3.1.1 Tamaño, morfología y disposición de las células bacterianas ⁽⁴⁾

Los millares de especies bacterianas se diferencian por muchos factores, entre los que se cuentan la morfología, la composición química (a menudo detectada por reacciones de tinción), los requerimientos nutricionales y las actividades bioquímicas. Se da una gran variedad de tamaños y morfologías entre las bacterias, la mayoría de ellas oscilan entre 0,2 y 2,0 μm de diámetro y presentan una de las tres morfologías básicas siguientes: la esférica o de coco (que significa «baya»), la de bastoncillo o bacilo y la espiral.

Los cocos (Fig. 1) pueden ser esféricos, ovalados, alargados o con un lado aplanado, cuando los cocos se dividen para reproducirse pueden

permanecer unidos unos a otros. Los que permanecen unidos en parejas tras dividirse se llaman diplococos, aquellos que se dividen en dos planos y forman grupos de cuatro se conocen como tétradas, los que se dividen por tres planos y quedan divididos en grupos de ocho se llaman sarcinas y aquellos que se dividen siguiendo planos al azar y forman racimos como los de uva o anchas laminas son estafilococos (Fig. 1). Estas agrupaciones son frecuentemente útiles para la identificación de algunos cocos.

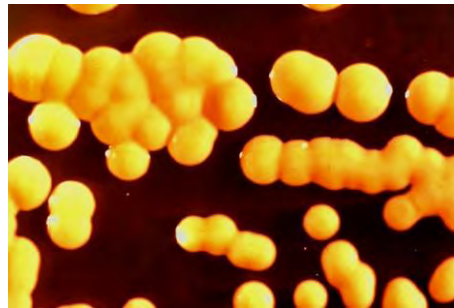


Fig. N° 1: forma elipsoidal o esférica denominados cocos (5).

Los bacilos se dividen solamente a través de su eje mas corto, de forma que hay menos agrupamientos de bacilos que de cocos, los diplobacilos aparecen en parejas tras la división y los estreptobacilos se presentan en cadenas (Fig. 2).

El termino bacilo tiene dos significados en microbiología, usado como hasta ahora se refiere a la morfología bacteriana, pero puede ser también el origen de un nombre genérico, por ejemplo, la bacteria ***Bacillus anthracis*** es el agente etiológico del carbunco.



Fig. N° 2: Bacteria cilíndrica o en forma de barra, bastoncillo o filamento denominado bacilos (5).

Las bacterias espirales pueden tener una o mas vueltas, nunca aparecen rectas, los espirilos, poseen una morfología helicoidal característica, que recuerda un sacacorchos con un cuerpo celular rígido, hay otro grupo de bacterias espirales llamadas espiroquetas se mueven por medio de un filamento axial, parecido a un flagelo pero se encuentra dentro de una vaina externa flexible que rodea la bacteria (Fig. 3).

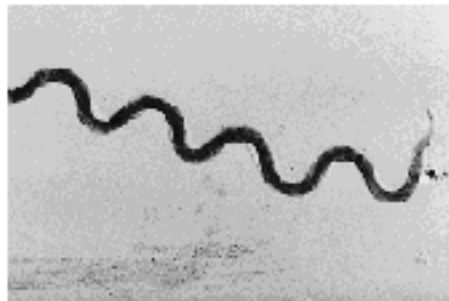


Figura N° 3: Bastoncillo curvado, helicoidal, denominado espirilo (5).

La morfología de una bacteria viene determinada por la herencia. Sin embargo, ciertas condiciones ambientales pueden alterar esa morfología y cuando esto ocurre la identificación se hace aún más difícil. Además algunas

bacterias, como *Rhizobium* y *Corynebacterium*, son genéticamente pleomórficas, lo que significa que pueden presentar muchas morfologías.

Las bacterias procarióticas poseen estructuras características que se describen a continuación.

Estructuras externas a la pared celular:

GLUCOCALIX

Es un polímero gelatinoso compuesto de polisacáridos, de polipéptidos o de ambos. Su complejidad química varía ampliamente entre las distintas especies bacterianas. El material del glucocalix es viscoso y en su mayoría se forma en el interior de la célula para ser excretado a la superficie. Si esta sustancia está organizada y firmemente unida a la pared celular el glucocalix se denomina cápsula. La presencia de glucocalix en las bacterias puede protegerlas de la fagocitosis y favorecer algunas patologías en el hombre tal es el caso de *Streptococcus pneumoniae*.

FLAGELOS

Son largos apéndices filamentosos que impulsan a la bacteria, se presentan en células bacterianas en cuatro disposiciones diferentes: monótricos (un solo flagelo), anfítricos (un solo flagelo en cada extremo de la célula) y peritricos (flagelos distribuidos en toda la superficie celular). Estos organelos le sirven principalmente a las bacterias para moverse y al microbiólogo muchas veces para poder identificarlos (Fig. 5).

FILAMENTOS AXIALES

Las espiroquetas son un grupo de bacterias que poseen una estructura y movilidad exclusivas. Una de las espiroquetas mejor conocidas es *Treponema pallidum*, el agente etiológico de la sífilis. Los filamentos axiales poseen una estructura similar a los flagelos, emergen de ambos extremos de la célula y la rodean en espiral por debajo de la vaina y están anclados en un extremo de la espiroqueta (Fig. 4).

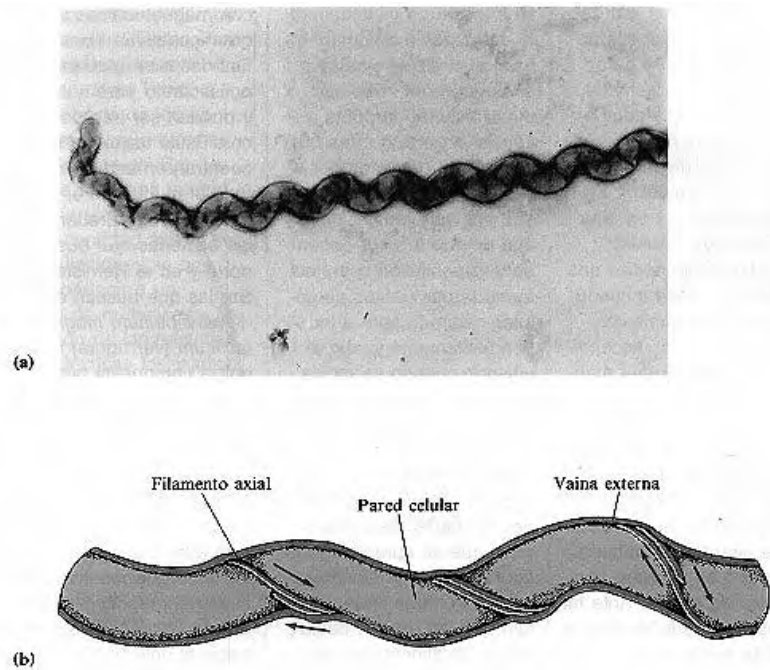


Fig. N° 4: Filamento axial y microfotografía de una espiroqueta (4)

FIMBRIAS

También conocidas como Pili, son apéndices en forma de vellosidades unidos a las células bacterianas de forma muy parecida a los flagelos pero son mas cortas y delgadas están compuestas de una proteína llamada

pulina. Las fimbrias comunes permiten a la célula adherirse a las superficies, como en el caso de *Neisseria gonorrhoeae*, que coloniza de esta forma las mucosas para producir la enfermedad. Otro tipo es la Pili sexual, que facilitan la unión de las células bacterianas previa transferencia de DNA desde una célula a la otra (Fig. 5).

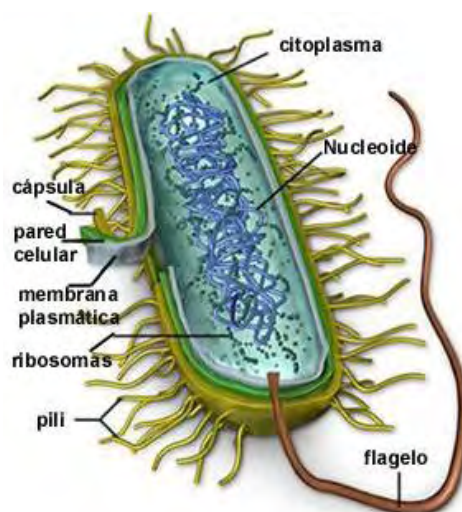


Fig. N° 5: Fimbrias, esta célula de *E. coli* aparece erizada de Fimbrias comunes. (4)

PARED CELULAR

La pared celular recubre y protege la frágil membrana citoplasmática y las partes internas de la célula de cambios adversos del medio ambiente, casi todas las células procariotas tienen pared celular.

Su función es prevenir la ruptura de la célula bacteriana cuando su presión osmótica interna es mayor que la del medio externo. Sirve también de punto de anclaje a los flagelos y ayuda a mantener la morfología de la célula, la pared celular esta formada por una red macromolecular llamada péptido glucano o mureina, el péptido glucano es un mucopolisacarido formado por unidades repetidas de un disacárido unido a cadenas de cuatro o cinco aminoácidos. Los monosacáridos que lo forman, N-acetil-glucosamina (NAG) y ácido N-acetil-murámico (NAM), derivan de la glucosa y llevan unidos aminoácidos. Esto permite poder clasificar a los microorganismos procariotas en dos grandes grupos (según la coloración que toma la pared al someterla a una tinción con cristal violeta) en bacterias Gram (+) y bacterias Gram (-) (Fig. 6).

Las bacterias Gram (+) poseen varias paredes gruesas y rígidas de péptido glucano, alanina, lisina y ácido glutámico entrelazadas por enlaces peptídico además contienen ácido teicoico.

Las bacterias Gram (-), no contienen ácido teicoico además sus paredes son mucho más delgadas debido a una menor cantidad de péptido glucano, un componente característico es el LPS (Lipopolisacarido) que permite la identificación serológica de la endotoxina en Bacterias Gram (-) tales como ***Salmonella***.

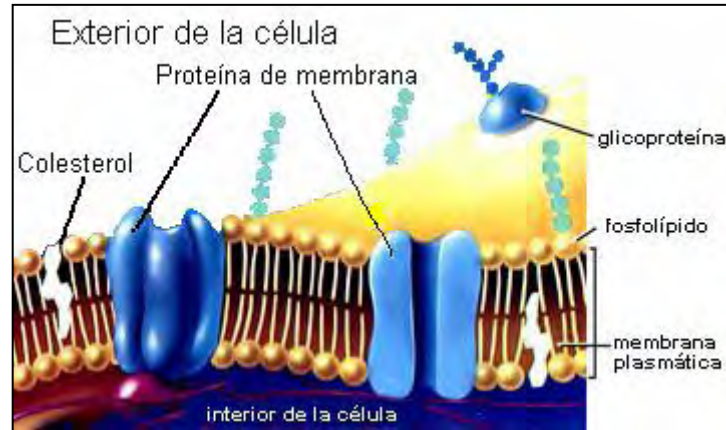


Fig. N° 6: Estructura y componentes de la pared celular. (4)

Estructuras internas a la pared celular:

MEMBRANA CITOPLASMÁTICA.

Es una delgada estructura que se extiende por dentro de la pared celular encerrando el citoplasma de la célula, está formada principalmente de fosfolípidos, que son el componente mayoritario y por proteínas.

Las moléculas de fosfolípidos están dispuestas en dos líneas paralelas formando lo que se conoce como bicapa fosfolípida, así cada molécula de fosfolípido consta de una cabeza polar formada por un grupo fosfato y glicerol que es hidrófila (afín al agua) y soluble en agua y una cola apolar compuesta por ácidos grasos que son hidrófobos (repelen el agua) e insolubles en agua. A esta disposición de los fosfolípidos se le conoce como el "mosaico fluido".

3.1.2 Tamaño y morfología de Hongos (Levaduras y Mohos). (2)

Los hongos son células eucarióticas de mayor tamaño que las bacterias, en su estructura poseen núcleo definido, retículo endoplásmico, mitocondrias y aparato escrotor, en cuanto a su nutrición son heterótrofos obligados por la ausencia de clorofila y sus paredes celulares están constituidas por celulosa, quitina o mezcla de ambas.

Los hongos pueden ser unicelulares conocidos como levaduras o pueden ser multicelulares con características filamentosas llamados mohos, aunque existen hongos dimórficos que son aquellos que se presentan en ambas formas, suelen estar adaptados a ambientes que serían adversos para las bacterias por ello pueden sobrevivir en lugares donde no se espera crecimiento microbiano, además los hongos no ingieren sus nutrientes, los absorben y pueden ser aislados en medios que contengan fuentes de carbono (glucosa), fuentes de nitrógeno (extractos de carne), debiendo cumplir además ciertas condiciones y requerimientos ambientales como el pH ácido (5.0) que inhibe el crecimiento de las bacterias mas comunes. Los hongos son más resistentes que las bacterias a la presión osmótica creciendo mejor en concentraciones elevadas de azúcar y sal además son capaces de crecer sobre sustancias con poca humedad a niveles tan bajos que no permiten el crecimiento bacteriano.

El principal mecanismo de reproducción de los hongos es asexual, sin embargo, la descripción de la estructuras de reproducción sexual es el

principal criterio de clasificación, por el que pueden ser ubicados en tres subdivisiones o phylum: Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota.

A continuación se describen las características principales de mohos y levaduras.

LEVADURAS.

Están formadas por células individuales (Fig. 7) las que se presentan muchas veces formando cadenas cortas, la colonia crece a medida aumenta el numero de levaduras este aumento suele ocurrir por gemación, una célula de levadura puede formar hasta 24 células hijas por gemación; las levaduras son capaces de crecer como anaeróbicos facultativos al carecer de oxígeno fomentan los azúcares como (sustrato) produciendo etanol y dióxido de carbono, las levaduras además pueden vivir como aeróbicos facultativos utilizando el oxígeno como aceptor de electrones.



Fig. N° 7: Aspecto colonial de una levadura (*Rhodotorula*) en Agar Papa Dextrosa. (18).

MOHOS.

Están formados por filamentos pluricelulares llamados hifas, que se reúnen para formar un cuerpo o micelio. Las hifas pueden ser tabicadas, y se denominan hifas septadas, o no presentar tabiques, y reciben el nombre de hifas sifonadas. El micelio por lo general presenta un aspecto aterciopelado o esponjoso (Fig. 8).

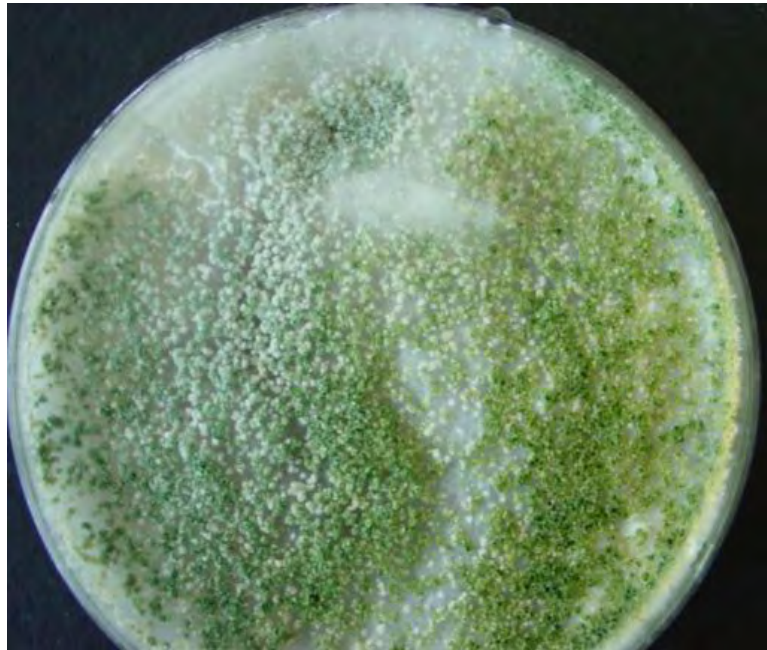


Fig. N° 8: Aspecto colonial de *Trichoderma viridae*, un moho en Agar Papa dextrosa. (18)

3.2 Técnicas de tinción en bacterias y hongos. (4)

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difícil ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o

para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

Las células generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas, proceso llamado fijación. Después de la fijación, si se añade el colorante, no se producen ulteriores cambios estructurales en el protoplasma. La fijación se realiza habitualmente en células que han sido fijadas sobre un portaobjetos, tratando después éste con el agente fijador, y siguiendo inmediatamente el proceso de tinción. La fijación produce habitualmente el encogimiento de las células; la tinción, por el contrario, hace que las células aparezcan mayores que lo que son realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos, muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Ejemplos de colorantes catiónicos son: Azul de metileno, cristal violeta y la safranina. Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, ejemplos la eosina, la fucsina ácida y el rojo Congo. Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a

menudo para revelar la localización de las gotícula o depósitos de grasa un ejemplo de colorante liposoluble es el negro Sudán.

Algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con otra sustancia química, que no es un colorante por sí mismo. Esta sustancia se denomina mordiente; un mordiente habitual es el ácido tánico. El mordiente se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora sí podrá atacar el colorante.

El azul de metileno es un buen colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y que no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales, puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe.

La tinción negativa es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, pero se colorea en cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse muchas precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.

3.3 Exámen de muestras al microscopio. (15)

Según la manipulación que se efectúe sobre la muestra a observar y según los colorantes que se empleen durante el proceso, existen diferentes modalidades de tinción, en el examen microscópico directo de las muestras clínicas no se utiliza ningún tipo de colorante. Las muestras se extienden directamente sobre la superficie de un portaobjetos para su observación (Fig. 9). El material que es demasiado espeso para permitir la diferenciación de sus elementos puede diluirse con igual volumen de solución salina fisiológica estéril. Se deposita suavemente un cubreobjetos sobre la superficie del material.

Este tipo de preparación se emplea para detectar trofozoítos móviles de parásitos intestinales, huevos y quistes de otros parásitos, larvas y gusanos adultos, hifas de hongos, etc.



Fig. N° 9: ***Candida albicans*** en un examen al fresco. (15)

En la tinción simple se utiliza un solo colorante, por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad (Tinta china, Azul Metileno de Loeffler, Azul de Lactofenol). El Hidróxido de potasio al 10% (solución de KOH) permite ver elementos de hongos ya que este digiere los componentes proteicos de la célula huésped, pero no actúa sobre los polisacáridos de las paredes celulares de los hongos.

La tinta china o Nigrosina permite observar células levaduriformes capsuladas los polisacáridos capsulares rechazan la tinta china y la cápsula aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos (Fig. 10). Azul de metileno de Loeffler puede agregarse a las preparaciones en fresco de heces para observar la presencia de leucocitos.

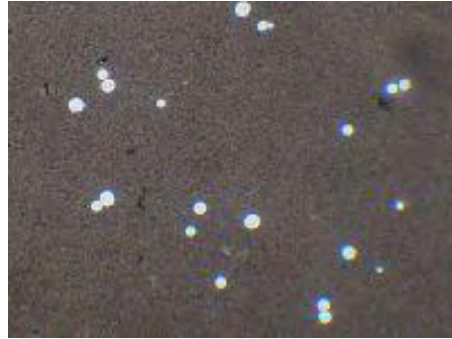


Fig. N° 10: ***Cryptococcus neoformans*** en una tinción con tinta china. (15)

Se utilizan varios colorantes combinados. Las estructuras celulares se diferencian en función de los diferentes colorantes que fijan de acuerdo con su propia constitución química. Los ejemplos clásicos serían la tinción de GRAM o la de Ziehl-Neelsen.

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes para la microbiología general y con el que el estudiante debe estar perfectamente familiarizado. Su utilidad práctica es indiscutible y en el trabajo microscópico de rutina del laboratorio de microbiología las referencias a la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, positivos, negativos etc.) se basan justamente en la tinción de Gram (Fig. 11).

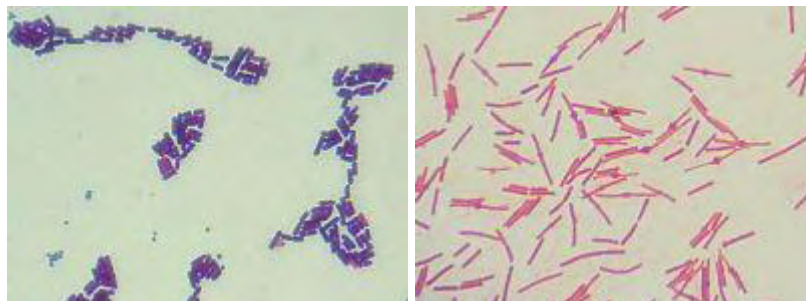


Fig. N° 11: Morfologías microscópicas de bacterias Gram (+) a la izquierda y de Gram (-) a la derecha. (15)

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Cristian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram (+) y Gram (-). Las bacterias se tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares.

3.3.1 Descripción del microscopio óptico de campo claro. (15)

Un microscopio óptico está formado, básicamente, por dos partes: la mecánica y la óptica (Fig. 12).

Parte mecánica consta de los siguientes elementos:

Pie o soporte, asa o brazo, platina, tubo porta ocular, tornillos, macrométrico y micrométrico, revólver y porta objetivos.

Parte óptica consta de los siguientes elementos:

Lentes; ocular y objetivos, sistema de iluminación, fuente de iluminación, mando de iluminación, condensador y diafragma.



Fig. N° 12: Microscopio óptico de campo claro. (15)

3.4 Cultivo y proliferación de microorganismos para su identificación (2)

Para la obtención de cultivos puros de bacterias de diferentes especies, las bacterias deben ser cultivadas en medios de cultivo de laboratorio para caracterizar su crecimiento, hacer su identificación y determinar sus actividades metabólicas. Un medio de cultivo es una solución acuosa de diferentes compuestos que contienen todos los elementos indispensables que requieren los microorganismos para crecer.

Generalmente las bacterias son inoculadas o introducidas en medios líquidos (caldos) o solidificados con agar para su propagación y /o conservación, así como para estudiar características de crecimiento. Es importante recordar que estos métodos se deben poner en práctica en zonas asépticas (cerca del

mechero o en cámara de flujo laminar), condiciones que limitan la presencia de microorganismos indeseables o contaminantes.

Las técnicas de aislamiento, permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras complejas tales como suelo, agua, alimentos, etc. en las que hay una gran diversidad microbiana, así como para comprobar la pureza de cultivos obtenidos. Los cultivos puros están formados por un solo tipo de microorganismos; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad a antibióticos e identificación de las especies microbianas.

El aislamiento de cultivos microbianos puede realizarse por métodos de dilución, en medios sólidos por estría en placa o en medios líquidos. En el primer caso se considera que cada célula bacteriana que se separa dará origen a una población que formará una colonia característica, visible a simple vista.

La limitación principal de estas técnicas es que no es práctica para el aislamiento a partir de mezclas donde el microorganismo de interés se encuentra en pequeñas cantidades, donde solamente se obtendrán las bacterias dominantes.

Para favorecer el aislamiento de cultivos de baja densidad, se aplican métodos de cultivo especiales, en los que se utilizan medios que contienen nutrientes especiales como antibióticos, altas concentraciones de sales y/o condiciones de pH, luz o temperatura para favorecer el crecimiento del

microorganismo de interés a estos medios de cultivo se les conocen como selectivos o de crecimiento.

En ocasiones se pueden agregar a los medios de cultivo otros componentes como: sangre, colorantes, indicadores etc. para distinguir especies microbianas, diferentes por la forma en que metabolizan los sustratos, que se manifiestan por cambios en la apariencia o modificación del pH del medio de cultivo. Estos medios se conocen como medios diferenciales y son de gran utilidad para la caracterización e identificación de especies bacterianas.

3.5 Ensayos bioquímicos (Pruebas API). (3)

La identificación de un aislamiento bacteriano puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de similitudes.

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

Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos, porque proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano, además simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, porque proveen los reactivos listos para su uso o porque son totalmente automatizables.

Las pruebas o ensayos bioquímicos, son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano.

Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar diferentes sistemas de trabajo (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.) que puede ser diferente aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos. Por ejemplo se debe suplir con factores de crecimiento el medio de cultivo para estudiar la fermentación de distintos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente. Los comerciales utilizan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya sea sustratos deshidratados, tiras de papel de filtro impregnadas en reactivos o pequeños compartimentos con medios listos para sembrar. En todos los casos se emplean códigos numéricos para la interpretación de resultados.

Los sistemas comerciales más comúnmente usados son:

API 20E: Es un sistema estandarizado para la identificación de bacterias Gram negativas (Fig. 13), que consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar

una suspensión bacteriana. Permite la realización de 23 pruebas bioquímicas a partir de una única colonia bacteriana.

API 10S, versión miniaturizada del API 20E.

Listeria API.

NH (Neisseria - Haemophilus).

Existen también sistemas de identificación comerciales para levaduras: API 20C (Para levaduras del género Candida)

Auxacolor de Diagnostics Pasteur

Fongiscreen 4H de Diagnostics Pasteur (Para identificación de levaduras de interés médico).



Fig. Nº 13: Cepas ATCC de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* en galerías de API 20E. (3)

3.6 PRUEBAS BIOQUIMICAS ⁽¹⁴⁾

En esquema, la realización de una prueba bioquímica implica, cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato o

inhibidor y luego de la incubación visualizar el crecimiento y la degradación de un sustrato, ya sea por viraje de un indicador o por agregado de un reactivo revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de su degradación.

Cultivar el microorganismo en un medio de propagación que contenga el sustrato de una enzima inducible y luego de la incubación demostrar la actividad enzimática.

En todos los casos se debe tener un cultivo fresco (18-24 hrs. de incubación) en un medio en que el microorganismo se desarrolla en forma óptima, a pH, fuerza iónica, atmósfera y temperatura adecuados. Siempre que se prepara un nuevo lote de medio de cultivo para una prueba, deben llevarse a cabo los correspondientes controles de calidad, sembrando en dicho medio una cepa positiva y otra negativa para dicha prueba.

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, se enumerarán a continuación solo las que se utilizan más frecuentemente, agrupadas según el tipo de ensayo y se denominan según su nombre corriente.

Enzimas vinculadas con la respiración: oxidasa y catalasa.

Descomposición de azúcares simples, ácidos orgánicos y otros

Requerimientos de oxígeno: Prueba de oxido fermentación (OF), crecimiento en caldo tioglicolato.

Producción de ácido, o ácido y gas: Fermentación de carbohidratos

Detección de enzimas y vías metabólicas: Prueba del gluconato, ONPG (orto nitro B-D galactopiranosido, esculina, hipurato rojo de metilo voges proskauer.

Descomposición de carbohidratos aminoácidos y otros: Prueba del indol, fenilalanina, lisina, arginina, ornitina, urea.

Ensayos combinados: TSI (Triple azúcar hierro), bilis esculina.

Detección de exoenzimas: lecitinasa, proteasa, coagulasa, amilasa, celulasa, desoxirribonucleasa.

3.7 Métodos rápidos PETRIFILM[®] (20)

La historia del PETRIFILM[®] se remonta a 1980 cuando se creó la primera placa para la identificación de aerobios, posteriormente salió al mercado distintos tipos tales como coliformes, *E. coli*, mohos y levaduras, coliformes rápidos/Enterobacterias, *St aureus*, *Estafilococos* Express, Listeria ambiental.

PETRIFILM^{MTM} incrementa la eficiencia de los análisis bacteriológicos ya que es rápido y sencillo de usar además de ser específico para cada grupo bacteriano optimiza el número de los análisis bacteriológicos, entre sus ventajas en el laboratorio es el ahorro de espacio, trabajo, tiempo y costos.

Las placas disponibles en el mercado actualmente son:

- Aerobios (AC).
- Bacterias ácido lácticas (AC).
- Psicrófilos (AC).

- Mohos y levaduras (YM).
- Coliformes totales y fecales (CC).
- Coliformes rápidos (RCC).
- ***E. Coli***
- Enterobacterias (EB).
- *Estafilococos aureus* (RSA).
- ***Estafilococos*** express (SRX).

Las diferentes aplicaciones que pueden tener las placas de PETRIFILM® son amplias en productos alimenticios así como aguas, potables, residuales o en proceso, y monitoreo de ambientes.

Tabla N° 1: Beneficios comparativos de PETRIFILM®. (20)

PETRIFILM ^{MTM}	METODO TRADICIONAL
Reducción del tiempo labor	Requiere tiempo extra con frecuencia
Listo para usar y de fácil manejo	Preparación larga y tediosa
Poco requerimiento de espacio y equipo	Gran espacio de trabajo y equipo
Poca inversión en inventarios	Alta inversión en inventarios
Bajo costo por prueba	Mayor costo por prueba

IV DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO: TEORICO Y PROSPECTIVO. La presente investigación es de tipo teórica debido a que los objetivos general y específicos están orientados a la elaboración de una guía en la metodología empleada en los análisis de microbiología general, en base a una exhaustiva revisión bibliográfica; la investigación es además de tipo prospectiva ya que en el cumplimiento de los objetivos la investigación será de utilidad a todos los estudiantes que cursan la asignatura de microbiología general o para aquellos profesionales interesados en conocer la metodología empleada en dicha asignatura, para lo cual se hizo necesario efectuar un estudio acerca de las necesidades de la población estudiantil de carreras afines al área de la salud, que sirva tanto para apoyar como para completar la presente investigación, tomando en cuenta las respuestas obtenidas éstas serán incluidas en el desarrollo de la elaboración de la guía.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta parte de la investigación es que se recopila toda la información teórica competente a la elaboración de manuales, información sobre microorganismos en la aplicación de técnicas microbiológicas básicas, el aislamiento, manipulación, proliferación de microorganismos (bacterias y hongos), estudio de pruebas bioquímicas, nociones fundamentales sobre pruebas rápidas API, para ello se consulta la metodología empleada por la FDA (Food Drugs Administration) y la bibliografía de diversas fuentes tales

como la biblioteca Central de la Universidad de El Salvador, biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, casas comerciales de productos microbiológicos para El Salvador e Internet.

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO ⁽¹⁷⁾

En esta etapa de la investigación se efectuó una encuesta de opinión, diseñada como un tipo de muestreo no probabilístico, debido a las variables a analizar, en la encuesta que fueron las opiniones expresadas por los universitarios se dirigió a estudiantes de carreras afines a la salud, específicamente aquellos estudiantes que cursan la cátedra de Microbiología General, en el año 2006 de la Universidad de El Salvador en las carreras de Doctorado en Medicina, Licenciatura en Química y Farmacia, Veterinaria, Ciencias Químicas, Biología e Ing. Agronómica, se tomaron muestras aleatorias de 30 estudiantes correspondientes a cada una de las carreras, dichos estudiantes fueron entrevistados utilizando como método de recopilación de datos la encuesta (Anexo N° 1), para facilitar el registro y tratamiento de resultados.

Las encuestas consisten en un conjunto más o menos amplio de preguntas acerca de los conocimientos básicos en microbiología general, para sondear las necesidades y expectativas del estudiantado que se consideren relevantes en el área microbiológica para la variable o característica que forma parte del objeto de estudio, que vendría a ser el propósito fundamental de la encuesta.

Los resultados respaldan la creación de esta guía la cual consiste en una recopilación de técnicas tanto de tipo convencionales como las innovadoras para ser utilizados en el laboratorio de microbiología general por los estudiantes y personas interesadas

Tabla N° 2: NUMERO DE ESTUDIANTES INSCRITOS AÑO LECTIVO 2006

CARRERAS	NUMERO
Doctorado en Medicina	2500
Licenciatura en Química y Farmacia	876
Ingeniería Agronómica y Veterinaria	630
Licenciatura en Ciencias Químicas	142
Licenciatura en Biología	363
Total de estudiantes	4,809

Encuestas de opinión: 30 encuestas X 6 carreras hacen un total de 180 encuestas.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Se presentan los resultados de las encuestas de opinión dirigidas a un grupo de estudiantes de cuatro facultades pertenecientes a la Universidad de El Salvador. Los estudiantes encuestados cursan carreras aplicadas a diversas áreas de la salud y que en cierto nivel cursan la asignatura de microbiología general. La encuesta se efectuó con el propósito de detectar la necesidad de una guía sobre técnicas microbiológicas y su aplicación, y al mismo tiempo para respaldar la elaboración de esta propuesta, la cual se pretende sera utilizada como un aporte en los recursos didácticos de la Facultad de Química y Farmacia. En las encuestas realizadas se evaluó conocimientos, inquietudes y comentarios de los estudiantes. Los resultados son los siguientes: La mayoría de la muestra encuestada la constituyeron estudiantes del sexo femenino con un 55% y del sexo masculino un 45%.

Tabla N° 3: SEXO DE LOS ENCUESTADOS

Sexo de los estudiantes	Porcentaje
Femenino	55
Masculino	45

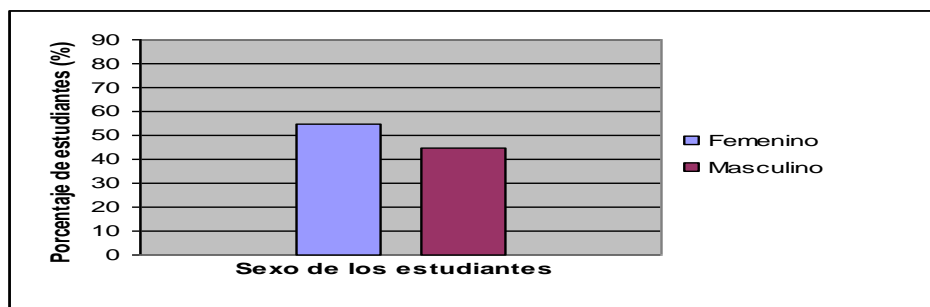


Fig. N° 14: Conocimiento de técnicas microbiológicas por sexo.

Con respecto al conocimiento de técnicas microbiológicas, la encuesta revela que las más conocidas son las técnicas de inoculación, técnicas de tinción simple y tinción de Gram, además el 13.33 % de los encuestados manifiesta no conocer ninguna técnica (Tabla 4 y Fig.15).

Tabla Nº 4: PORCENTAJE DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS MÁS UTILIZADAS POR LOS ENCUESTADOS

Métodos utilizados en Microbiología	(%)
Tinción simple	54,44
Tinción de Gram.	48,88
Técnicas de inoculación	62,22
Descripción de hongos	36,66
Métodos de cuantificación de microorganismos	36,66
Preparación de medios de cultivo	44,44
Otros	25,55
Ninguno.	13,33

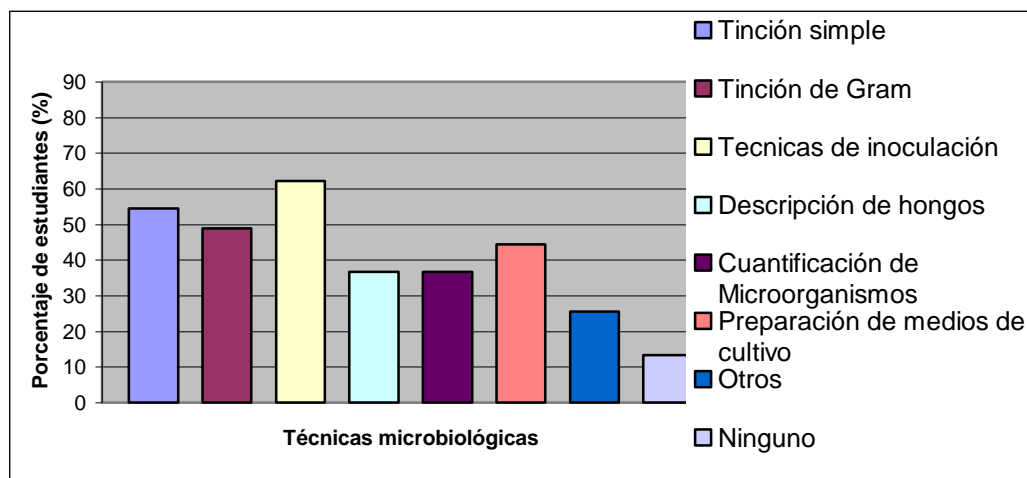


Fig. Nº 15: Nivel de conocimiento de los estudiantes sobre las técnicas Microbiológicas.

Los tres tipos de bibliografía preferida por los estudiantes y de uso más frecuente en porcentaje se distribuye de la siguiente manera: los libros de microbiología 78.8%, Internet 63.3%, tesis 28.88% (Tabla 5 y Fig. 16).

Tabla Nº 5: BIBLIOGRAFÍA MÁS CONSULTADA POR LOS ESTUDIANTES DE DIVERSAS CARRERAS EN EL ESTUDIO DE LA MICROBIOLOGÍA.

Bibliografía mas consultada por los estudiantes	(%)
Libros de Microbiología	78,88
Internet	63,33
Tesis de la Facultad	28,88
Enciclopedias	16,66
Apuntes de clase	58,88
Otros	3,33

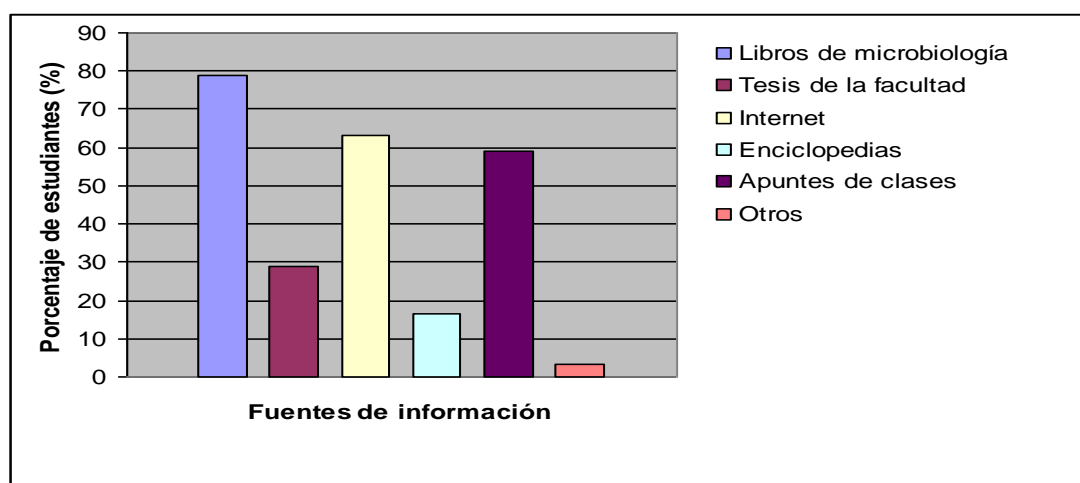


Fig. Nº 16: Tipo de bibliografía consultada por los estudiantes en el estudio de la microbiología.

Con respecto a las guías prácticas de microbiología, el 73.33 % de encuestados expreso que han utilizado sus manuales de laboratorio como guía práctica para identificación y manipulación de microorganismos (Tabla 6 y Fig. 17).

Tabla Nº 6: PORCENTAJE DE ESTUDIANTES QUE HAN UTILIZADO UNA GUÍA PRÁCTICA EN EL ESTUDIO DE LA MICROBIOLOGÍA.

Respuesta	Porcentaje (%)
Si	73,33 %
No	26,66 %

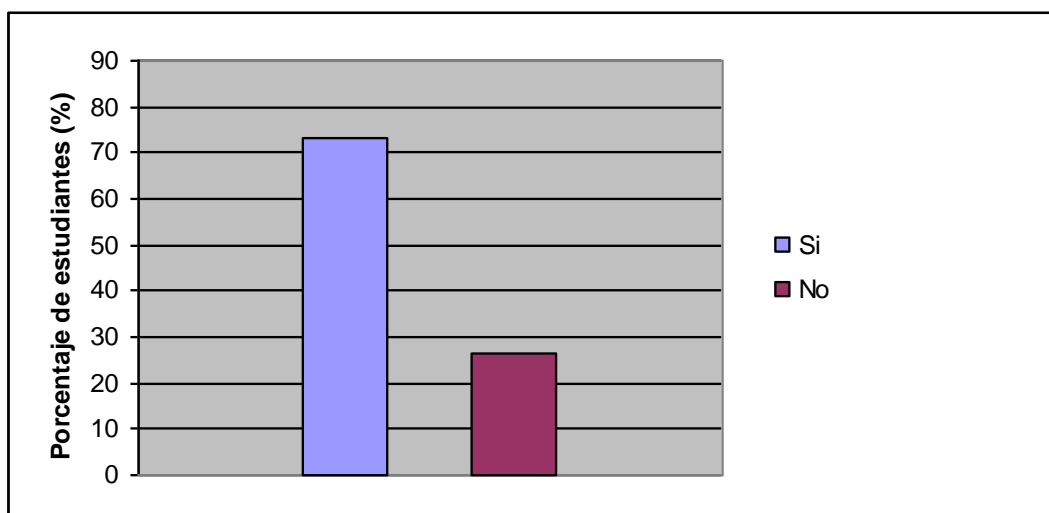


Fig. Nº 17: Porcentaje de la población que ha utilizado una guía practica en el estudio de la microbiología.

Con respecto al contenido de una guía práctica para el aislamiento, identificación, manipulación y multiplicación de bacterias y hongos la encuesta revela la importancia de una colección de técnicas fundamentales de aislamiento e identificación, técnicas de preparación y uso de medios de

cultivo así como esquematizar métodos microbiológicos oficiales, luego de una breve explicación acerca de las nuevas técnicas tales como placas PETRIFILM[®], y las bioquímicas API algunos estudiantes coincidieron en la necesidad de que se incluyan en una guía (Tabla N° 7 y Figura N° 18).

Opiniones sobre componentes de guías practicas	(%)
Recopilación de técnicas, aislamiento e identificación de microorganismos	74,44
Técnicas de preparación y uso de medios de cultivo	41,11
Métodos Microbiológicos oficiales	38,88
Ninguno	5,55
Otros	5

Tabla N° 7: OPINIONES DE LOS ENCUESTADOS CON RESPECTO AL CONTENIDO DE UNA GUÍA PRÁCTICA SOBRE MICROORGANISMOS.

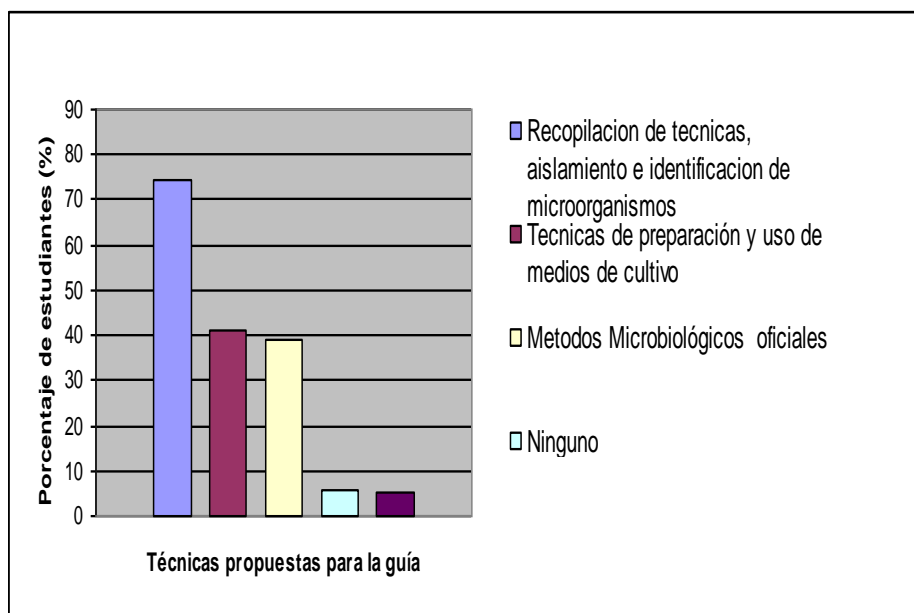


Fig. N° 18: Opiniones de los estudiantes acerca del contenido de la guía microbiológica.

En conclusión, la elaboración de una guía para el aislamiento, identificación, manipulación y multiplicación de bacterias y hongos es de gran importancia tanto para el estudiante como para el investigador; por lo que se diseñó una incluyendo los principales procedimientos y técnicas microbiológicas para la correcta manipulación de microorganismos en el laboratorio y que garantice al mismo tiempo la obtención de resultados confiables.

La guía contiene un número de técnicas que en su mayoría son para que el estudiante e investigador se familiarice gradualmente con los procedimientos de cultivo y observación de bacterias y hongos.

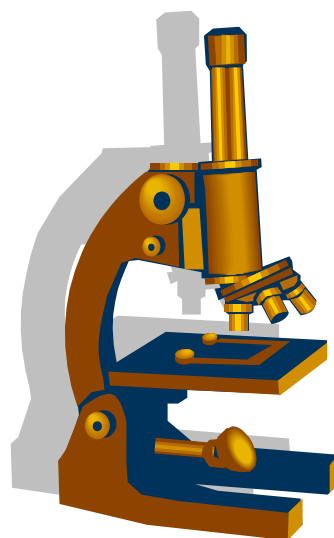
La observación al microscopio de las morfologías es uno de los primeros pasos para la identificación de microorganismos por lo cual en la guía se incluyen las morfologías bacterianas y fúngicas de aquellos patógenos más comunes en la cátedra de microbiología general.

Por otra parte en la actualidad el mayor desarrollo en técnicas con ventajas como el ahorro de materiales, tiempo y espacio las constituyen las pruebas bioquímicas API y las placas con medios deshidratados PETRIFILM® las cuales se explican con detalle en la presente guía.

Existen muchos microorganismos patógenos presentes en el agua o en otras muestras cuya identificación y aislamiento resulta complicado, debido a esto se recopilaron aquellas técnicas que de forma indirecta (técnica del número más probable y filtración por membrana) evalúan la cantidad de estos microorganismos.

La normativa de la FDA fue consultada para la guía en la recopilación de las técnicas de identificación de las principales bacterias patógenas para el hombre por lo que se citan las técnicas de identificación para ***Escherichia coli*** y ***Staphylococcus aureus***, patógenos oportunistas en el hombre.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y CONTAMINACION AMBIENTAL



**GUIA DE APLICACIÓN DE TECNICAS DE MICROBIOLOGIA (BACTERIAS
Y HONGOS) PARA SER UTILIZADA EN MICROBIOLOGIA GENERAL**

PRESENTADO POR:

HEYDI ARACELY BENAVIDES MARTINEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, OCTUBRE DE 2007**INDICE**

1. INTRODUCCIÓN.	65
2. OBJETIVO GENERAL	65
3. TÉCNICA DE USO DEL MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO.	66
3.1 Técnica de uso del microscopio de campo claro.	66
4. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE FROTIS Y TINCIÓN DE BACTERIAS.	68
4.1 Técnica de preparación de frotis bacteriano.	68
4.2 Técnica de tinción simple.	69
4.3 Técnica de tinción de Gram.	70
5. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE FROTIS Y TINCIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS.	73
5.1 Técnica de preparación de frotis para hongos.	73
5.2 Técnica de tinción de mohos y levaduras con azul de Metileno.	74
5.3 Técnica de tinción de hongos levaduras y mohos en montaje con cinta adhesiva.	75
6. TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN: FILTRACIÓN POR MEMBRANA CALOR SECO Y CALOR HUMEDO.	79
6.1 Técnica de filtración por membrana.	79

6.2 Técnica de esterilización por calor húmedo (Autoclave).	81
6.3 Técnica de esterilización por calor seco.	82
6.4 Técnica de esterilización por flameado.	83
7. TÉCNICAS GENERALES DE PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO MÁS UTILIZADOS EN MICROBIOLOGIA GENERAL.	85
7.1 Técnica de preparación de medio de cultivo líquidos en Tubos.	85
7.2 Técnicas de preparación de medios de cultivos en placas de Petri y tubos con agar inclinado.	86
8. DIFERENTES TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO Y SU USO EN MICROBIOLOGIA GENERAL.	89
8.1 Medio de cultivo en Plate Count (Agar Peptona de Caseína Glucosa Extracto de Levadura).	89
8.2 Medio de cultivo Lauril Sulfato.	90
8.3 Medio de Cultivo nutritivo.	91
8.4 Medio de cultivo EMB (Agar Eosina de Metileno Lactosa Sacarosa).	92
8.5 Medio de cultivo MacConkey.	93
8.6 Medio de cultivo Fluorocult LMX.	94
8.7 Medio de cultivo Baird Parker.	95
8.8 Medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion).	97
8.9 Medio de cultivo Czapek-Dox.	97

8.10 Medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa).	98
8.11 Medio de cultivo Agar sangre.	99
8.12 Medio de cultivo Estafilococcus 110.	100
8.13 Medio de cultivo EC.	101
8.14 Medio de cultivo MF ENDO.	102
8.15 Medio de cultivo Verde Brillante caldo 2 %.	103
8.16 Recomendaciones generales para la lectura de placas de Petri con medios de cultivo.	105
9. TÉCNICAS GENERALES PARA SIEMBRA EN MEDIOS SÓLIDOS Y LIQUIDOS.	106
9.1 Técnica de la estría cruzada en Placa de petri.	106
9.2 Técnica de siembra en tubos con caldo y Agar nutritivo.	107
9.3 Técnica de recuento en placa Plate Count.	109
10. PRUEBAS Y TECNICAS DE IDENTIFICACION Y CUAN- TIFICACION DE BACTERIAS GRAM (+) Y GRAM (-).	113
10.1 Técnicas de identificación de bacterias Gram (+).	113
10.1.1 Prueba de la catalasa (Pba. Bioquímica).	113
10.1.2 Prueba de la coagulasa (Pba. Bioquímica).	114
10.1.3 Técnica de identificación de aislamiento para Staphylococcus aureus utilizando Medio Baird Parker.	116
10.1.4 Técnica de identificación y cuantificación de Staphylo- coccus aureus en placas PETRIFILM® Staph Express.	117

10.1.5 Técnica de identificación de bacterias Gram (+) utilizando API Staph.	120
10.1.6 Técnica de identificación de bacterias Gram (+) utilizando API Strep.	122
10.2 Técnicas de identificación de bacterias Gram (-).	129
10.2.1 Prueba de Indol (Pba Bioquímica).	129
10.2.2 Prueba TSI con Agar hierro tres azúcares (Pba. Bioquímica).	130
10.2.3 Prueba del citrato (Pba. Bioquímica).	132
10.2.4 Prueba de la movilidad (Pba. Bioquímica).	132
10.2.5 Prueba rojo de metilo/Voges Proskauer (Pba. Bioquímica).	133
10.2.6 Prueba de la Ureasa (Pba. Bioquímica).	134
10.2.7 Técnica de identificación y cuantificación de bacterias coliformes en Placas de PETRIFILM®.	136
10.2.8 Técnica de identificación y cuantificación de bacterias ácido lácticas en Placas PETRIFILM®.	139
10.2.9 Técnica de identificación y cuantificación de <i>E.coli</i> en placas PETRIFILM®.	140
10.2.10 Técnica de identificación y cuantificación de enterobacterias en placas PETRIFILM®.	141

10.2.11 Técnica de cuantificación de Coliformes utilizando el NMP (Número Mas Probable).	143
10.2.12 Método oficial para identificación de <i>E. coli</i> y bacterias coliformes.	148
10.2.13 Técnica de identificación de bacterias Gram (-) utilizando API 20 E.	149
10.2.14 Técnica de identificación de bacterias Gram (-) utilizando API 20 NE.	154
11. TÉCNICAS DE IDENTIFICACION DE HONGOS: LEVADURAS Y MOHOS.	158
11.1 Técnica de identificación de hongos utilizando medio Papa Dextrosa o Czapek Dox.	158
12. ESQUEMATIZACIÓN DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA PARA BACTERIAS.	160
13. DESCRIPCION MORFOLOGICA MICROSCOPICA DE BACTERIAS GRAM (+) Y GRAM (-) PATOGENAS UTILIZADAS EN MICROBIOLOGIA GENERAL.	163
13.1 Bacterias Gram (+).	163
13.2 Bacterias Gram (-).	174
14. ESQUEMATIZACIÓN DE TÉCNICAS MICROBIOLOGICAS MACROSCOPICAS PARA BACTERIAS.	178

15. DESCRIPCIÓN MORFOLOGICA MACROSCOPICA DE BACTERIAS GRAM (+) Y GRAM (-) UTILIZADAS EN MICROBIOLOGIA GENERAL.	188
15.1 Bacterias Gram (+)	188
15.2 Bacterias Gram (-)	190
16. ESQUEMATIZACIÓN DE TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA DE HONGOS (LEVADURAS Y MOHOS).	197
17. DESCRIPCION MORFOLOGICA DE HONGOS PATOGENOS UTILIZADOS EN MICROBIOLOGIA GENERAL.	199
Morfologías microscópicas	199
17.2 Morfologías macroscópicas	206

1. INTRODUCCION

Esta guía esta diseñada para ser utilizada por estudiantes que cursan la asignatura de microbiología general, introduciéndolos de forma gradual en la observación de las características morfológicas, nutricionales de crecimiento y control de microorganismos. Al mismo tiempo, la guía describe procedimientos de cultivo, identificación y manipulación tanto de bacterias y hongos a través de técnicas convencionales e innovadoras. Se pretende que las técnicas expuestas sirvan de base para su puesta en práctica en el laboratorio de microbiología.

2. OBJETIVO GENERAL

Que el estudiante se familiarice gradualmente con los procedimientos más utilizados en microbiología general sobre: aislamiento, identificación, manipulación y proliferación de bacterias y hongos.

3. TECNICA DE USO DEL MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO.

3.1 Técnica de uso del microscopio de campo claro. ⁽⁸⁾

PROCEDIMIENTO:

- Conectar el microscopio a su fuente de energía.
- Encender la fuente de iluminación del microscopio.
- Iniciar con el objetivo 10X, colocando la muestra en el portaobjetos sobre la platina del microscopio.
- Una vez enfocado con el objetivo 10X pasarse a 40X después a 100X.
- Hacer las anotaciones de morfologías que nos interesan.
- Desconectar el microscopio, limpiar los lentes con xilol o una mezcla de alcohol acetona (7,3) ⁽¹⁵⁾ para quitar cualquier residuo (no abusar de esta limpieza ya que puede dañar las lentes).
- Dejar el microscopio con el objetivo 10X.
- Cubrirlo con su funda.
- Descartar todo el material contaminado.

PRECAUCIONES PARA EL USO Y MANEJO DEL MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO ⁽¹⁵⁾:

Si es posible asignar un solo lugar para el microscopio y no moverlo de su lugar, dado que la mayor parte de los desperfectos que sufre un microscopio son producidos por los continuos golpes que recibe al ser introducido y extraído de su estuche.

- Nunca soplar los lentes del microscopio ya que la saliva será inevitablemente depositada en las lentes incluso en cantidades minuciosas.
- No utilizar pañuelos faciales para limpiar las lentes del microscopio porque estos pueden contener filamentos cristalinos.
- El lino o la gamuza se pueden utilizar para la limpieza del microscopio aunque tampoco es muy conveniente para limpiar la lente.
- Seguir las recomendaciones del fabricante de usar disolventes limpiadores excepto el agua.
- Para las manchas difíciles se puede utilizar xileno en cantidades mínimas.
- Utilizar los líquidos apropiados de inmersión en los objetivos, el no hacerlo puede dañar el pegamento de montaje de la lente.

4. TECNICAS DE PREPARACIÓN DE FROTIS Y TINCIÓN DE BACTERIAS.

4.1 Técnica de preparación de frotis bacteriano. ⁽²⁾

Debido al pequeño tamaño de la mayoría de los microorganismos, es recomendable la observación de frotis teñidos al microscopio para la identificación de morfologías bacterianas. El frotis se prepara haciendo una extensión de los microorganismos sobre una superficie transparente, en la cual se fijan y tiñen los microorganismos tal como se explican en el siguiente procedimiento.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Mechero Bunsen.
- Asa de Inoculación.
- Cultivo bacteriano reciente en caldo o Placa de Petri.
- Metanol ó etanol.
- Frasco lavador con agua destilada estéril.

PROCEDIMIENTO:

- Lavar perfectamente un portaobjetos, secarlo y etiquetarlo.
- Trabajar en el área cerca de un mechero Bunsen y esterilizar el asa en la flama del mechero hasta que se ponga al rojo vivo.
- Dejar enfriar el asa para evitar que al tomar la muestra los microorganismos sean destruidos.

- Acercar al mechero el tubo de cultivo quitarle el tapón y flamear rápidamente la boca del mismo. El asa se introduce en el tubo de cultivo y se toma cuidadosamente la muestra.
- Para el caso de cultivos líquidos, colocar la muestra en el centro del portaobjetos, extenderla suavemente en un área circular de 2 cm de diámetro aproximadamente y esterilizar nuevamente el asa. Dejar secar el frotis al aire y repetir los dos procedimientos anteriores varias veces.
- Si el cultivo es de medio sólido, previamente se colocará en el centro del portaobjetos una gota de agua destilada en la que se mezcla una pequeña muestra del cultivo que se toma siguiendo las indicaciones del paso anterior, extenderla suavemente y dejar secar al aire.
- Fijar los frotis de cultivos líquidos con dos gotas de metanol o etanol absoluto y dejar secar al aire (hacer esto en zonas alejadas al mechero).
- Los frotis de cultivos sólidos, completamente secos se fijaran con calor. Para esto se pasará el frotis rápidamente 2-3 veces en el interior de la flama del mechero.

4.2 Técnica de tinción simple. (2)

La mayoría de las bacterias se tiñen con colorantes básicos, que se adhieren por enlaces iónicos débiles a moléculas con carga negativa de la célula bacteriana. La tinción de las bacterias con safranina, es un ejemplo de tinción simple que facilita la observación de forma, tamaño y arreglo de las células. Después de la fijación, los frotis son teñidos con diferentes colorantes sintéticos derivados de la anilina.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Frotis.
- Safranina.
- Frasco lavador con agua destilada.
- Microscopio de campo claro.

PROCEDIMIENTO:

- El frotis se cubre con dos gotas de safranina durante 30 segundos a 1 minuto.
- El exceso de colorante se elimina con lavado suave al agua corriente o con la ayuda del frasco lavador conteniendo agua destilada.
- Dejar secar al aire.
- Observar al microscopio en objetivos 10X y 40X.

4.3 Técnica de Tinción de Gram. ⁽²⁾

Esta técnica de tinción fue propuesta por el médico danés Cristian Gram en 1884 y es una de la más utilizada en bacteriología que clasifica los cultivos bacterianos en bacterias Gram (+) y bacterias Gram (-). La técnica se fundamenta en el hecho de que el colorante primario (Cristal violeta) tiñe por igual a todas las bacterias, pero la combinación con cristal violeta es más permanente en las bacterias Gram (+) que mostraran un color morado, mientras que las bacterias Gram (-) mostraran un color rosado.

Luego de tener el frotis listo se puede realizar una tinción de Gram para observar al microscopio de campo claro.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Frotis bacteriano reciente.
- Cristal violeta.
- Lugol.
- Metanol.
- Safranina.
- Frasco lavador con agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

- Preparar un frotis bacteriano.
- Colocar 2 gotas de cristal violeta en el frotis y dejarlo durante 30 segundos a 1 minuto.
- A continuación se lava cuidadosamente el frotis con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- Sacudir un poco y sin dejar secar cubrir el frotis con 2 gotas de lugol por 30 segundos.
- Lavar cuidadosamente el frotis con agua.
- Inclinar el portaobjetos y aplicar gota a gota el decolorante dejando que escurra hasta que no fluya mas tintura.
- Lavar con agua inmediatamente.

- Aplicar 2 gotas de safranina durante 30 segundos.
- Lavar nuevamente con agua, eliminar cuidadosamente el exceso de agua con una toalla de papel y dejar secar al aire.
- Observar el frotis teñido al microscopio (Fig. 19 y 20).

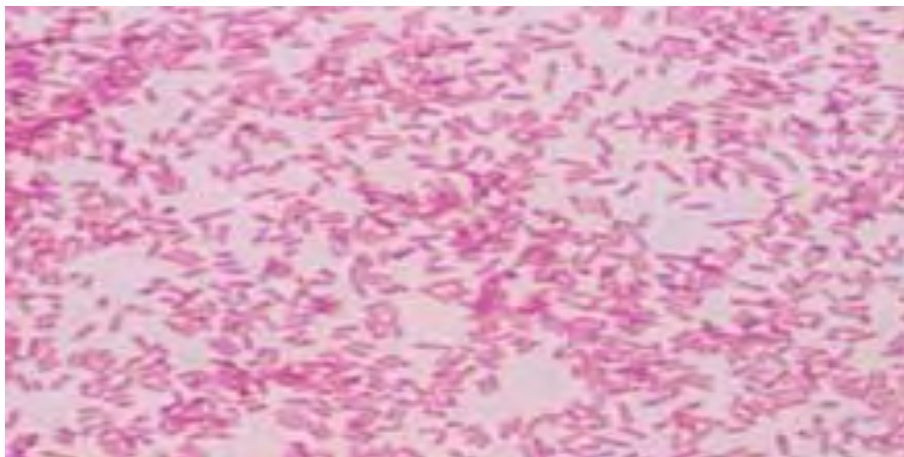


Fig. N° 19: Tinción de Gram de *E. coli*. (5)

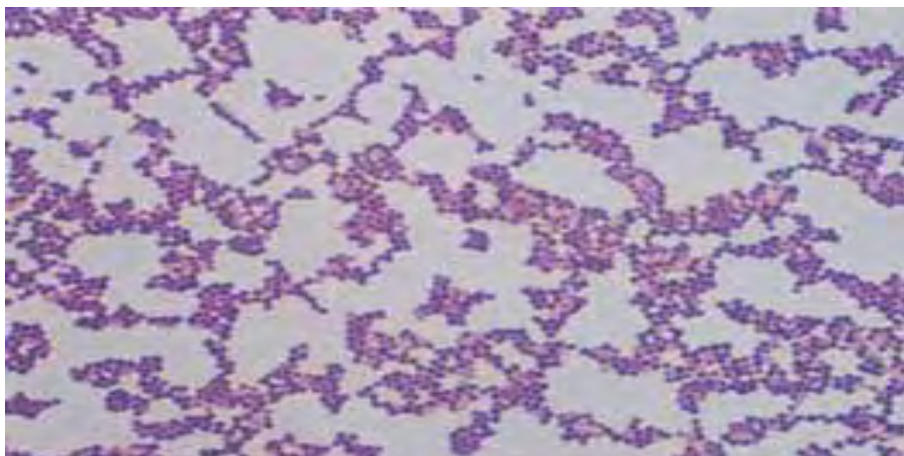


Fig. N° 20: Tinción al Gram de *Staphylococcus aureus*. (5)

5.0 TECNICAS DE PREPARACION DE FROTIS Y TINCION DE MOHOS Y LEVADURAS.

5.1 Técnica de preparación de frotis para hongos. (2)

Las observaciones microscópicas de los mohos y levaduras son particularmente importantes para su identificación. La preparación de frotis a partir de cultivos de hongos o levaduras se realiza de manera similar a los frotis de cultivos bacterianos.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Mechero Bunsen.
- Asa de inoculación.
- Cultivo fúngico reciente.

PROCEDIMIENTO:

- Lavar perfectamente un portaobjetos, secarlo y etiquetarlo.
- Trabajar en el área cerca de un mechero bunsen y esterilizar el asa en la flama del mechero hasta que se ponga al rojo vivo.
- Dejar enfriar el asa para evitar que al tomar la muestra los microorganismos sean destruidos.
- Acercar al mechero el tubo con el cultivo fúngico, quitarle el tapón y flamear rápidamente la boca del mismo. El asa se introduce en el tubo de cultivo y se toma la muestra.

- Si es hongo filamentoso se toma una pequeña sección de las hifas.
- En el caso de levaduras se toma la muestra de manera similar que para las bacterias.
- Depositar una gota de agua destilada estéril en el centro del portaobjetos.
- Colocar la muestra en el centro del portaobjetos, extenderla suavemente en un área circular de 2 cm de diámetro aproximadamente y esterilizar nuevamente el asa.
- Dejar secar el frotis al aire y repetir los dos procedimientos anteriores varias veces.
- Para fijar el frotis se pasa el portaobjetos rápidamente por la parte amarilla de la flama del mechero repitiéndolo de 2 a 3 veces.

5.2 Técnica de tinción de mohos y levaduras con azul de metileno. (2)

Los mohos también se tiñen para la observación al microscopio de una manera similar a las bacterias, la descripción de estas morfologías siguen siendo el principal criterio a seguir para su identificación.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Frotis reciente.
- Azul de metileno.
- Frasco lavador con agua destilada.
- Microscopio de campo claro.

PROCEDIMIENTO:

- El frotis se cubre con dos gotas de azul de metileno durante 30 segundos a 1 minuto.
- El exceso de colorante se elimina con lavado suave al agua corriente o con la ayuda del frasco lavador conteniendo agua destilada.
- Dejar secar al aire.
- Observar en el microscopio con los objetivos 10X y 40X.

5.3 Técnica de tinción de hongos: levaduras y mohos en montaje con cinta adhesiva. ⁽²⁾

Con esta técnica se permite la observación de estructuras especiales como los conidiofóros, conidias, esporangios y rizoides, de especial importancia para la identificación de hongos filamentosos en Microbiología general.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Portaobjetos.
- Cinta adhesiva.
- Azul de lactofenol.
- Mechero bunsen.
- Cultivo fúngico reciente.

PROCEDIMIENTO:

- Colocar una tira de 4-5 cm de cinta adhesiva transparente tomándola únicamente por los extremos
- Cerca del mechero abrir la caja de Petri conteniendo la muestra del hongo de interés y presionar ligeramente la cinta transparente sobre la periferia de la colonia.
- Ubicar la cinta con la muestra adherida sobre una gota de azul de lactofenol, previamente colocada en el centro del portaobjetos.
- La cinta funciona como cubreobjetos por lo que se debe aplanar lo mejor posible, evitando la formación de burbujas y sin alterar demasiado las estructuras.
- A continuación se deja reposar durante 3-5 minutos y hacer las observaciones en el microscopio con los objetivos 10X y 40X.

En las preparaciones es fácil observar estructuras especiales como Conidióforos, Conidias, Esporangióforos, Esporangios y Rizoides (Fig. 21, 22, 23 y 24).

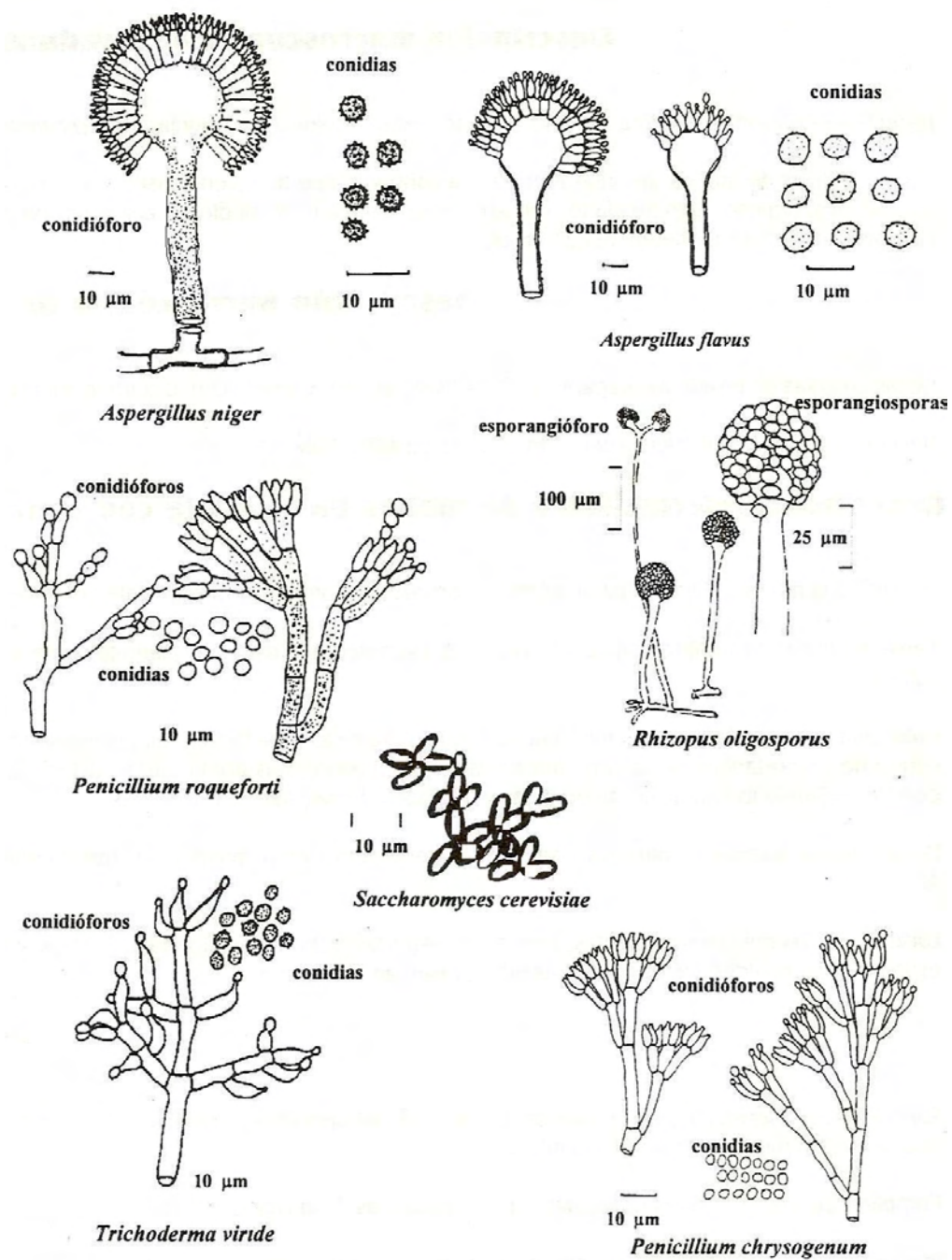


Fig. N° 21: Morfologías fúngicas. (2)

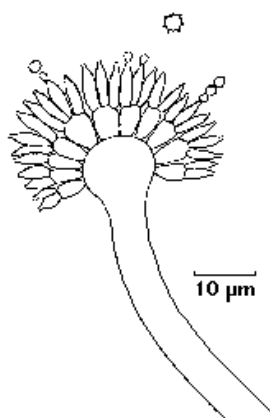


Fig. N° 22: Morfología de *Aspergillus sp.* (5)

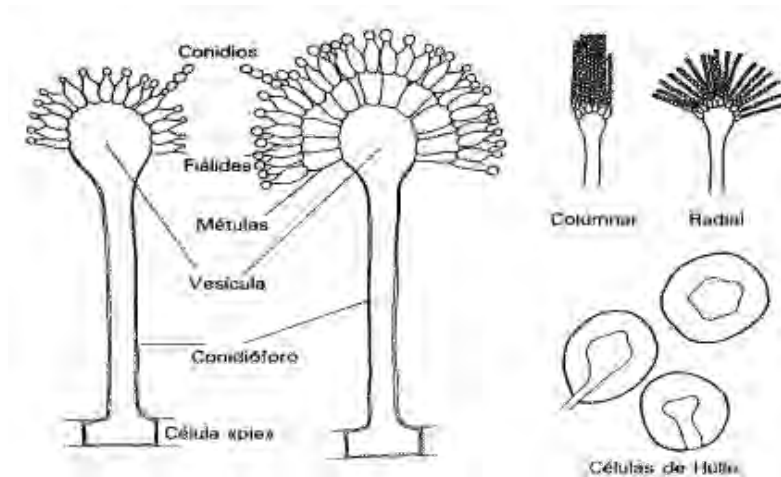


Fig. N° 23: Morfologías de *Aspergillus flavus.* (5)



Fig. N° 24: Morfología de *Penicillium sp.* (5)

6. TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN: FILTRACIÓN POR MEMBRANA, CALOR SECO Y CALOR HÚMEDO.

6.1 Técnica de filtración por membrana. ⁽¹⁶⁾

La técnica de filtración por membrana o de la membrana filtrante (MF), además de ser un método de análisis utilizado sobretodo para identificación y proliferación de microorganismos en general, es una técnica para la esterilización de sustancias lábiles en el laboratorio, la técnica se basa en la filtración de un volumen conocido a través de un filtro de membrana, hecha en base a algún compuesto de celulosa y con un diámetro de poros uniformes de 0.45 micras de diámetro. El método directo establece una relación directa entre el numero de colonias contadas y el contenido bacteriológico de la muestra que se está analizando.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Incubadora a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Filtro de membrana con porosidad de 0.45 ± 0.02 micras.
- Soporte poroso.
- Kitasato.
- Mangueras.
- Bomba de vacío.
- Pinzas estériles.
- Algodón.
- Tijeras de acero inoxidable.

- Pipetas estériles.
- Placas de Petri estériles con almohadillas absorbentes.
- Medios de cultivo MF ENDO.
- Frascos estériles para el muestreo.

Nota: Se recomienda trabajar en cabina de flujo laminar o en su defecto cerca del mechero bunsen.

PROCEDIMIENTO ⁽¹⁶⁾:

- Esterilizar el equipo de filtración sin la membrana en papel aluminio por medio del autoclave a 121 °C x 15 minutos.
- Ensamblar la unidad de filtración colocando una membrana filtrante estéril sobre el soporte poroso, utilizando para ello pinzas previamente esterilizadas.
- Colocar la almohadilla en la placa de Petri, colocar 2 ml de medio de cultivo MF ENDO ⁽¹⁴⁾ con una pipeta estéril.
- Vaciar el volumen de muestra elegido como óptimo según el tipo de muestra.
- Si la muestra es de menos de 10 ml, se deberá añadir por lo menos 20 ml de agua de dilución estéril (agua desionizada y desmineralizada estéril) al recipiente superior antes de la filtración y aplique el vacío.
- Desconectar el vacío y enjuague el recipiente con 20-30 ml de agua de dilución estéril.

- Desmontar la unidad de filtración y utilizando las pinzas, coloque la membrana filtrante en la placa de Petri sobre la almohadilla, con el lado reticulado hacia arriba
- Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas entre la almohadilla y la membrana filtrante.

INCUBACION:

Incubar a 35°C-37 °C de 18 a 24 h con un 100% de humedad.

LECTURA:

Se cuenta el número de colonias presentes UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y se multiplican por la dilución de la muestra siguiendo el método descrito para la dilución y cuenta en placa Plate Count (9.3) en este manual.

6.2 Técnica de esterilización por calor húmedo (Autoclave). ⁽⁹⁾

Una temperatura elevada con una alta humedad (vapor de agua) es uno de los métodos más eficaces de esterilización.

La acción rápida del vapor depende en gran parte del gran calor latente del agua (540 cal/g). Los objetos fríos son así rápidamente calentados por condensación de vapor sobre su superficie. Sirve para esterilizar medios de cultivos preparados.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Autoclave.
- Medios de cultivos listos para esterilizar en tubos de ensayo, placas de Petri o matraces erlenmeyer.

PROCEDIMIENTO:

- Se comprueba que el nivel de agua en el interior del autoclave sea el adecuado (por encima de la rejilla del fondo).
- Se conecta el aparato, accionando el interruptor de encendido.
- Los tubos de ensayo se introducen en cestas de autoclave, que se cubren con papel de aluminio.
- Los matraces de cualquier capacidad se recubren en su parte superior con un tapón de algodón y papel de aluminio.
- Una vez introducido todo el material a esterilizar dentro del autoclave, se cierra la tapa y la llave de purga automática (si el aparato no dispone de un sistema de purgado, se debe cerrar la llave de purga una vez que sale un chorro uniforme de vapor de agua a través del grifo de purgado).
- Se selecciona la temperatura y el tiempo de esterilización.
- Transcurrido el tiempo y una vez se compruebe que no existe sobrepresión, se abrirá la llave de purga y posteriormente la tapa del aparato, sacando el material esterilizado.

6.3 Técnica de esterilización por calor seco. ⁽⁹⁾

Se trata de esterilizar con aire caliente. Es menos eficaz que el calor húmedo, ya que el aire de vapor es peor conductor del calor que el vapor de agua. Por esta razón hay que elevar mucho la temperatura y el tiempo de esterilización. Por lo común se esteriliza por este medio; material de vidrio seco, aceites y grasas (material hidrófobo) polvos anhidros entre otros.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Estufa incubadora.
- Material de vidrio limpio y envuelto en papel de empaque listo para esterilizar

PROCEDIMIENTO:

- Se conecta la estufa.
- Accionar el interruptor de encendido.
- Seleccionar la temperatura a 160 °C./120 min.
- En el horno, se esterilizará material de vidrio que ha de emplearse seco y en general productos hidrófobos. Los materiales a esterilizar se lavan con detergente, se secan y se envuelven en papel de empaque, los Matraces se les colocará un tapón de algodón sujeto con un cordel.
- Se introduce en el interior de la estufa el material a esterilizar. El tiempo de esterilización debe controlarse manualmente.
- Finalizado el periodo de esterilización se dejará el material dentro del horno hasta que se enfrie, antes de utilizarlo.

6.4 Técnica de esterilización por flameado. ⁽¹¹⁾

Consiste en someter el material a esterilizar, directamente a la acción de una llama (Mechero de Bunsen). Con esto se consigue una esterilización momentánea, ya que al enfriarse el material, puede volver a contaminarse, con frecuencia se esterilizan por este método las Asas de inoculación bacteriana (Fig. 26).

MATERIAL Y EQUIPO:

- Mechero Bunsen.
- Asas de inoculación en punta o en anillo.

PROCEDIMIENTO:

- Encender el mechero bunsen.
- Someter el asa de inoculación al calor de la llama hasta llegar al rojo vivo.
- De esta manera se consigue esterilizar las asas de inoculación para la preparación de frotis bacterianos y fúngicos etc (Fig. 25).

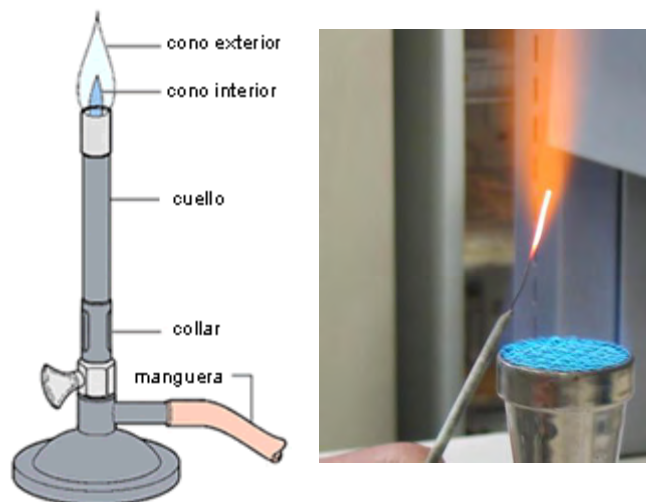


Fig. Nº 25: Mechero Bunsen y Asa Bacteriológica. ⁽¹¹⁾

7. TÉCNICAS GENERALES DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MÁS UTILIZADOS EN MICROBIOLOGÍA GENERAL.

7.1 Técnica de preparación de medio de cultivo líquido en tubos. ⁽¹⁴⁾

El medio de cultivo líquido es muy útil en el laboratorio para la favorecer la propagación y conservación de una gran variedad de microorganismos, se explica a continuación los pasos para preparar caldo nutritivo en tubos de ensayo con tapón de rosca.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Medio de cultivo Nutritivo.
- Balanza granataria.
- Espátula.
- Matraz Erlenmeyer de la capacidad adecuada.
- Agua destilada.
- Mechero Bunsen.
- Soporte.
- Malla de asbesto.
- Tubos de ensayo con tapón de rosca estériles.
- Autoclave 121 °C por 15 minutos.

PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una balanza granataria la cantidad de medio de cultivo granulado que indica la etiqueta del frasco, hacer los cálculos necesarios para la cantidad que nos interesa preparar.

- Colocar el medio de cultivo y la cantidad de agua destilada para disolver el medio que indica la etiqueta del frasco en un matraz Erlenmeyer, agitar para disolver el medio de cultivo completamente.
- Con un potenciómetro, o utilizando papel pH se ajusta el pH a 6.5-7.0 y con una pipeta Pasteur poco a poco se agrega gotas de solución de HCl 0.1 M o solución de NaOH 0.1 M, esto en el caso de que el pH sea más alcalino o más ácido respectivamente.
- Se vacían 5 ml del medio de cultivo en cada uno de los tubos con tapón de rosca previamente estériles y se cierran sin llegar al tope.
- Esterilizar el medio de cultivo en autoclave 121 °C por 15 minutos o como indique la etiqueta del frasco.

7.2 Técnica de preparación de medios de cultivo en placas de Petri y tubos con agar inclinado. ⁽¹⁴⁾

Para el aislamiento de microorganismos muchas veces se hace necesario su extensión sobre una superficie más amplia que le permita su crecimiento, para ello se utilizan las placas de Petri con medios de cultivo. Sin embargo también se pueden preparar tubos contenido Agar inclinado en donde el microorganismo dispone de menor cantidad de sustrato, pero la ventaja de poder mantenerse por más tiempo en el laboratorio con menor riesgo de contaminación.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Medio de cultivo elegido.
- Balanza granataria.
- Espátula.
- Matraz Erlenmeyer de la capacidad adecuada.
- Agua destilada.
- Mechero Bunsen.
- Soporte.
- Malla de asbesto.
- Placas de Petri estériles.
- Tubos de ensayo con tapón de rosca estériles.
- Autoclave 121 °C por 15 minutos.

PROCEDIMIENTO:

- Para la preparación de medio de cultivo sólido se pesa la cantidad indicada en la viñeta del frasco, colocándola en un matraz Erlenmeyer.
- En un matraz Erlenmeyer se agrega la cantidad de agua destilada indicada por la etiqueta del frasco para la preparación de medio de cultivo sólido.
- Esta mezcla se calienta con agitación constante hasta que ebulle, cuidando que no se proyecte.

- Cuando el medio se encuentra completamente disuelto se baja de la estufa con la ayuda de un guante de asbesto, se deja enfriar hasta 40 °C y enseguida se colocan 20 ml de medio en cada una de las cajas de Petri estériles.
- Para los tubos se utilizaran 5 ml del medio en cada uno los cuales se dejaran reposar hasta que se solidifique el Agar en forma inclinada sobre un soporte.
- Esterilizar el medio de cultivo en autoclave 121°C por 15 minutos, si es necesario y es indicado en la viñeta del frasco.

8. DIFERENTES TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO Y SU USO EN MICROBIOLOGÍA GENERAL. ⁽¹⁴⁾

Existen medios de cultivos especiales, que contienen nutrientes como antibióticos, altas concentraciones de sales, condiciones de pH, luz o temperatura para favorecer el crecimiento del microorganismo de interés a estos medios de cultivo se les conocen como selectivos o de crecimiento.

Otro tipo de medio de cultivo son los diferenciales, útiles para la caracterización e identificación bacteriana. Por lo general estos medios contienen colorantes, e indicadores especiales, por ejemplo el Agar EMB (Eosina Azul de Metileno), Agar MacConkey etc.

A continuación se presentan los medios de cultivo más utilizados en Microbiología general.

8.1 Medio de cultivo Plate Count (Agar Peptona de Caseína Glucosa Extracto de Levadura). ⁽¹⁴⁾

Este medio se caracteriza por ser libre de sustancias inhibitoras y de indicadores, concebido esencialmente para la determinación del número total de microorganismos presentes en la muestra a analizar.

COMPOSICIÓN (g/L):

Peptona de caseína 5.0; extracto de levadura 2.5; D (+) glucosa 1.0; Agar-Agar 14.0.

PREPARACIÓN:

Disolver 22.5 g/l y esterilizar en autoclave (15 min 121 °C). Verter el medio en placas de Petri. pH 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

INCUBACION:

Incubar a 30 °C de 24 a 48 h en condiciones aerobias.

LECTURA:

Después de la incubación se observan colonias amarillentas, de aspecto irregular, húmedo y mucoide.

8.2 Medio de cultivo Lauril Sulfato. ⁽¹⁴⁾

Medio de cultivo liquido, selectivo para el ensayo previo de coliformes y para el enriquecimiento selectivo de los mismos.

Debido a su elevada calidad nutritiva y al tampón de fosfatos que contiene este medio de cultivo, se garantiza el rápido crecimiento y la intensa formación de gas, incluso en el caso de coliformes que fermenten lentamente la lactosa. La formación de gas puede detectarse con campanas de fermentación (Campanas de Durham). El contenido en laurilsulfato inhibe notablemente el crecimiento de la flora acompañante indeseable.

COMPOSICIÓN (g/L):

Triptosa 20.0; lactosa 5.0; cloruro de sodio 5.0; laurilsulfato sal sódica 0.1; hidrogenofosfato dipotásico 2.75; dihidrogenofosfato potásico 2.75.

PREPARACIÓN:

Disolver 35.5 g/L distribuir en tubos de ensayo provistos de campanas de Durham y esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C) pH 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

INCUBACIÓN:

Incubar a 35 °C o 30 °C de 24 a 48 h en condiciones aerobias.

LECTURA:

Esta se realiza observando la formación de turbidez en el medio y la formación de gas o espuma en los tubos de Durham.

8.3 Medio de cultivo nutritivo. (14)

Medios de cultivo universal para el cultivo de microorganismos poco exigentes.

COMPOSICIÓN (g/L):

Peptona de carne 5.0; extracto de carne 3.0; Agar – Agar 12.0.

PREPARACIÓN:

Disolver 20.0 g/L (Agar nutritivo) ó 8 g/L para preparar caldo nutritivo y esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C) el pH 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

Las placas con medio de cultivo y el caldo preparados son claros e incoloros hasta con una tonalidad amarillenta.

INCUBACIÓN:

Incubar a 35 °C durante 24 - 48 h en condiciones aerobias.

LECTURA:

Las colonias que crecen en este medio de cultivo son redondas de bordes un tanto irregulares y color amarillento o cremoso. En el caso del caldo se observa turbidez en la composición del medio cuando hay presencia de microorganismos

8.4 Medio de cultivo EMB (Agar Eosina Azul de Metileno Lactosa-Sacarosa)⁽¹⁴⁾

Este es un Agar selectivo para la demostración y el aislamiento de Enterobacteriaceas patógenas. Según Holt Harris & Teague (1916), el contenido en lactosa y sacarosa hace posible la distinción entre **Salmonella** y **Shigella** lactosa-negativa y sacarosa-negativa, frente a la flora acompañante lactosa negativa pero sacarosa positiva por ejemplo, **Citrobacter** y **Aeromonas hidrófila**. Los gérmenes de acompañamiento indeseables, bacterias Gram (+) resultan ampliamente inhibidos en su crecimiento, gracias a los colorantes presentes en su formulación.

COMPOSICIÓN (g/L):

Peptona 10.0; hidrogenofosfato dipotásico 2.0; lactosa 5.0; Eosina amarillenta 0.4; Azul de metileno 0.07; Agar – Agar 13.5.

PREPARACIÓN:

Disolver 36 g/L, esterilizar en autoclave (15 minutos. A 121 °C) y verter en placas. pH 7.1 ± 0.2 a 25 °C.

INCUBACIÓN:

Incubar por 24 horas a 37 °C en condiciones aerobias.

LECTURA:

Las colonias transparentes o de color ámbar corresponden a ***Salmonella*** o ***Shigella***, aquellas colonias que presentan una consistencia mucosa, con el centro pardo-grisáceo a la luz transmitida pertenece a cepas de ***Enterobacter*** o ***Klebsiella***. Si las colonias son verdosas con una tonalidad metálica a la luz reflejada con el centro azulado a la luz transmitida pertenecen a ***Escherichia coli***.

8.5 Medio de cultivo MacConkey. ⁽¹⁴⁾

Agar selectivo para el aislamiento de ***Salmonella***, ***Shigella*** y bacterias coliformes. Según MacConkey (1905), las sales biliares y el cristal violeta inhiben considerablemente la flora Gram (+). La lactosa junto con el indicador pH rojo neutro, sirve para la comprobación de la degradación de dicho azúcar.

COMPOSICIÓN (g/L):

Peptona de caseína 17.0; peptona de carne 3.0; cloruro de sodio 5.0; lactosa 10.0; mezcla de sales biliares 1.5; Rojo neutro 0.03; cristal violeta 0.001; Agar – Agar 13.5.

PREPARACIÓN:

Disolver 50 g/L, esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C) y verter en placas de Petri, pH 7.1 ± 0.2 a 25 °C.

INCUBACIÓN:

Incubar a 37 °C de 18 a 24 horas en condiciones aerobias.

LECTURA:

Las colonias lactosa (-) negativa son incoloras y las lactosa (-) positiva son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los acidos biliares.

Las colonias incoloras transparentes son típicas de cepas de **Salmonella** o **Shigella**, las grandes rojas con halo turbio son típicas de cepas de **Escherichia coli**, aquellas colonias diminutas, de crecimiento aislado y opacas son típicas de cepas de **Enterococos** y **Estafilococos**.

8.6 Medio de cultivo Fluorocult LMX. ⁽¹⁴⁾

Medios para la demostración rápida de **E. coli** mediante fluorescencia. La detección de la presencia de **E. coli** se efectúa mediante fluorescencia al iluminar con luz UV. Para confirmar el ensayo se utiliza como indicador la formación de gas debido a la fermentación de la lactosa y el ensayo del indol (Pba. Bioquímica) puede realizarse con la adición de gotas del reactivo de Kovacs, un anillo rojo indica prueba positiva.

COMPOSICIÓN (g/L):

Tryptosa 5.0; cloruro de sodio 5.0; sorbitol 1.0; tryptofano 1.0; Fosfato dipotásico 2.7; Fosfato potásico 2.0; lauryl sulfato de sodio 0.1; 5 - bromo - 4 - cloro - 3 - galactopiranosido (X-GAL) 0.08; metil umbifenil glucoronido (MUG) 0.05; isopropil galactopiranosido (IPTG) 0.1.

PREPARACIÓN:

Disolver 17g en un litro de agua destilada, hervir y distribuir en tubos con tapón de rosca esterilizar en autoclave (15 min. 121 °C) pH 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

INOCULACIÓN:

37 °C durante 24 h en condiciones aerobias.

LECTURA:

La fluorescencia se provoca mediante una lámpara UV (366 nm). Los tubos que muestra fluorescencia azul claro corresponden a las de *E. coli*. Además el medio de cultivo permite realizar la prueba de presencia del indol con el reactivo de Kovacs provocando la formación de un anillo color rojo en los tubos positivos (Fig. 26)



Fig. N° 26: Fluorocult LMX positivo para indol (al centro) con el reactivo de Kovacs. (14)

8.7 Medio de cultivo Baird Parker. ⁽¹⁴⁾

Para el aislamiento y la diferenciación de, ***Staphylococcus*** según Baird Parker (1962). Este medio de cultivo contiene cloruro de litio y telurito para la inhibición de la flora acompañante, en tanto que el piruvato y la glicocola actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de ***Staphylococcus***.

Sobre el medio de cultivo opaco la reducción del telurito a telurio, se desarrolla una colonia negra característica de los ***Staphylococcus***.

COMPOSICIÓN (g/ L):

Peptona de caseína 10.0; extracto de carne 5.0; extracto de levadura 1.0; piruvato sódico 10.0; glicina 12.0; cloruro de litio 5.0; Agar-Agar 15.0.

Aditivos: Emulsión de yema de huevo telurito 50 ml.

PREPARACIÓN:

Disolver 58 g en 0.95 litros de agua destilada, esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C) enfriar a 45 – 50 °C, añadir mezclando 50 ml de emulsión de yema de huevo telurito, si es necesario agregar 50 mg de Sulfametazina verificar pH 6.8 ± 0.2 . Verter en placas de Petri.

INCUBACIÓN:

Incubar a 35 °C de 24 - 48 h en condiciones aerobias.

LECTURA:

El ***Staphylococcus aureus*** se caracteriza por presentar colonias negras lustrosas, con un borde estrecho blanquecino rodeado por un halo claro, las

cepas de ***Staphylococcus epidermidis*** son negras pero no presentan halo alrededor, en raras ocasiones hay crecimiento de ***Micrococcus*** colonias pequeñas de color pardo hasta negro.

8.8 Medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion). ⁽¹⁴⁾

Para el cultivo de diversos microorganismos patógenos exigentes. Este medio de cultivo se basan en el principio del Caldo ROSENOW preparado con trozos de cerebro (ROSENOW, 1919) y son adecuados para el cultivo de muchas bacterias exigentes, como ***Streptococos***, ***Pneumococos***, ***Meningococos*** y otros.

PREPARACIÓN:

Disolver 52 g/litro para Agar o 37 g/litro para preparar caldo y esterilizar en autoclave (15 min. a 121 °C). pH 7.4 ± 0.2 a 25 °C.

Ambos medios de cultivo son ligeramente parduscos. El caldo tiene un aspecto claro, mientras que el Agar puede presentar, a veces, opalescencia.

LECTURA:

Crecen colonias típicas de bordes irregulares y de consistencia mucoide, y en el caso del caldo la turbidez del medio indica la presencia de microorganismos .

8.9 Medio de cultivo Czapek – Dox. ⁽¹⁴⁾

Agar selectivo para el cultivo de hongos y bacterias del suelo, según Czapek (1902 – 1903) y Dox (1910). Este medio de cultivo contiene sacarosa como única fuente de carbono y nitrato como única fuente de nitrógeno. En este

medio, los hongos pueden crecer bien, en tanto que de la flora bacteriana solo pueden desarrollarse las bacterias del suelo no exigentes.

COMPOSICIÓN (g/L):

Sacarosa 30.0, nitrato sódico 3.0; sulfato de magnesio 0.5; cloruro potásico 0.5; sulfato de hierro (II) 0.01; hidrogenofosfato dipotásico 1.0; Agar – Agar 13.0.

PREPARACIÓN:

Disolver 48 g/L, esterilizar en autoclave (15 min. A 121 °C) y verter en placas. pH: 7.3 ± 0.2 a 25 °C las placas con medio de cultivo son ligeramente turbias.

INCUBACION:

Incubar de 1 a 2 semanas a 25 °C. La temperatura óptima de incubación para *Penicillium* es de 20 a 25 °C; para *Aspergillus* de 30 °C y para *Candida* de 28 °C en condiciones aerobias.

LECTURA:

Los hongos filamentosos pueden presentar aspectos algodonosos y de diversos colores dependiendo de la cepa, las levaduras crecen en forma de colonias pegadas al medio y son húmedas.

8.10 Medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa). ⁽¹⁴⁾

Para el cultivo, aislamiento y determinación del número de gérmenes de levaduras y mohos, a partir de alimentos y otros materiales. Los hidratos de carbono y la infusión de patata (Beever y Bollard, 1970) favorecen el crecimiento de levaduras y mohos. Debido al bajo valor de pH, la flora

bacteriana de acompañamiento queda inhibida en su desarrollo se recomienda bajar aun más el valor de pH, haciéndolo descender hasta aproximadamente 3.5.

COMPOSICIÓN (g/L):

Infusión de patata (preparada a partir de 200 g de patata) 4.0; D (+) glucosa 20.0; Agar - Agar 15.0.

PREPARACIÓN:

Disolver 39 g/L y esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C), pH 5.6 ± 0.2 a 25 °C las placas con medio de cultivo son claras e incoloras.

Este medio de cultivo se siembra, por estría, en superficie de placas de Petri.

INCUBACIÓN:

Incubar durante 5 días a temperatura ambiente, llevar a cabo la investigación de acuerdo con los correspondientes fines de empleo.

LECTURA:

Las colonias presentan aspecto algodonoso cuando son hongos filamentosos, y la coloración de las hifas depende de la especie, las levaduras crecen bien en el medio, se observan húmedas e irregulares.

8.11 Medio de cultivo Agar sangre. ⁽¹⁴⁾

Se emplea para el aislamiento de *Streptococcus* y *Staphylococcus* en muestras de distintos orígenes. Si se añade el 5 % de sangre, es un medio adecuado para determinar reacciones hemolíticas y favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes.

COMPOSICION (g/l):

Sodio azida 0.2; Extracto de carne 3.0; Peptona 10.0; cloruro de sodio 5.0; Agar 15.0.

PREPARACION:

Suspender 33.2 g en un litro de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y disolución total y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121 °C durante 15 min, dejar enfriar hasta 45 °C y añadir asépticamente un 5 % de sangre mezclar bien y distribuir pH 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

INCUBACIÓN:

35 °C por 24 h en condiciones aerobias.

LECTURA:

Staphylococcus epidermidis no presentan hemólisis, ***Enterococos faecalis*** presenta hemólisis alfa y Gamma, ***Streptococcus pneumoniae*** presenta hemólisis Alfa y ***Streptococcus pyogenes*** y ***Staphylococcus aureus*** presenta hemólisis Beta.

8.12 Medio de cultivo *Estafilococos* 110. ⁽¹⁴⁾

Se emplea en el aislamiento y diferenciación de ***Staphylococos***, el carácter selectivo del medio se debe a la alta concentración de cloruro de sodio que contiene y que hace que la mayoría de microorganismos diferentes de los ***Staphylococos*** queden inhibidos.

COMPOSICION (g/L):

Extracto de levadura 2.5; Gelatina 30.0; Lactosa 2.0; D (-) manita 10.0; Peptona de caseína 10.0; Potasio hidrogeno fosfato 5.0; Cloruro de sodio 75.0; Agar 15.0.

PREPARACION:

Suspender 149 g de medio de cultivo en un litro de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Resuspender el precipitado agitando suavemente para evitar la formación de burbujas y distribuir en placas de Petri estériles pH 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

INCUBACION:

35 °C y 37 °C durante 48 h en condiciones aerobias.

LECTURA:

Las colonias sospechosas de ser ***Staphylococcus*** patógenos aparecen de color amarillo (producción de pigmento).

8.13 Medio de cultivo EC. ⁽¹⁴⁾

Se emplea para la diferenciación y enumeración de coliformes y ***E. coli*** en aguas residuales, y otro tipo de muestras. La presencia de sales biliares determina que se inhiba el crecimiento de las especies que forman esporas y de ***Streptococos*** fecales. La lactosa favorece a los coliformes y el consumo se pone de manifiesto por la presencia de gas.

COMPOSICIÓN (g/L):

Lactosa 5.0; Potasio di-hidrogeno fosfato 1.5; di-potasio hidrogeno fosfato 4.0; Sales biliares 1.0; Cloruro de sodio 5.0; Triptosa 20.0.

PREPARACIÓN:

Suspender 37.4 g en un litro de agua destilada, calentar y agitar hasta dilución total. Distribuir en tubos de ensayo con campanas de Durham y esterilizar a 121 °C durante 15 min. El caldo es de color claro amarillento, pH 6.9 ± 0.2 a 25 °C.

INCUBACIÓN:

Incubar a 37 °C para determinación de coliformes totales y 44 °C para coliformes fecales. 44.5 ± 0.5 °C de 24 ± 2 h para *E. coli*. La presencia de gas en los tubos de Durham y la reacción positiva para Indol con el reactivo de Kovacs son confirmativas de *E. coli*.

8.14 Medio de cultivo MF ENDO. ⁽¹⁴⁾

Es un medio para la identificación y enumeración de bacterias coliformes en agua y otras muestras utilizando la técnica de filtración por membrana.

Los nutrientes del medio de cultivo permiten el crecimiento de bacterias lactosa positivas, la flora acompañante es inhibida por el lauryl sulfato y desoxicolato. Las colonias lactosa positivas se observan de color rojo por la liberación de fuscina proveniente del sulfato de fuscina presente en el medio de cultivo. Las colonias de *Escherichia coli* y coliformes presentan un brillo típico en las colonias.

Este medio es normalmente utilizado para impregnar materiales absorbentes tales como los filtros de membrana utilizados en el proceso de filtración por membrana.

COMPOSICIÓN (g/L):

Tryptosa 10.0; peptona de carne 5.0; peptona de caseína 5.0; cloruro de sodio 5.0; fosfato de hidrogeno di-potásico 4.375; fosfato de dihidrogeno potásico 1.375; lactosa 12.5; sodio desoxicolato 0.1; lauryl sulfato de sodio 0.05; fuscina básica 1.05; sulfito de sodio 2.1.

PREPARACIÓN:

Suspender 48 g de medio de cultivo y 14 g de Agar- Agar en 1 litro de agua destilada y estéril calentar hasta ebullición y completa disolución, colocar en placas de Petri estériles.

Nota: no someter a esterilización en autoclave.

pH 7.2 ± 0.2 a 25 °C

INCUBACIÓN:

2 – 3 h A 35 ° C

LECTURA:

Las colonias de bacterias coliformes se observan de color rojo brillante.

8.15 Medio de cultivo Verde Brillante caldo 2%. (14)

Medio de cultivo para el enriquecimiento y enumeración de *Escherichia coli* y bacterias coliformes fecales en agua y diversas muestras, utilizado para la determinación de estas bacterias por el Método del NMP (Número mas probable).

MODO DE ACCIÓN:

La bilis y el verde brillante inhiben completamente el crecimiento de la flora bacteriana indeseable. La fermentación de lactosa con formación de gas al utilizar tubos con campanas de Durham, indica la presencia de ***Escherichia coli*** y bacterias coliformes fecales. La presencia de otras bacterias no coliformes en el medio de cultivo no produce gas en las campanas de Durham.

COMPOSICIÓN:(g/L):

Peptona 10.0; lactosa 10.0; bilis seca 20.0; verde brillante 0.0133.

PREPARACIÓN:

Suspender 40 g/L de medio de cultivo en 1 litro de agua destilada, agitar para disolver completamente. Llenar los tubos de ensayo con tapón de rosca conteniendo tubos de Durham y esterilizar en autoclave (15 min. a 121 °C).

pH 7.2 ± 0.2 a 25 °C.

El caldo preparado es claro y verde.

INCUBACIÓN:

Incubar a 24 - 48 h a 44 °C en medio aerobio.

LECTURA:

La ***Escherichia coli*** presenta turbidez y presencia de gas al incubar los tubos a 44 °C.

8.16 Recomendaciones generales para la lectura de placas de Petri con medios de cultivo. (2)

En la lectura de las placas de Petri se toman en cuenta las siguientes características tanto de la colonia como del medio de cultivo.

- Forma: circular, irregular, filamentosa o rizoide.
- Borde: entero, lobulado, aserrado.
- Superficie: lisa o rugosa.
- Aspecto: húmeda, seca, butirosa.
- Elevación: convexa, plana, hundida.
- Luz transmitida: translúcida, opaca.
- Luz reflejada: brillante, mate.
- Consistencia: dura, blanda, mucoide.
- Coloración del medio de cultivo y de la colonia.
- Todas estas características de la morfología colonial son el primer paso en la identificación de la especie microbiana después deberá realizarse un frotis para observar la morfología microscópica.

9. TÉCNICAS GENERALES PARA SIEMBRA EN MEDIOS SÓLIDOS Y LÍQUIDOS.

9.1 Técnica de la estría cruzada en Placa de Petri.⁽²⁾

Las técnicas de aislamiento, permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras complejas, el aislamiento de cultivos microbianos puede realizarse con la técnica de estría en placa con medios de cultivo sólido, se considera que cada célula bacteriana que se separa dará origen a una población que formará una colonia característica, visible a simple vista.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Mechero bunsen
- Asa de inoculación
- Cajas de Petri con medios de cultivo listos para inocular
- Cultivo de microorganismo en caldo
- Incubadora a 35 °C

PROCEDIMIENTO:

- Trabajar en área aséptica con la ayuda de un mechero bunsen.
- De un cultivo de microorganismos en caldo de 24 horas se toma una asada utilizando para ello un asa en anillo.
- Tomar con la mano izquierda una caja de Petri, de manera que la base de la caja repose sobre la palma de la mano y la tapa pueda manipularse hacia arriba y abajo con el pulgar y el dedo medio.

- Levantar la cubierta de la caja de Petri y colocar el inóculo en el borde del Agar opuesto a usted. Hacer estrías con el inóculo de lado a lado trazando líneas paralelas que cubran aproximadamente una parte de la placa.
- Bajar la cubierta de la placa y flamear el asa de inocular. Hacer girar la placa de Petri un cuarto de vuelta, elevar la cubierta y enfriar el asa de inocular tocando la superficie del Agar lejos del conjunto de las estrías recién hechas.
- Rozar una vez la superficie del conjunto original de estrías con el asa de inocular y hacer un segundo grupo de estrías. Tener cuidado de no cruzar ninguna de las estrías originales.
- Bajar la tapa de la caja, repetir nuevamente las estrías hasta abarcar toda la superficie de la placa.
- Incubar las cajas en forma invertida a 35 °C durante 24 horas.

9.2 Técnica de siembra en tubos con caldo y Agar nutritivo. (2)

Generalmente las bacterias son inoculadas o introducidas en medios líquidos conocidos como caldos para su propagación y conservación, así como para estudiar sus características de crecimiento.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Mechero Bunsen.
- Cultivo bacteriano reciente en caldo.
- Asa de inoculación.

- Caldo nutritivo estéril en tubos de ensayo.
- Agar nutritivo sólido en forma inclinada estéril.
- Incubadora a 35 °C

PROCEDIMIENTO:

Se recomienda realizar la técnica en zona aséptica junto a la llama del mechero bunsen. Se toman asadas de un cultivo bacteriano reciente (24 horas) y se inoculan en tubos conteniendo Agar nutritivo en caldo para ello se utiliza un asa estéril de la forma siguiente:

- Tener a la mano el tubo que contenga el cultivo del microorganismo y otro tubo que contenga el caldo nutritivo estéril.
- Tomar con una mano el asa de inocular flamearla por completo hasta que el asa se torne roja.
- Quitar los tapones de los tubos, cuidando de no acercarse demasiado los tapones al mechero Bunsen.
- Flamear los bordes de ambos tubos, insertar el asa de inoculación estéril dentro del cultivo bacteriano.
- Introducir el asa inoculada dentro del tubo con medio de cultivo estéril, agitándolo dentro del caldo.
- Flamear una vez más los bordes de los tubos y taparlos nuevamente.
- Flamear el asa al mechero para su esterilización.

- Rotular el tubo inoculado e incubarlo 35 °C de 24 a 48 h para cultivos de bacterias.

Los tubos con agar inclinado se inoculan según las siguientes indicaciones:

- Tener a la mano dos tubos conteniendo un cultivo bacteriano reciente en caldo y otro tubo con medio de cultivo estéril que se ha solidificado en forma inclinada (formando un bisel).
- Sujetar los tubos y el asa como se explica en la técnica anterior.
- Efectuar los pasos asépticos preliminares y remoción de tapones como se describe antes.
- Flamear el asa de inocular y tomar inóculo del tubo de cultivo.
- Introducir el asa sobre la superficie del agar inclinado, hasta el fondo del tubo de ensayo. Deslizar el asa sobre la superficie inclinada de lado a lado conforme se van sacando de ella para extraerla del tubo sin romper la superficie del Agar.
- Flamear los bordes de los tubos de ensayo y taparlos.
- Flamear otra vez el asa de inóculo.
- Incubar el tubo rotulado a 35 °C de 24 a 48 h.

9.3 Técnica de recuento en placa Plate Count. ⁽⁹⁾

La técnica se utiliza para indicar el nivel de bacterias presentes en una muestra y permite a diferencia de las pruebas expuestas anteriormente, cuantificar el número de microorganismos presentes en una muestra por el

método de conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Cada colonia que crece en el medio se considera una unidad a ser cuantificada.

El medio de cultivo idóneo para esta prueba es el Plate Count debido a la composición química rica en nutrientes que permite el crecimiento de cualquier tipo de microorganismos.

MATERIAL Y EQUIPO:

- Placas de Petri estériles
- Pipetas estériles de 1, 5 y 10 ml graduadas en unidades de 0.1 ml
- Botellas de dilución (160 ml), con tapones de goma
- Baño Maria con controlador termostático a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Incubadora $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Refrigerador para muestras a T^{a} $0\text{-}5\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Cuenta colonias Québec
- Agar Plate Count
- Buffer fosfato para diluir

PROCEDIMIENTO:

- Pesar 10 g o 10 ml de la muestra a analizar y adicionarlo en un frasco que contenga 90 ml de buffer fosfato pH 7.2 y para obtener 1:10 (10^{-1}).
- De la dilución 1:10 pipetear 1 ml y adicionarlo en un tubo que contiene 9 ml de buffer fosfato pH 7.2 y se tiene la dilución 1:100 (10^{-2}).

- De la dilución 1:100 pipetear 1 ml y adicionarlo en un frasco que contiene 9 ml de buffer fosfato pH 7.2 y tenemos la dilución 1:1000 (10^{-3}).
- De las diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 tomar 1 ml por duplicado de cada una de ellas y colocarlas en placas de petri estériles debidamente rotuladas.
- El medio de cultivo plate count estéril debe estar listo a T^a de 45 °C, colocar 20 ml de medio de cultivo por cada una de las placas de Petri a las que se adicionó 1 ml del inóculo, homogenizar las placas sobre la mesa de trabajo rotándolas en forma de ocho, dejar solidificar y luego incubarlas a T^a de 37 °C durante 24 – 48 h.
- Contar las colonias con la ayuda de un cuenta colonias.

Nota: Llevar una placa control utilizando 1 ml de agua estéril, en lugar de muestra.

No apilar las placas al verter el Agar o cuando se esta solidificando.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN PLATE COUNT: ⁽⁹⁾

Se debe realizar la lectura llevando las placas a un conteo minucioso en un cuenta colonias Québec, el número de colonias presentes en cada dilución depende de la naturaleza de la muestra y su grado de contaminación. Cada colonia se considera como un UFC (Unidad Formadora de Colonias).

El factor dilución puede hacer difícil el conteo de las placas desde un punto bajo, menor de 25 unidades formadoras de colonias hasta placas muy apretadas de mayores de 250 UFC.

Estas últimas pueden ser difíciles de contar o pueden inhibir el desarrollo de algunas bacterias para lo cual se sigue la siguiente guía:

- Para placas normales 25-250 UFC, se cuentan todas las unidades formadoras de colonias incluyendo las de tamaño de punta, registrar el número de colonias y la dilución de la placa.
- Placas con un número mayor de 250 unidades formadoras de colonias en todas las diluciones se registra como demasiado numerosas para contar.
- Placas sin UFC en cada una de las diluciones se registran con un asterisco para denotar que el conteo está fuera del rango de 25-250 UFC.

Para evitar crear una impresión ficticia de la precisión y exactitud en la lectura de los resultados obtenidos de UFC, se utilizan únicamente los primeros dos dígitos significativos.

Se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula: } N = C / [(1 * n1) + (0.1 * n2)] * (d)$$

Donde N = número de colonias por ml o g del producto.

$\sum C$ = suma de todas las colonias presentes en todas las placas.

n1 = número de colonias contadas en la primera dilución.

n2 = número de colonias contadas en la segunda dilución.

d = número de la segunda dilución.

10. PRUEBAS Y TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM (+) Y GRAM (-).

10.1 Técnicas de identificación de bacterias Gram (+).

10.1.1 Prueba de la Catalasa (Pba. Bioquímica). ⁽¹⁴⁾

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es ***Streptococcus***.

Originalmente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros: ***Streptococcus*** (-) de ***Micrococcus*** (+) y/o ***Staphylococcus*** (+).

Bacillus (+) de ***Clostridium*** (-).

Una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente puede hacerse siguiendo la técnica que se presenta a continuación.

PROCEDIMIENTO:

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 h y colocar el inóculo sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta pasteur una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

Nota: Si se invierte el orden del método extender la colonia sobre el agua oxigenada puede producir falsos positivos.

- También puede agregarse 1 ml de H₂O₂ al 3% directamente a un cultivo puro de Agar en tubo de ensayo con tapón de rosca densamente inoculado.

LECTURA:

Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Precauciones: Si se utiliza para esta prueba cultivos procedentes de Agar sangre, se debe tener la precaución de no retirar Agar con el asa al tomar la colonia, ya que los eritrocitos del medio contienen catalasa y su presencia dará un resultado falso positivo (Fig.27).



Fig. N° 27: Catalasa visible por las burbujas que se presentan en test de la izquierda.⁽⁶⁾

10.1.2 Prueba de la coagulasa (Pba. Bioquímica). ⁽¹⁴⁾

La prueba de la coagulasa con plasma de conejo es utilizada para investigar colonias sospechosas de ser *Staphylococcus aureus* el cual es positivo para la prueba de la coagulasa.

PROCEDIMIENTO:

- Transferir colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* a tubos conteniendo caldo BHI (Caldo de Infusión Cerebro Corazón) y emulsionar a fondo.
- Incubar el caldo BHI a 35 °C y a 18-24 h.
- Agregar 0.5 ml de plasma de conejo reconstituida con EDTA a los tubos conteniendo el caldo BHI examinar periódicamente sobre un tiempo aproximado de 6 h para observar la formación del coagulo.

LECTURA:

Solamente un coagulo firme y completo que permanece en su lugar cuando se inclina o se invierte el tubo puede considerarse prueba positiva para *Staphylococcus aureus*. Aquellos tubos que dan reacción negativa o aquellas sospechosas se les realizan la tinción al Gram y posterior observación al microscopio (Fig. 28).

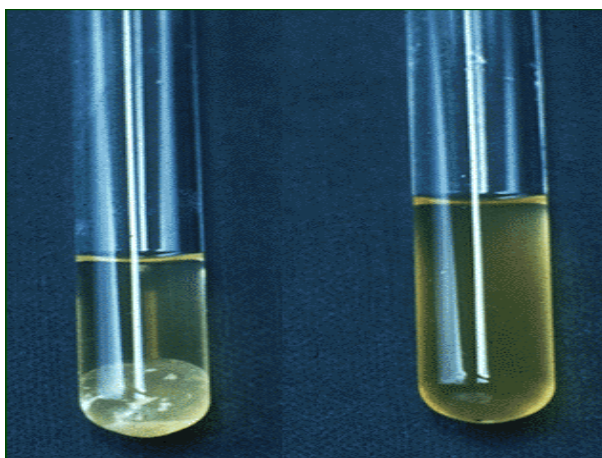


Fig. N° 28: Prueba de la coagulasa positiva (tubo izquierdo). (6)

10.1.3 Técnica de identificación y aislamiento para *Staphylococcus aureus* utilizando medio Baird Parker. ⁽⁹⁾

Baird Parker propuso un esquema de clasificación para las especies de *Staphylococcus* basado en sus características bioquímicas, la importancia de la identificación del *Staphylococcus aureus* se debe a su patogenicidad debido a los productos tóxicos que contiene como la coagulasa presentes y la actividad necrótica debida a la leucocidina presente que es responsable de infecciones oportunistas en el hombre.

EQUIPO Y MATERIALES:

- Placas de Petri estériles.
- Pipetas estériles de 1, 5 y 10 ml graduadas en unidades de 0.1 ml.
- Botellas de dilución, con tapones de goma.
- Incubadora.
- Cuenta colonias Québec.

MEDIOS Y REACTIVOS:

- Medio de Baird-Parker
- Buffer fosfato
- Agar de Extracto de levadura Tryptona

PROCEDIMIENTO:

- Pesar 10 g o 10 ml de muestra y diluir en frasco de dilución con 90 ml de buffer fosfato, mezclar durante 2 minutos.
- Tomar con pipeta estéril 1 ml de la muestra y colocarlas en 1 placa de Agar Baird Parker, distribuyendo uniformemente el inóculo sobre la superficie de la placa por rotación de la placa con la mano.
- Conservar las placas en la posición horizontal hasta que el inóculo sea absorbido por el Agar (cerca de 10 minutos en las placas correctamente secadas).
- Incubar las placas a 35 °C por 45 ± 48 h.

LECTURA:

Las placas con colonias típicas de ***Staphylococcus aureus*** que se caracterizan por ser colonias circulares, lisas, convexas, húmedas de un tamaño de 2-3 milímetros de diámetro, de color negro azabache, grises en el margen externo, su consistencia es mantecosa o gomosa al tocarla con una aguja.

Es importante considerar que las muestras congeladas o desecadas por largos periodos podrían presentar colonias con menor coloración negra que las típicas y pueden con frecuencia tener aspecto áspero y textura seca.

Después de la lectura de las placas se procede a realizar la prueba de la coagulasa a las colonias sospechosas de ser ***Staphylococcus aureus***.

10.1.4 Técnica de identificación y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en placas PETRIFILM^{3M} Staph Express. (20)

Los *Staphylococcus* son la causa de enfermedades tales como la Staphyloenterotoxiosis, y Staphyloenterotoxemia; los estafilococos por otra parte forman parte de la flora normal de nariz, garganta, piel y pirineo en el hombre así como en algunos animales como puercos, aves y ganado.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Placas PETRIFILM^{3M} Staph express estériles.
- Pipetas estériles.
- Frasco de dilución estéril.
- Incubadora.
- Cuenta colonias Québec.
- Aplicador para placas PETRIFILM^{3M}

PROCEDIMIENTO:

- Pesar o pipetear el producto en un contenedor estéril adecuado (frasco de dilución).
- Diluir la muestra en solución salina estéril (0.85 - 0.90%).
- Mezclar u homogenizar la muestra, ajustar el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2 (para productos ácidos, usar NaOH 1 N, para productos alcalinos usar HCl 1 N) auxiliándose de papel pH o de un potenciómetro.
- Colocar la placa PETRIFILM[®] Staph Express en una superficie plana, levantar el film superior.

- Con una pipeta colocada de forma perpendicular a la placa de PETRIFILM®, colocar 1 ml de la muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire, no dejarlo caer.
- Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inculo.
- Con cuidado, ejercer presión sobre el aplicador para repartir el inculo sobre el área circular antes de que se forme el gel.
- No girar ni deslizar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.

INCUBACIÓN:

Incubar a 35 °C por 24 ± 2 h

LECTURA:

Contar las colonias rojas – violetas que corresponden ***Staphylococcus aureus*** (Fig. 29).

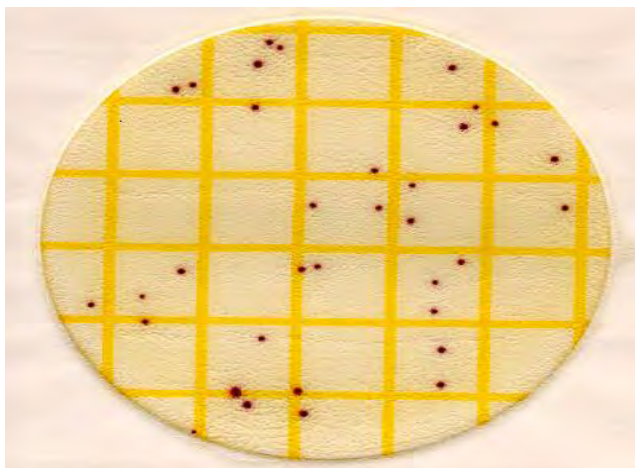


Figura N° 29: ***Staphylococcus aureus*** positivo colonias color violeta (20).

10.1.5 Técnica de identificación de bacterias Gram (+) utilizando API Staph. (3)

El sistema de identificación de *Estafilococos* y *Micrococcos*, API Staph consta de 19 pruebas bioquímicas y un control negativo para la especificación de *estafilococos* de origen humano y veterinario y su diferenciación entre *Staphylococos* y *Micrococcus*.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Cultivo microbiano reciente.
- Galería API Staph.

PREPARACION DE LA SUSPENSION BACTERIANA:

- Verificar que la cepa pertenece a la familia Micrococcaceae (mediante tinción de Gram, prueba de la catalasa etc.).
- En 5 ml de agua destilada estéril hacer una suspensión homogénea de la bacteria.
- Llenar los microtubos hasta la altura del menisco.
- A las pruebas ADH y URE adicionar unas gotas de aceite mineral.
- Incubar la galería entre 35-37 °C durante 18 h.

LECTURA DE LA GALERIA API STAPH:

- Debe realizarse con la ayuda de la tabla de lectura (Tabla 8).
- Anotar en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y las obtenidas con la adición de reactivos.

- Después de la incubación, examinar el microtubo que corresponde a la glucosa, si es claramente amarillo, proceder con la lectura de la galería. Si aun persiste el color naranja, reincubar 24 h más.
- Los test de acidificación deben leerse por comparación a los testigos negativos o positivos de GLU (Glucosa) los test MNE (D- Manosa) y XLT (Xilitol) pueden verse naranjas cuando los test que los rodean o preceden son positivos. En este caso se le debe interpretar como negativos.
- Llenar la hoja de resultados API Staph para obtener un código de 7 dígitos único para cada especie el cual se introduce en el sistema APILAB PLUS, el cual nos brindará la identidad de la cepa que analizamos.

Tabla Nº 8: LECTURA API STAPH. (3)

TEST	SUBSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADO	
			NEGATIVO	POSITIVO
0	Ninguno	Testigo negativo	Rojo	-----
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-glucosa D-fructosa D-manosa Maltosa Lactosa D-trehalosa D-Manitol Xilitol D-Melibiosa	Testigo positivo Acidificación a partir del carbohidrato	Rojo	Amarillo
NIT	Nitrato de potasio	Reducción de nitratos a nitritos	NIT 1 + NIT 2 - 10 mn Incoloro Rojo	
PAL	β - naftil fosfato	Fosfatasa alcalina	ZYM A + ZYM B - 10 mn Amarillo Violeta	
VP	Piruvato de sodio	Produccion de acetil-metil- carbinol	VP 1 + VP 2 - 10 mn Incolora Violeta rosa	
RAF XYL SAC MDG NAG	Rafinosa Xilosa Sacarosa Alfa-metil glucosa N - acetil-glucosa	Acidificación a partir del carbohidrato	Rojo	Amarillo
<u>ADH</u> <u>URE</u>	Arginina Urea	Arginina dihidrolasa Ureasa	Amarillo Amarillo	Rojo Rojo Violeta

10.1.6 Técnica de identificación de bacterias Gram (+) utilizando API

Strep (3).

El sistema de API 20 STREP se compone de una galería de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares.

Los microtubos son inoculados con una suspensión de la bacteria realizada a partir de un cultivo puro. Las reacciones que se producen durante el periodo

de incubación se traducen en variaciones de color, espontáneas o reveladas mediante la adición de reactivos.

Los test de identificación son inoculados con un medio enriquecido que tiene un indicador de pH el que rehidrata los azúcares. La fermentación de los hidratos de carbono trae consigo una acidificación que se traduce en la modificación espontánea del indicador de color. La lectura de estas reacciones se lleva a cabo consultando la tabla de lectura y la identificación se obtienen con la ayuda de el catalogo analítico o el programa de identificación APILAB PLUS.

A continuación se describen los reactivos especiales que requiere el sistema API Strep (Tabla 9).

Tabla Nº 9: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE REACTIVOS PARA API STREP. (3)

REACTIVOS	COMPOSICION QUIMICA
Suspensión médium 2 ml	Agua desmineralizada
API GP médium 2 ml.	Cistina 0.5 g
	Tristona 20.0 g
	Cloruro de sodio 5 g
	Sulfito de Sodio 0.5 g
	Rojo de fenol 0.17 g
	Agua desmineralizada csp. 1000 ml
Reactivo NIN 5 ml.	Ninhidrina 7 g
	2-metoxi-etanol 100 ml
Reactivo VP 15 ml	Hidroxido de potasio 40 g
	Agua 100 ml

Tabla N° 9. Continuación.

Reactivo VP 25 ml	Alfa naftol	6 g
	Etanol	100 ml
Reactivo ZYM A 8 ml	Tris-hidroximetil-aminometano	25 g
	HCl 37%	11 ml
	Laurel sulfato de sodio	10 g
	Agua	100ml
Reactivo ZYM B 8 ml	Fast Blue BB	0.35 g
	2-metoxi-etanol	100ml

CONSERVACION DEL EQUIPO Y REACTIVOS API 20 STREP:

Las galerías API 20 STREP medio se conservan a 2 - 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el equipo.

El reactivo NIN es muy sensible a trazas de agua y aire, para ello transferirlo a un frasco cuentagotas mediante una pipeta muy seca y conservarlo bien cerrado.

El reactivo ZYM B presenta en su estado normal color amarillo. Eliminarlo si sufre cambio en su coloración de amarillo a rosado (signo de alteración).

Con el frío ZYM A produce un precipitado que no altera sus propiedades y que desaparece dejándolo a temperatura ambiente.

La interpretación de los resultados del test debe ser realizada por un analista teniendo en cuenta el contexto clínico, el origen de la muestra, los aspectos macro y microscópicos y, eventualmente, los resultados de otros test y en particular el antibiograma

PREPARACION DE LA MUESTRA:

- Después del aislamiento y verificación de que la cepa a identificar pertenece al género ***Streptococcus*** (tinción de Gram, Catalasa) anotar el tipo de hemólisis que presenta y anotarlo en la hoja de identificación API como test N° 21.
- Tomar una colonia bien aislada y hacer una suspensión bien homogénea en 0.3 ml de agua destilada estéril.
- Inundar con la suspensión bacteriana una placa de Agar sangre.
- Incubar 18 - 24 h a 35 – 37 °C en anaerobiosis.
- Los ***estreptococos*** B-hemolíticos y los ***Enterococos*** forman colonias de 24 horas de incubación. Para los otros ***estreptococos*** es preferible analizar cepas de 48 horas.
- Incubar a 18 h en anaerobiosis a 35 – 37 °C.
- Es preferible preparar 2 placas de cultivo cuando la cepa es susceptible de ser un ***Pneumococo*** (para obtener crecimiento suficiente).

PREPARACION DE LA SUSPENSION BACTERIANA:

En 2 ml de agua destilada estéril recoger la mayor cantidad de cultivo posible con el fin de obtener una suspensión muy densa del cultivo.

PREPARACION DE LA GALERIA API 20 STREP:

- El equipo y los reactivos deben estar a temperatura ambiente.
- Preparar una cámara de incubación con su tapa correspondiente.
- Repartir 5 ml de agua destilada estéril en los microtubos para tener una atmósfera húmeda.
- Anotar el número de cultivo en la parte central de la galería, sacar la galería de su bolsa hermética y colocarla en la cámara de incubación.

INOCULACION DE LA GALERIA API 20 STREP:

- En la primera mitad (test VP a ADH) repartir la suspensión precedente evitando la formación de burbujas (inclinarse ligeramente la cámara hacia arriba).
- Para los test VP al LAP colocar en cada cúpula 3 gotas de aceite mineral con una pipeta Pasteur.
- Desde la segunda mitad de la galería (test RIB a GLYG).
- Reunir el resto de la suspensión bacteriana y diluir en 5 ml de medio de cultivo estéril homogenizar bien.
- Repartir esta suspensión en los microtubos de la galería restantes.
- Llenar las cúpulas de los test subrayados ADH a GLYG con aceite mineral formando un menisco convexo.
- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar a 35 – 37 °C durante 4 h para una primera lectura y 24 h. si es necesario para una segunda lectura.

LECTURA DE LA GALERIA API 20 STREP:

Debe realizarse con la ayuda de la tabla de lectura a las 4 h de incubación anotar en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y las obtenidas con la adición de reactivos después de 10 min.

Se reincubará en el caso de que el perfil no aparezca en el Index o cuando el resultado se acompañe de la nota ID no valida antes de 24 h.

Releer las reacciones ESC, ADH y RIB a LAP, anotando los resultados.

Añadir los reactivos:

Test VP: 1 gota de VP 1 y VP 2.

Test HIP: 2 gotas de NIN.

A los microtubos PYRA, Alfa-GAL, B-GUR, B-GAL, PAL, LAP agregar 1 gota de ZYM A Y ZYM B.

Esperar diez minutos, después de leer todas las reacciones remitiéndose a la escala de lectura o tabla de lectura, si es necesario exponer la galería a la luz de una lámpara de 1000 W durante 10 segundos para decolorar el reactivo en exceso en los tubos PYRA y LAP.

Tabla Nº 10: LECTURA API 20 STREP (3).

TEST	SUBSTRATOS	REACCIONES/ ENZIMAS	RESULTADOS			
			NEGATIVO		POSITIVO	
VP	Piruvato	Producción de acetoina	VP 1 + VP 2 hasta 10 mn			
			Incoloro		Rosa-Rojo	
HIP	Hipurato	Hidrolisis	NIN hasta 10 mn			
			Incoloro / azul pálido		Azul fuerte / violeta	
ESC	Esculina	β -glucosidasa	4h Incoloro Amarillo Pálido	24h Incoloro Amarillo pálido Gris claro	4h Negro Gris	24h Negro
PYRA	Pirrolidonil 2 naftilamina	pirrolidonilamida dasa	ZYM A + ZYM B (PYRA a LAP) (10 mn) si es necesario decolorado por luz intensa (1)			
			Incoloro o Naranja muy pálido		Naranja	
∞ GAL	6-Bromo-2-Naftil ∞ D- galactopiranosid o	Pirrolidonilamida dasa	Incoloro		Violeta	
β GUR	Naftol AS-BI β -D-glucoronato	β glucoronidasa	Incoloro		Azul	
β GAL	2-Naftil- β -D galactopiranosid o	Galactosidasa	Incoloro o violeta pálido		Violeta	
PAL	2-Naftil fosfato	Fosfatasa alcalina	Incoloro o violeta pálido		Violeta	
LAP	L Leucina-2 naftil Amida	Leucina amilamidasa	Incoloro		Naranja	
<u>ADH</u>	Arginina	Arginina dihidrolasa	Amarillo		Rojo	
			4h	24h	4h	24h
<u>RIB</u>	Ribosa	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>ARA</u>	L- Arabinosa	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>MAN</u>	Manitol	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>SOR</u>	Sorbitol	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo

Tabla N° 10. Continuación.

<u>LAC</u>	Lactosa	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>TRE</u>	Trehalosa	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>INU</u>	Inulina	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>RAB</u>	Rafinosa	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>AMD</u>	Almidon (2)	Acidificación	Rojo	Naranja/rojo	Naranja/ Amarillo	Amarillo
<u>GLYG</u>	Glicógeno	Acidificación	Rojo o Naranja		Amarillo	

(1) En el caso de una segunda lectura a las 24 h, de incubación, puede aparecer un depósito en las cúpulas donde se añadieron los reactivos **ZYM A** y **ZYM B**. Este fenómeno es normal y no debe ser tenido en consideración

(2) La acidificación del almidon es con frecuencia menos fuerte que la de los otros azúcares

10.2 Técnicas de identificación de bacterias Gram (-).

10.2.1 Prueba del Indol (Pba. Bioquímica). ⁽¹⁴⁾

Utilizada para diferenciar bacterias que producen triptofanasa, convirtiendo el triptofano en indol, utilizando como medio de cultivo el caldo de Tryptona con NaCl 0.5 %.

PROCEDIMIENTO:

- Para la realización de esta prueba la bacteria se cultiva durante 24 - 48 h en un caldo de Tryptona con NaCl al 0.5%
- Para la posterior detección del indol se usa el reactivo de Kovacs que se puede preparar con los siguientes ingredientes:

Alcohol amílico o isoamílico (y/o butanol)	150 ml
p-dimetilaminobenzaldehido	10 g
HCl	50 ml

Se disuelve primero el aldehído en el alcohol y después se agrega lentamente a esta mezcla el ácido.

Al añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs al medio de cultivo se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. Si esto ocurre después de 24 h, la prueba se considerará completa, pero si es negativo deberá incubarse otras 24 h y repetirse la prueba. Por ello es conveniente hacer siempre la prueba no en el tubo incubado sino en una porción de unos 2 ml que se retira de él asépticamente (Fig. 30).

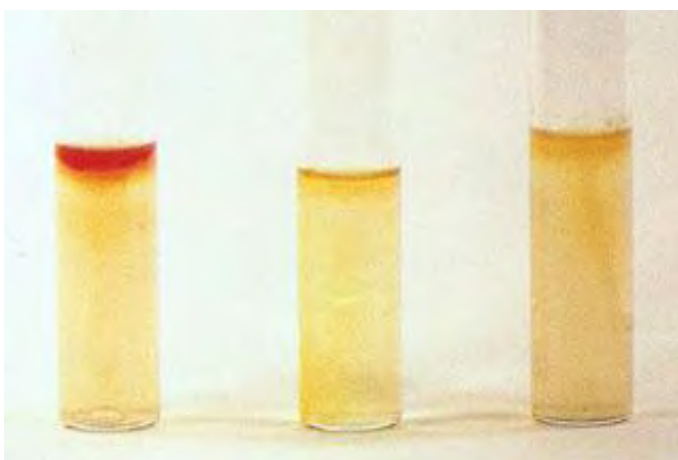


Fig. N° 30: Producción del indol, reacción positiva (tubo izquierdo) (5)

10.2.2 Prueba TSI Agar hierro tres azúcares (Pba. Bioquímica). (14)

Medio TSI nutritivo y diferencial, que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un medio, además permite la identificación de la producción de H_2S .

La degradación del azúcar con formación de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador rojo de fenol que vira de anaranjado-rojizo a amarillo o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro de color negro.

PROCEDIMIENTO:

El medio de cultivo preparado es claro y de color anaranjado. Se siembra el cultivo puro sometido a investigación tanto por estría en la superficie inclinada como en la columna vertical mediante estría central.

INCUBACIÓN:

Se incuba desde 24 hasta 48 h a 37° C.

LECTURA:

Parte superior del tubo y fondo del tubo alcalino (Color rojo intenso) azúcares sin fermentación.

Parte superior del tubo color rojo (alcalino) y fondo del tubo negro, glucosa fermentada, lactosa y sacarosa sin fermentación, producción de ácido sulfhídrico.

Parte superior del tubo color rojo (alcalino) fondo del tubo amarillo (ácido) glucosa fermentada, lactosa y sacarosa no fermentada, producción de gas.

Parte superior del tubo y fondo del tubo color amarillo lactosa y/o sacarosa y glucosa fermentada, producción de ácido sulfhídrico.

10.2.3 Prueba del citrato (Pba. Bioquímica). ⁽¹⁴⁾

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan los siguientes géneros: ***Enterobacter*, *klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*** y algunas especies de ***Salmonella***. Sin embargo, ***Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella paratyphi*** son incapaces de crecer con esos nutrientes.

PROCEDIMIENTO:

Se cultiva el microorganismo en Agar citrato de Simmons Este medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente y azul de bromotimol como indicador de pH.

LECTURA:

Solo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, un resultado positivo dará un color de verde a azul.

10.2.4 Prueba de la movilidad (Pba. Bioquímica). ⁽¹⁴⁾

Sirve para determinar la movilidad de las bacterias a consecuencia de la presencia de flagelos, aunque existen algunas formas de cocos móviles. El medio de cultivo manitol movilidad permite la realización de esta prueba

gracias a que es semisólido, y contiene solamente 3.5 g/L de Agar. En estas condiciones, las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por el contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron (Fig. 31).

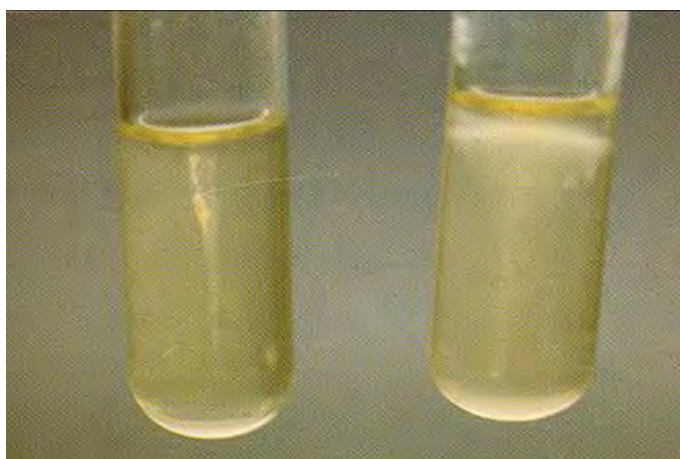


Fig. N° 31: *Listeria monocytogenes* en Agar Movilidad.⁽⁶⁾

10.2.5 Prueba rojo de metilo/Voges Proskauer (Pba. Bioquímica).⁽¹⁴⁾

Estas dos pruebas permiten la diferenciación dentro del grupo *coli* y *aerogenes*. Para la realización de estas dos pruebas se cultiva el microorganismo en caldo RMVP (medio de Clark y Lubs) y se incuba a 30 °C durante un periodo de 3 días como mínimo y 5 como máximo. Al revelar las pruebas, se separa el cultivo en dos porciones de unos 2.5 ml que servirá para cada uno de los ensayos

PROCEDIMIENTO:

Rojo de Metilo: A uno de los tubos se le añade unas gotas cuatro o cinco de solución indicadora de rojo de metilo. Se agita para homogenizar y se observa la coloración. Se considera positiva si vira al rojo y negativa si permanece amarillo.

Voges-Proskauer: A la otra porción de cultivo se le añaden 0.6 ml del reactivo A de Voges Proskauer (alfa-naftol 5% en etílico absoluto). El medio adquiere un aspecto lechoso, y 0.2 ml del reactivo B de Voges-Proskauer (KOH 40%). Desaparece el aspecto lechoso y se agita fuertemente. Si la prueba es positiva, antes de cinco minutos aparece un color rosado-violáceo, más o menos intenso, que se inicia en la parte superior del tubo. Si la prueba es negativa no aparece coloración alguna (Fig. 32).



Fig. N° 32: Prueba Voges Proskauer positiva (tubo izquierdo) y negativa (tubo derecho). (6)

10.2.6 Prueba de la Ureasa (Pba. Bioquímica). (14)

Esta prueba determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de ***Proteus*** y se utiliza sobre todo para diferenciar este género de otras Enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

PROCEDIMIENTO:

Se cultiva el microorganismo en Agar urea este medio se complementa después del autoclavado con 50 ml/L de urea. Esta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir enzima ureasa.

Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndole así de manifiesto la actividad ureasa.

Para revelar el resultado de esta prueba es importante tener en cuenta el tiempo de incubación ya que especies de ***Proteus*** vuelven alcalino el medio poco después de la inoculación y sus resultados deben ser leídos en las primeras 2-6 h, mientras que ***Citrobacter freundii*** y ***Klebsiella pneumoniae*** tienen actividad ureasa dentro de las 24 - 48 h de incubación (Fig. 33).

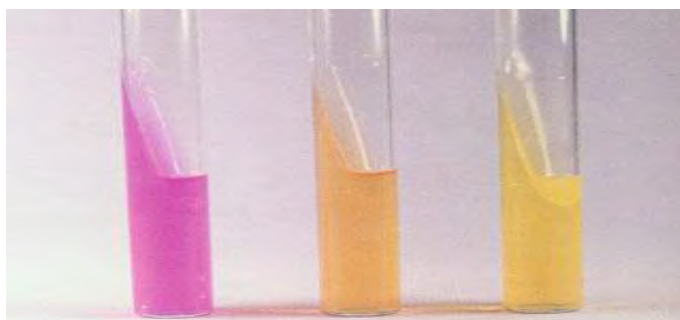


Fig. Nº 33: Prueba de la ureasa positiva (tubo izquierdo) y negativa (tubos restantes). (5)

Tabla Nº 11: Reacciones bioquímicas de Enterobacterias⁽¹⁴⁾.

Bacterias	TSI				Urea	Indol	Rojo de metilo	VP	Citrato	Movilidad
	Bisel	Fondo	Gas	H ₂ S						
<i>Shigella</i>	K	A	-	-	-	+ ó -	+	-	-	-
<i>E.coli</i>	A ó K	A	+ ó -	-	-	+	+	-	-	+ ó -
<i>Salmonella</i>	K	A	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	K	A	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	K ó A	A	+	+	- ó +	-	+	-	+	+
<i>Klebsiella</i>	A	A	+	-	- ó +	- ó +	- ó +	+	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	A	A	+	-	- ó +	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A	A	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	K	A	- ó +	-	- ó +	-	- ó +	+	+	+
<i>Serratia liquefaciens</i>	A	A	- ó +	-	- ó +	-	- ó +	+	+ ó -	+ ó -
<i>Proteus vulgaris</i>	A ó K	A	+	+	+	+	+ ó -	-	+ ó -	+
<i>Proteus mirabilis</i>	K	A	+	+	+	-	+	- ó +	+	+
<i>Providencia</i>	K	A	- ó +	-	-	+	+	-	+	+
<i>Edwarsiella</i>	K	A	+	3+	-	+	+	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	A	A	-	-	+	+ ó -	+	-	-	-
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	K	A	-	-	-	-	-	-	+	+

K: Alcalino color rojo.

A: Ácido color amarillo.

10.2.7 Técnica de identificación y cuantificación de bacterias coliformes

en Placas de PETRIFILM[®]. (20)

Las placas PETRIFILM[®] COLIFORMES contienen los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB) modificado, un agente solidificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de las colonias. El film superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por los coliformes.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Placas PETRIFILM[®] estériles.
- Pipetas estériles.
- Frasco de dilución estéril.
- Incubadora.
- Cuenta colonias.
- Aplicador PETRIFILM[®]

PROCEDIMIENTO:

- Pesar o pipetear la muestra en un contenedor estéril adecuado (frasco de dilución).
- Si es necesario, diluir la muestra en solución salina estéril (0.85 - 0.90%).
- Mezclar u homogenizar la muestra, ajustar el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2 (para productos ácidos, usar NaOH 1 N, para productos alcalinos usar HCl 1 N) auxiliándose de papel pH o de un potenciómetro.
- Colocar la placa PETRIFILM[®] en una superficie plana, levantar el film superior.
- Con una pipeta colocada de forma perpendicular a la placa de PETRIFILM[®], colocar 1 ml de la muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire, no dejarlo caer.

- Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo.
- Con cuidado, ejercer presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular antes de que se forme el gel.
- No girar ni deslizar el aplicador.
- Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.

INCUBACIÓN:

Se colocan las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas y luego el tiempo de incubación es 24 h a 35 °C para la mayoría de muestras.

LECTURA:

Las placas PETRIFILM[®] pueden leerse con un contador de colonias estándar o con otra lente de aumento iluminada (Fig. 34), para la cuantificación de bacterias seguir los mismos parámetros que para conteo de UFC en este manual.

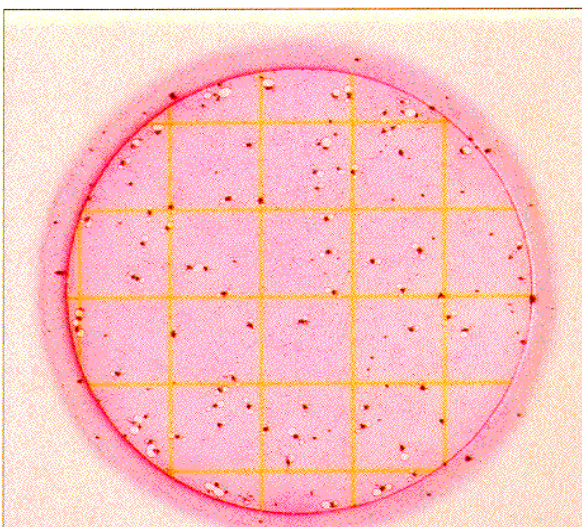


Fig. N° 34: Bacterias coliformes en Placa PETRIFILM[®]. (20)

10.2.8 Técnica de identificación y cuantificación de Bacterias ácido lácticas en Placas PETRIFILM®. (20)

El medio de cultivo en placas PETRIFILM® para la detección de bacterias ácido láctica contiene Agar Plate Count, gel, cloruro de trifenil tetrazolium (TTC) como indicador.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Placas PETRIFILM® estériles.
- Pipetas estériles.
- Frasco de dilución estéril.
- Incubadora.
- Cuenta colonias.

PROCEDIMIENTO:

Seguir el mismo procedimiento que para PETRIFILM® Coliformes (10.2.7) en este manual.

INCUBACIÓN:

Incubar a temperaturas de 30 a 35 °C durante 24 o 48 h en condiciones anaeróbicas

LECTURA:

Se observan colonias rojas o color café rojizo, las colonias con gas son propias de bacterias homofermentativas, y las colonias con gas heterofermentativas (Fig. 35).

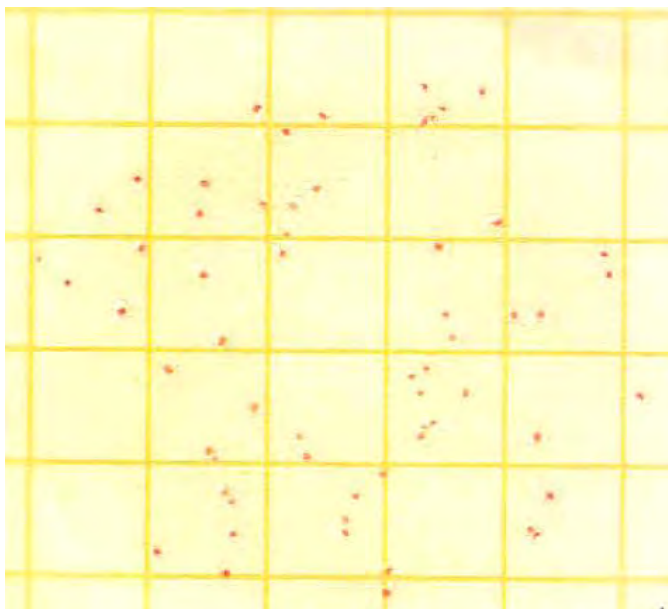


Fig. N° 35: Bacterias Acido lácticas en placas PETRIFILM® (20)

10.2.9 Técnica de identificación y cuantificación de *E. coli* en Placas PETRIFILM®.

Las placas PETRIFILM® *E. coli* están compuestas por los mismos componentes que el Agar Bilis rojo violeta, el cual contiene un indicador de trifenil tetrazolium, gel y un indicador de glucoronidasa.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Placas PETRIFILM® estériles.
- Pipetas estériles.
- Frasco de dilución estéril.
- Incubadora.
- Cuenta colonias.

PROCEDIMIENTO:

Se sigue el mismo procedimiento que para PETRIFILM® Coliformes en este manual (10.2.7).

INCUBACIÓN:

32 – 35 °C por 24 h

LECTURA:

Las colonias de *E. coli* se observan de color azul con gas (Fig. 36).

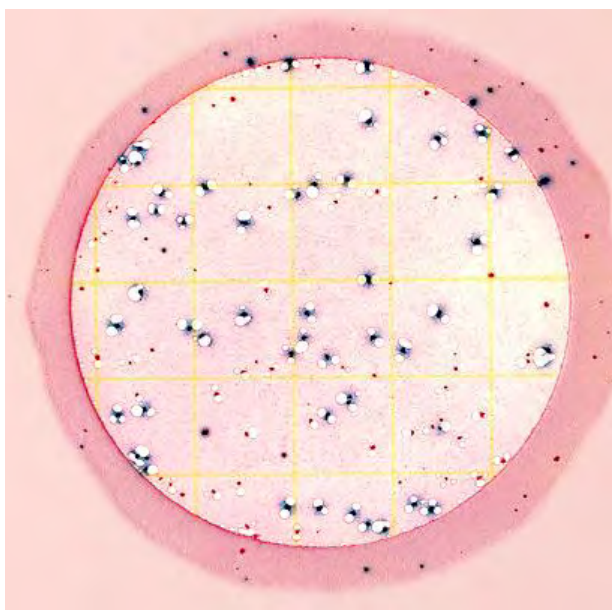


Fig. N° 36: *E. coli* en placa PETRIFILM® (20).

10.2.10 Técnica de identificación y cuantificación de Enterobacterias en Placas PETRIFILM®. (20)

Las placas PETRIFILM® contienen los nutrientes del Violeta rojo Bilis modificado, glucosa modificada, indicador de trifetil tetrazolium.

MATERIALES Y EQUIPO:

- Placas PETRIFILM[®] estériles.
- Pipetas estériles.
- Frasco de dilución estéril.
- Incubadora.
- Cuenta colonias.

PROCEDIMIENTO:

Se sigue el mismo procedimiento que para placas PETRIFILM[®] Coliformes en este manual (10.2.7).

INCUBACIÓN:

Se incuban bajo una temperatura de 35 – 37 °C por 24 h.

LECTURA:

Colonias rojas con gas, colonias con zona amarilla y colonias rojas con zona amarilla y gas, son típicas de enterobacteriaceas patógenas y lactosa negativa como ***Salmonella***, ***Shigella*** y ***Yersinia*** (Fig. 37).

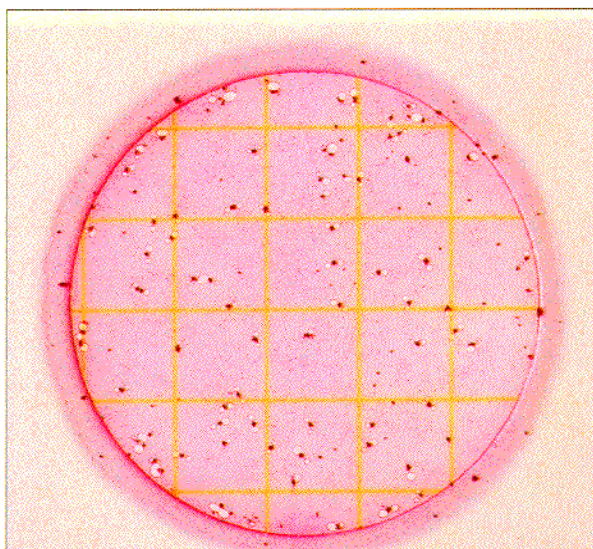


Fig. N° 37: Enterobacterias en placa PETRIFILM®. (20)

10.2.11 Técnica de cuantificación de Coliformes utilizando el NMP (Número Más Probable) ⁽¹⁶⁾.

Una de las técnicas desarrolladas para la detección de bacterias indicadoras en el agua es el de los tubos múltiples o número mas probable (NMP) el cual se fundamenta en la adición de diferentes cantidades de agua a tubos que contienen un medio de cultivo adecuado, las bacterias presentes en la muestra se reproducen y, a partir del numero de tubos inoculados y del número de tubos con reacción positiva, puede determinarse estadísticamente el número mas probable (NMP) de bacterias presentes en la muestra original de agua.

La técnica de tubos múltiples es aplicable a todo tipo de muestras en el caso del agua, se puede usar con agua limpia, coloreada, o con agua turbia que contenga aguas residuales, así como barro o partículas de tierra, siempre

que las bacterias estén distribuidas homogéneamente en las muestras preparadas para la prueba. (Tabla 12)

Tabla N° 12: NMP PARA DIFERENTES COMBINACIONES DE RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS CUANDO SE UTILIZAN CINCO PORCIONES DE 10 ml. ⁽¹⁶⁾.

Tubos con resultado positivo de 5 a 10 ml cada uno	NMP
0	0
1	2.2
2	5.1
3	9.2
4	16.0
5	Indeterminado

MATERIALES Y EQUIPO:

- Incubadora a 35 – 37 °C + 0.5 °C ó 44 + 0.5 °C
- Tubos con rosca preesterilizados conteniendo campanas de Durham
- Gradillas para tubos
- Pipetas estériles
- Frascos estériles para muestreo

PROCEDIMIENTO:

- El procedimiento se divide en las dos pruebas siguientes:

PRUEBA PRESUNTIVA: ⁽¹⁶⁾

- Ordene tres filas de cinco tubos con tapón de rosca y conteniendo una campana de Durham por tubo cada uno, rotular para cinco tubos de la

primera fila conteniendo 10ml del medio presuntivo caldo lactosado ⁽¹³⁾ en tubos conteniendo campanas de Durham.

- Con una pipeta estéril agregue 10 ml de muestra a cada uno de los cinco tubos en la fila 1. Con una pipeta estéril agregue 1 ml de muestra a cada uno de los cinco tubos de la fila 2.
- Con una pipeta estéril, agregue 0.1ml de la dilución a cada uno de los cinco tubos de la fila F3.
- Después de agitar suavemente los tubos para mezclar el inóculo, ponga a incubar la gradilla con los quince tubos a 35-37 °C durante 24 h.
- Al fin del periodo de incubación de 24 h, observe cada tubo para detectar la presencia de gas. Si hay gas, podrá vérselo en el tubo de Durham, si este no fuera visible, agite suavemente el tubo. Si se observa cualquier tipo de efervescencia (corrientes de burbujas diminutas), el tubo debe ser considerado como positivo.
- Anote el número de tubos positivos después de 24 h de incubación en un cuadro.
- Vuelva a incubar los tubos negativos por un periodo adicional de 24 h. Al final del periodo, observe los tubos para detectar la producción de gas. Se presume que la producción de gas al final de la incubación de 24 o 48 h, es causada por la presencia de organismos coliformes en la muestra.
- Anote el número de tubos positivos después de 48 h.

PRUEBA CONFIRMATIVA ⁽¹⁶⁾

La prueba confirmativa debe llevarse a cabo al finalizar, tanto la incubación de 24 h, como la de 48 h.

– Utilizando un asa estéril, transfiera una o dos asadas de cada tubo presuntamente positivo a su correspondiente tubo estéril de 10 ml para la confirmación; estos tubos contienen caldo bilis verde brillante (caldo BRILA)⁽¹³⁾.

– Antes de cada transferencia, esterilice el asa de inoculación sometiéndola al calor de la llama y luego dejándola enfriar.

Si también se va a investigar la presencia de coliformes fecales, dos tubos con caldo EC (medio de cultivo *Escherichia coli*) ⁽¹³⁾ para la confirmación de la presencia de coliformes fecales por 24 h a 44 ± 0.5 °C.

Si al término de las 24 h de incubación hay gas en los tubos, se confirma la presencia de coliformes fecales.

EJEMPLO PARA LA DETERMINACIÓN DEL NMP ⁽¹⁶⁾

El siguiente ejemplo muestra como se obtienen los resultados:

- 5 tubos positivos en la fila F1 (volumen de muestra inoculado 10 ml)
- 3 tubos positivos en la fila F2 (volumen de muestra inoculado 1 ml)
- 1 tubo positivo en la fila F3 (volumen de muestra inoculado 0.1 ml)

Por lo tanto los resultados pueden codificarse como 5-3-1, que representan el resultado de la prueba confirmativa para organismos coliformes. El cuadro

indica que un resultado codificado 5-3-1 (5 x 10 ml positivos, 3 x 1ml positivos, 1 x 0.1 ml positivos) da un valor de NMP de 109, es decir, que la muestra de agua contiene un número estimado de 109 organismos coliformes por 100 ml.

TABLA Nº 13: NMP CUANDO SE UTILIZAN CINCO PORCIONES DE 10 ml, CINCO PORCIONES DE 1 ml Y CINCO PORCIONES DE 0.1 ml. (16)

Numero de tubos que dan reacción positiva							
5 de 10 ml c/u	5 de 1 ml c/u	5 de 0.1 ml c/u	NMP	5 de 10 ml c/u	5 de 1 ml c/u	5 de 0.1 ml c/u	NMP
0	0	0	<2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	31
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	109
3	0	0	8	5	3	2	141
3	0	1	11	5	3	3	175
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	172
3	2	0	14	5	4	2	221
3	2	1	17	5	4	3	278
3	3	0	17	5	4	4	345
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	348
4	1	0	17	5	5	2	542
4	1	1	21	5	5	3	918
4	1	2	26	5	5	4	1609
4	2	0	22	5	5	5	≥2400

10.2.12 Método oficial para identificación de *Escherichia coli* y bacterias coliformes ⁽⁹⁾

MATERIALES Y EQUIPO:

- Baño Maria a Temperatura de $45.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Incubadora $35^{\circ}\text{C} \pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Pipetas estériles de 1.0, 10 ml.
- Botellas de dilución estériles con tapón de rosca.
- Cuenta colonias Quebec.
- Lámpara de Luz Ultravioleta no exceder de 6 W.
- Caldo fluorocult LMX
- Caldo de EC.

PROCEDIMIENTO:

- Pesar 10 ml de agua, agregar 90 ml de buffer fosfato y mezclar durante 2 minutos.
- Realizar las diluciones pipeteando 1 ml de la dilución de la muestra anterior en un tubo que contiene 9.0 ml de medio de cultivo fluorocult LMX₍₁₃₎ y tenemos la dilución 1:10 (10^{-1}).
- De la dilución 1:10 tomar 1 ml y lo adicionamos en otro tubo que contiene 9.0 ml medio de cultivo fluorocult LMX y tenemos la dilución 1:100 (10^{-2}).
- De la dilución 1:100 tomar 1 ml y lo adicionamos a otro tubo que contiene 9.0 ml medio de cultivo fluorocult LMX y tenemos la dilución 1:1000 (10^{-3})
- Incubar los tubos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por $24 \pm 2\text{ h}$.

- Examinar los tubos y registrar sus reacciones si hay cambio de color a verde debido a la reacción positiva.
- Reincubar los tubos que dieron negativo (sin cambio de color) por 24 horas más, luego realizar otra vez la lectura para detectar la formación de fluorescencia.

PRUEBA CONFIRMATIVA PARA COLIFORMES FECALES Y *E.coli* ⁽¹⁴⁾:

De cada tubo con reacción positiva de fluorocult LMX transferir un mililitro de cada suspensión a un tubo con caldo EC (caldo *Escherichia coli*) Incubar los tubos por 45.5 °C por 24 h examinarlos para detectar producción de gas, si la lectura es negativa, se reincuba 24 h más y se examina a las 48 h.

Utilizar los resultados de esta prueba para detectar la presencia de coliformes fecales.

Nota: Los análisis para coliformes fecales se hacen a 45.5 °C \pm 0.2 °C para distintas muestras y a 44.5 °C \pm 0.2 °C para muestras de aguas.

En lugar o alternativamente de las pruebas bioquímicas tradicionales (IMViC) se puede utilizar el análisis bioquímico miniaturizado API20E.

10.2.13 Técnica de identificación de bacterias Gram (-) utilizando API 20E . ⁽³⁾

Es un sistema de identificación para Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram (-). La galería esta compuesta de 20 microtubos los que se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los test. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneo o revelado mediante la adición de reactivos. La identificación se

obtiene con la ayuda de la tabla de lectura y el catalogo analítico de identificación APILAB PLUS (programa de computo).

Las galerías pueden conservarse hasta por 10 meses después de la apertura de la bolsa a 2 – 8 °C (o hasta la fecha de caducidad indicada en el envase si esta fuese anterior).

PROCEDIMIENTO:

- Al cultivo bacteriano que se analizará por API 20E se le realizará la prueba de la oxidasa, en la hoja de resultados API se anota como el test N° 21
- El equipo y los reactivos deben estar a temperatura ambiente.
- Repartir 5 ml de agua destilada estéril en la galería API 20 E para tener una atmósfera húmeda.
- Con una pipeta extraer una sola colonia bien aislada del cultivo bacteriano a analizar, colocar la colonia en un tubo de ensayo con 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril sin aditivos.
- Realizar una suspensión bacteriana homogenizando cuidadosamente las bacterias en el medio.
- Con la ayuda de una pipeta estéril tomar de la suspensión bacteriana y llenar los microtubos de la galería de izquierda a derecha hasta el borde del menisco.
- Llenar la cúpula de los microtubos que corresponden a las pruebas CIT VP y GEL con la suspensión bacteriana.

- Las pruebas subrayadas ADH, LDC ODC URE H₂S se llenará la cúpula con aceite mineral para obtener condiciones de anaerobiosis.
- Colocar la tapa e incubar a 35- 37 °C durante 18-24 h.

LECTURA DE GALERIA API 20 E :

- Después de la incubación, la lectura de la galería debe hacerse remitiéndose a la tabla de lectura (Tabla 13).
- En caso de que tres o más ensayos (test GLU + ó -), resultasen positivos, anotar en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y después revelar los ensayos que necesitan la adición de reactivos.
- Prueba TDA: Agregar una gota de reactivo TDA un color marrón rojizo indica una reacción positiva que se anotara en la hoja de resultados.
- Prueba IND: Agregar una gota de reactivo de JAMES, un color rosado que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva que se debe anotar en la hoja de resultados.
- Prueba VP: agregar una gota de los reactivos VP1 y VP2, esperar un mínimo de diez minutos. Un color rosa o rojo indica una reacción positiva que se anotara en la hoja de resultados, una débil coloración rosa diez minutos después debe considerarse prueba negativa.

NOTA: La prueba de investigación sobre la producción de Indol debe ser realizada en último lugar pues esta reacción libera gases que pueden alterar la interpretación de otras pruebas de la galería.

Si el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos incluyendo el ensayo de glucosa (GLU) es inferior a 3 se siguen las siguientes instrucciones:

Reincubar la galería 24 h \pm 2h suplementarias sin volver a añadir reactivos.

Revelar los ensayos que precisan adición de reactivos (como se explicó anteriormente).

INTERPRETACIÓN:

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.

Determinación del perfil numérico:

En la hoja de resultados, los test están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 o 4. Como la galería API 20 E comporta 20 ensayos sumando al anterior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras (a la reacción de la oxidasa que constituye el test N^o 21 se le asigna el valor de 4 cuando resulta positiva). Localizar el perfil numérico en la lista de los perfiles.

Tabla Nº 14: LECTURA API 20 E. (3)

TEST	SUSTRATOS	REACCIONES /ENZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	Ortonitrofenol-galactósido	B- galactosidasa	Incoloro	Amarillo ⁽¹⁾
ADH	Arginina	Arginina dehidrolasa	Amarillo	Rojo/naranja ⁽²⁾
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Naranja ⁽²⁾
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo/naranja ⁽²⁾
CIT	Citrato sodico	Utilización del citrato	Verde Palido/amarillo	Azulverde/azul ⁽³⁾
H ₂ S	Tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S	Incoloro grisáceo	Deposito negro
URE	Urea	Ureasa	Amarillo	Rojo/Naranja ⁽²⁾
TDA	Triptofano	Triptofano desaminasa	TDA /inmediato	
			Amarillo	Marrón oscuro
IND	Triptofano	Producción de indol	TDA /inmediato	
			Amarillo	Marrón oscuro
VP	Piruvato sodico	Producción de Acetoína	JAMES inmediato o IND/2 min	
			Incoloro verde claro/amarillo	James rosa IND anillo rojo ⁽⁵⁾
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	No hay difusión de pigmento negro	Difusión de pigmento Negro
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo
RHA	Samnosa	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	amarillo
MEL	Selibiosa	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo

Tabla N° 14. Continuación

ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación ⁽⁴⁾	Azul/azul verdoso	Amarillo
OX	Sobre de papel filtro	Citocromo oxidasa	OX / 1-2 min.	
			Incoloro	Rosado/rojo
NO3 NO2	Tubo GLU	Producción de NO2 reducción a gas N2	NIT 1 más NIT 2/ 2-3 min.	
			Amarillo	Rojo
MBO	API microscopía	Movilidad	Inmóvil	Móvil
MCC	Medio MacConkey	Crecimiento	Ausencia	Presencia
OF	Glucosa API OF	Cerrado fermentación	Verde	Amarillo

Nota: 1- Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo

2- Un color naranja después de 24H de incubación debe considerarse negativo

3- La lectura debe hacerse en la cúpula (aerobiosis)

4- La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación comienza en la cúpula.

5- Una ligera coloración rosa, que aparece tras diez minutos, debe ser leída como negativa.

10.2.14 Técnica de identificación de Bacterias Gram (-) utilizando API 20NE ⁽³⁾

Sistema estandarizado que combina 8 pruebas convencionales y 12 pruebas de asimilación para la identificación de bacterias Gram (-), que no pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae.

Aunque los no fermentadores constituyen un pequeño porcentaje de los aislamientos totales, en general requieren un mayor esfuerzo para su identificación, además de que requieren con mayor frecuencia pruebas especiales como ejemplo tenemos: ***Pseudomona, Acinetobacter, Moraxella, Aeromonas, Vibrio, Alcaligenes, Bordetella, Flavobacterium, Xantomonas.***

CONSERVACION DEL EQUIPO Y REACTIVOS API 20 NE:

Las galerías API 20 NE se conservan a 2° - 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el equipo.

PREPARACION DE LA GALERIA:

- El equipo y los reactivos deben estar a temperatura ambiente.
- Preparar una cámara de incubación con su tapa correspondiente.
- Repartir 5 ml de agua destilada estéril en la cámara para tener una atmósfera humedad.

PREPARACIÓN DE LA SUSPENSION BACTERIANA:

- Con ayuda de un aplicador estéril tomar las colonias seleccionadas.
- Resuspender la colonia en un tubo que contenga 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una suspensión homogénea.

INOCULACIÓN DE LA GALERIA API 20 NE:

- Con ayuda de una pipeta estéril tomar una alícuota de la suspensión bacteriana y llenar los microtubos de la galería de izquierda a derecha hasta el borde del menisco y hasta la prueba rotulada como PNPG.
- Abrir una ampolla de AUX Médium (Medio de cultivo específico incluido en la galería API) y transferir una alícuota de la suspensión bacteriana, homogenizar perfectamente y llenar los microtubos restantes hasta la cúpula.
- A las pruebas subrayadas, adicionar unas gotas de aceite mineral.
- Colocar la tapa e incubar a 30 °C durante 24 h.

LECTURA DE LA GALERIA API 20 NE:

Debe realizarse con la ayuda de la tabla de lectura (Tabla 14), anotando en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y las obtenidas con la adición de reactivos, el revelado de las pruebas NO₃ y TRP debe hacerse protegiendo las pruebas de asimilación del aire con la tapa de la cámara, en las pruebas de asimilación se debe observar el crecimiento bacteriano. Una cúpula con turbidez indica que la reacción es positiva.

Cuando a las 24 h el perfil obtenido no se encuentra en el Index antes de 48 h de incubación, tenemos que recubrir los test NO y TRP con aceite mineral e incubar de nuevo a 30 °C por 24 h más, excepto los tres primeros test NO, y GLU que deben leerse a las 24 horas.

Tabla N° 15: LECTURA API 20 NE ⁽³⁾

TEST	SUBSTRATOS	REACCIONES/ ANZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
NO3	Nitrato de potasio	Reducción de nitratos a nitritos	NIT 1 + NIT 2/5 mn.	
			Incoloro	Rosa-rojo
		Reducción de nitratos a azoe	Zn /5mn	
			Rosa	Incoloro
TRP	Tryptofano	Formación de indol	James inmediato	
			Incoloro pálido	verde Rosa
GLU	Glucosa	Fermentación	Azul verde	Amarillo
ADH	Arginina	Arginina dehidrolasa	Amarillo	Naranja, rosa rojo
URE	Urea	Ureasa	Amarillo	Naranja rosa rojo
ESC	Esculina	Hidrólisis(B-glucosidasa)	Amarillo	Gris, marrón, negro

Tabla N° 15. Continuación

GEL	Gelatina(con tinta china)	Hidrólisis proteasa	Sin difusión del pigmento	Difusión del pigmento negro
PNPG	p-nitro-fenil-BD galactopiranosido	B- galactosidasa	Incoloro	Amarillo
GLU	Glucosa	Asimilacion	Transparencia	Turbidez
ARA	Arabinosa	Asimilación	transparencia	Turbidez
MNE	Manosa	Asimilación	Transparencia	Turbidez
MAN	Manitol	Asimilación	Transparencia	Turbidez
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación	Transparencia	Turbidez
MAL	maltosa	Asimilación	Transparencia	Turbidez
GNT	Gluconato	Asimilación	Transparencia	Turbidez
CAP	Caprato	Asimilación	Transparencia	Turbidez
ADI	Adipato	Asimilación	Transparencia	Turbidez
MLT	Malato	Asimilación	Transparencia	Turbidez
CIT	Citrato	Asimilación	Transparencia	Turbidez
PAC	Fenil-acetato	Asimilación	Transparencia	Turbidez
OX	Tetrametil-p-fenilendiamina	Citocromo oxidasa	Incoloro	Violeta

11. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE HONGOS: LEVADURAS Y MOHOS ⁽²⁾

11.1 Técnica de identificación de hongos utilizando medio Papa

Dextrosa o Czapek Dox. ⁽²⁾

MATERIALES Y EQUIPO:

- Mechero bunsen.
- Asa en anillo.
- Placas de Petri conteniendo medio PDA (Papa Dextrosa Agar).
- Placas de Petri conteniendo medio Czapek Dox (específicos para hongos).
- Otros medios para hongos: Sabouraud, YPG (levadura, peptona, glucosa), foster etc.

PROCEDIMIENTO:

- Para sembrar los hongos filamentosos, separar una parte del micelio de los tubos de cultivo con el asa, previamente calentada y esterilizada en la flama del mechero y enfriada.
- Después, ubicar el micelio en el centro de una caja de Petri preparada con medio de cultivo PDA y de la misma manera inocular la caja con medio de Czapek- Dox ⁽¹⁴⁾.
- Las levaduras se inoculan por estría cruzada sobre la superficie de las cajas en forma similar a la inoculación de bacterias (ver, técnica estría cruzada para bacterias en este mismo trabajo).

- Colocar las cajas envueltas en papel y selladas con tirro alrededor de la placa en forma invertida, mantener a una temperatura de 28 - 30 °C por un periodo de 3 - 5 días.

LECTURA:

Luego de incubar las cajas de Petri el siguiente paso es hacer la descripción macroscópica de las colonias fúngicas, los aspectos a describir son forma, tamaño, color y tipo de colonia, así como las características del micelio (algodonoso, aterciopelado, veloso, arenoso cremoso, aéreo o pegado al medio) presencia de esporas, cambios en la composición del medio de cultivo, como hidrólisis, cambios de color cuando existen indicadores en el medio de cultivo (esto se debe a cambios en el pH del medio).

De las colonias fúngicas preparar un frotis al calor y teñir con azul de metileno, para observar las morfologías de las esporas e hifas.

Se hacen observaciones al microscopio con objetivos de 40 X y 100 X.

12. ESQUEMATIZACIÓN DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA PARA BACTERIAS.

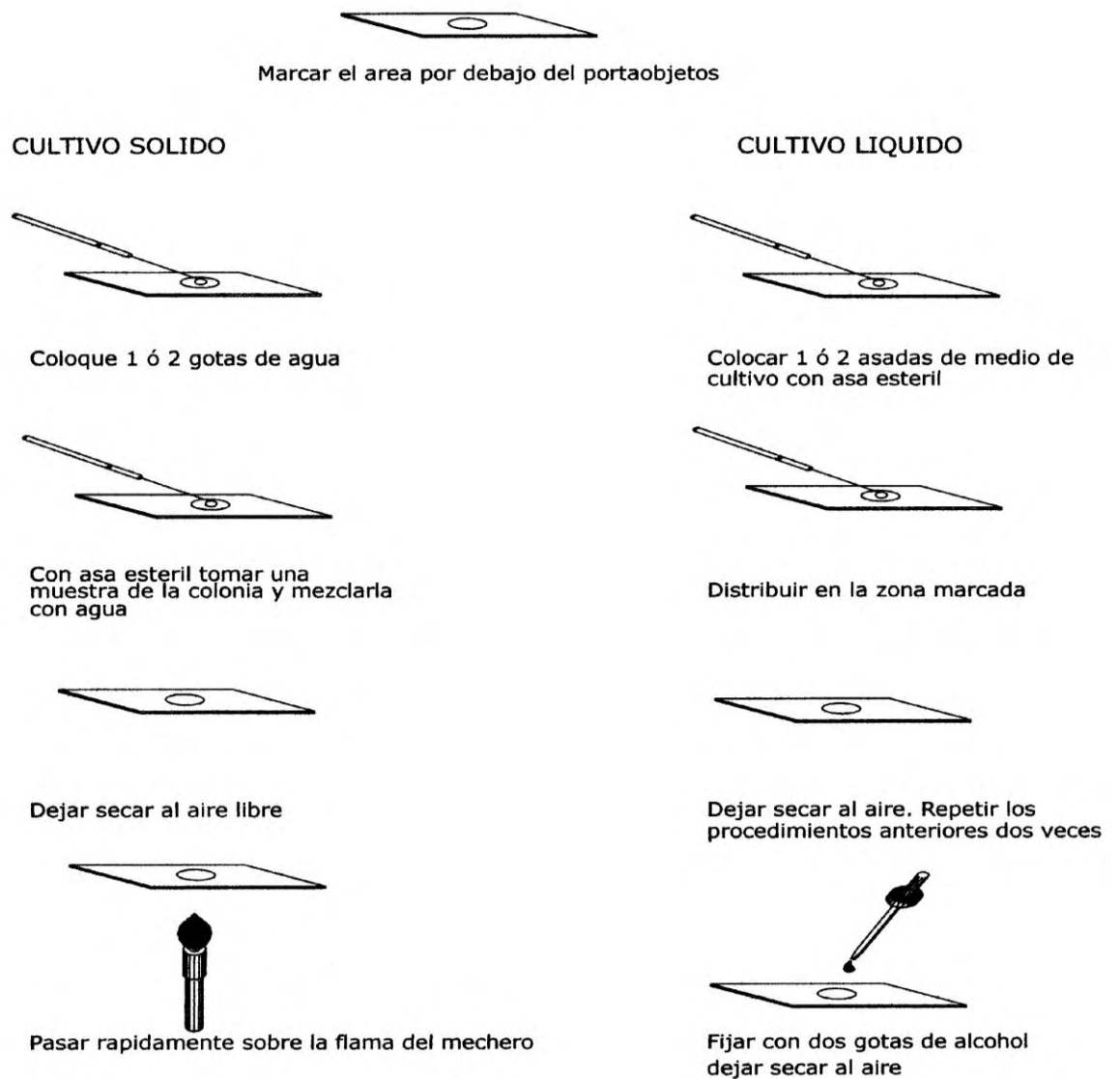
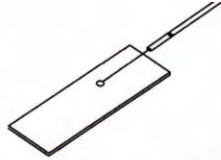


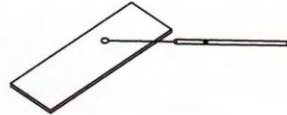
Fig. N° 38: Preparación de frotis bacteriano (2).

Coloque una asada del cultivo en medio líquido en una lamina limpia, o coloque una gota de agua o solución salina estéril y emulsione en ella una porción del crecimiento bacteriano en medio sólido.



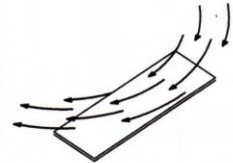
1

Esparcir en forma de capa delgada.



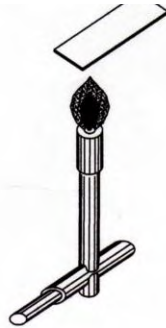
2

Seque al aire



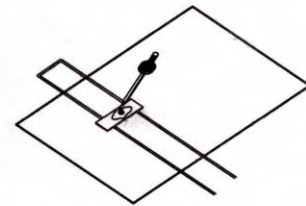
3

Fije el frotis pasándolo por la llama de dos a tres veces.



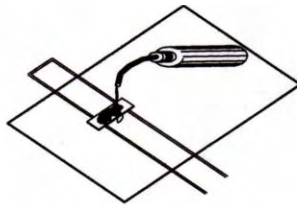
4

Colocar gotas de safranina durante 30 segundos a un minuto.



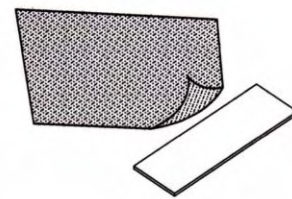
5

El exceso de colorante se elimina con lavado suave al agua corriente con la ayuda del frasco lavador conteniendo agua destilada.



6

Dejar secar al aire y observar al microscopio en objetivos 10X y 40X.



7

Fig. N° 39: Tinción simple de bacterias (2).

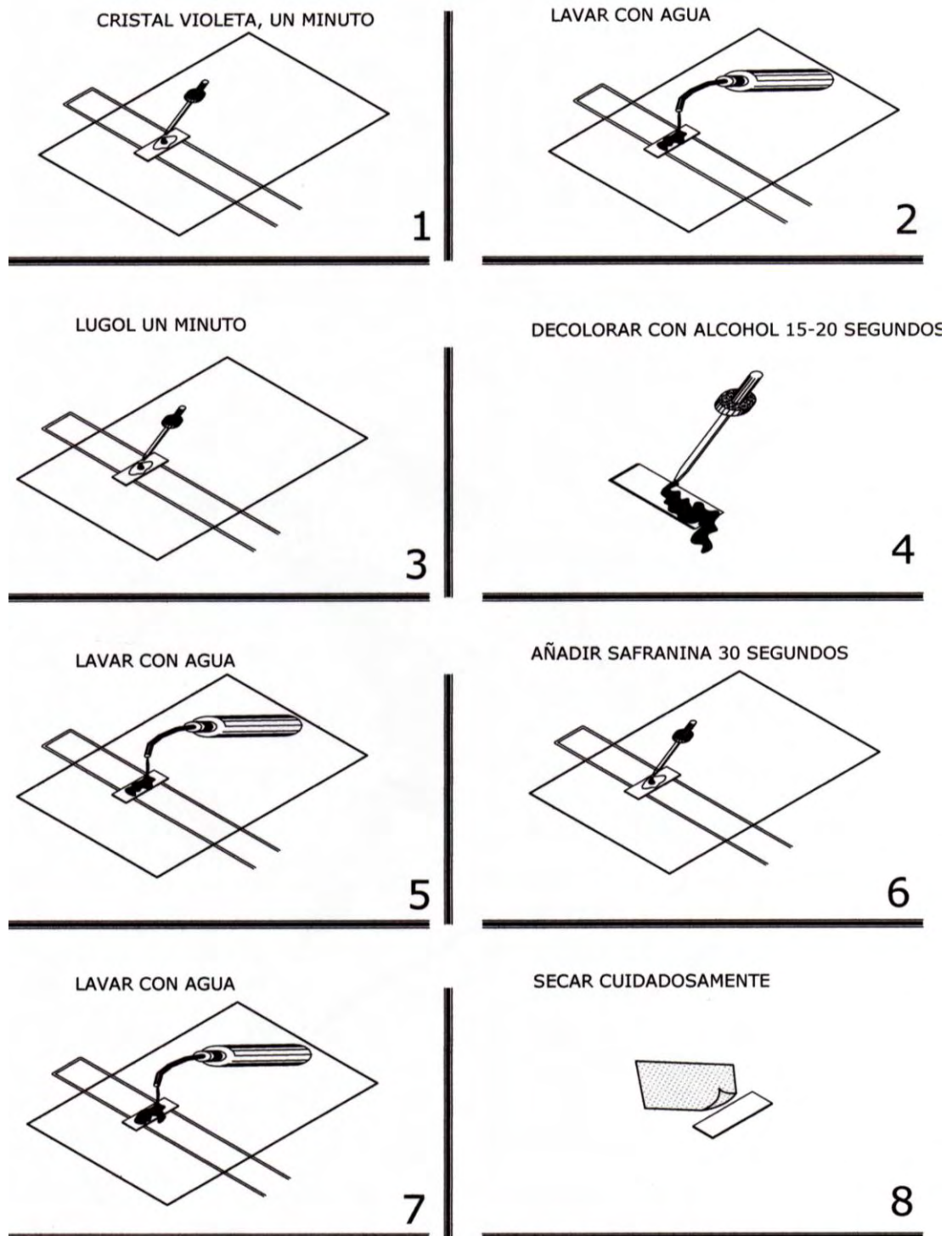


Fig. Nº 40: Tinción de Gram (2).

13. DESCRIPCIÓN MORFOLOGICA MICROSCOPICA DE BACTERIAS GRAM (+) Y GRAM (-) PATOGENAS UTILIZADAS EN MICROBIOLOGÍA GENERAL.

13.1 Bacterias Gram (+)

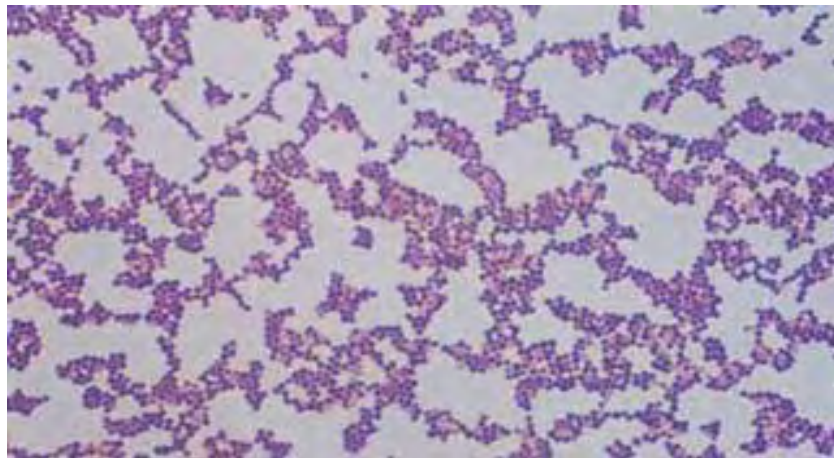


Fig. N° 41: Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus* ⁽⁵⁾



Fig. N° 42: Tinción de Gram de *Streptococcus* ⁽⁵⁾

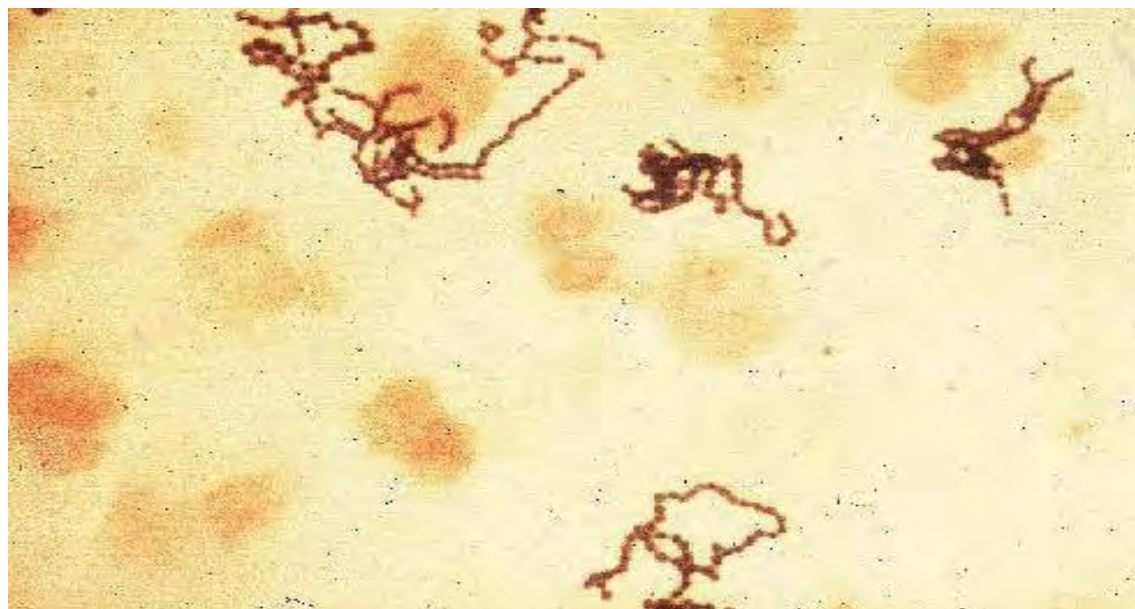


Fig. N° 43: *Streptococcus pyogenes* (5).

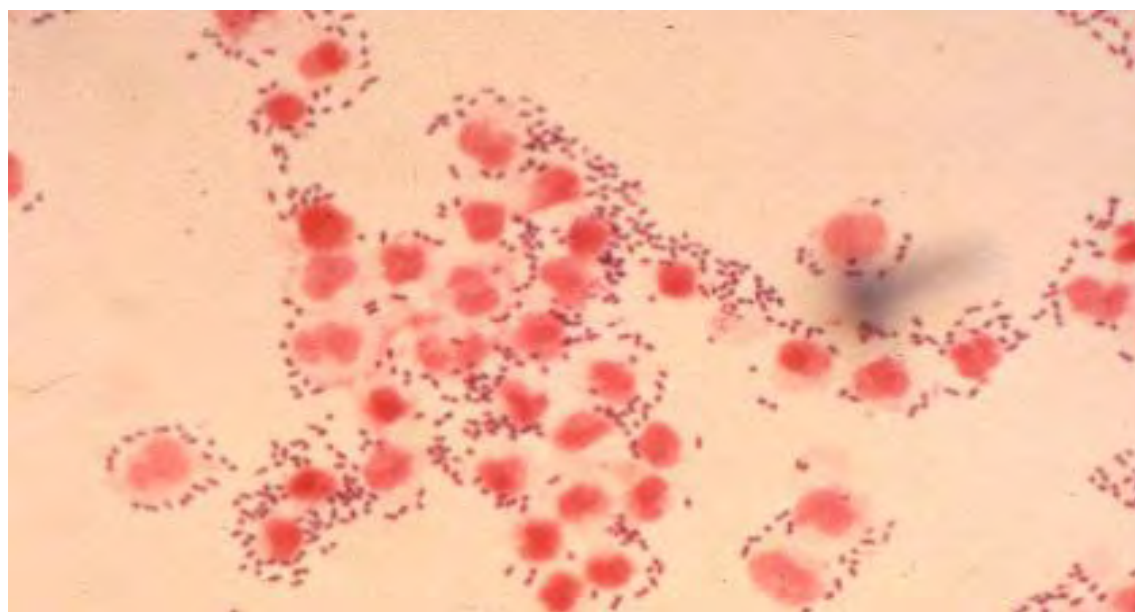


Fig. N° 44: *Streptococcus pneumoniae* (5)



Fig. N° 45: *Streptococcus agalactiae* (5)

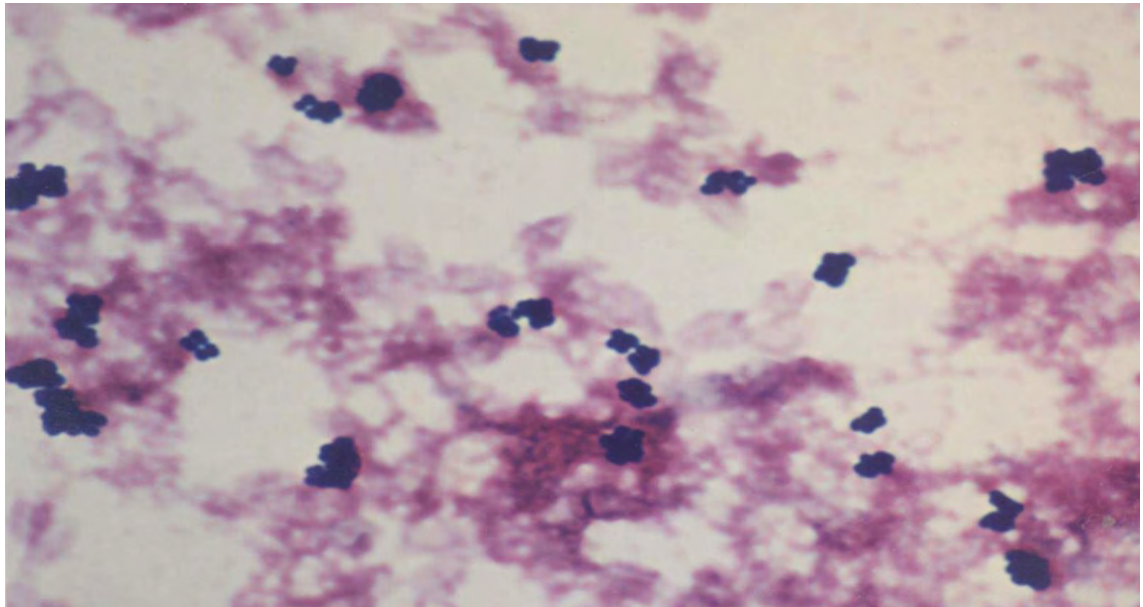


Fig. N° 46: *Staphylococcus epidermidis* (5)

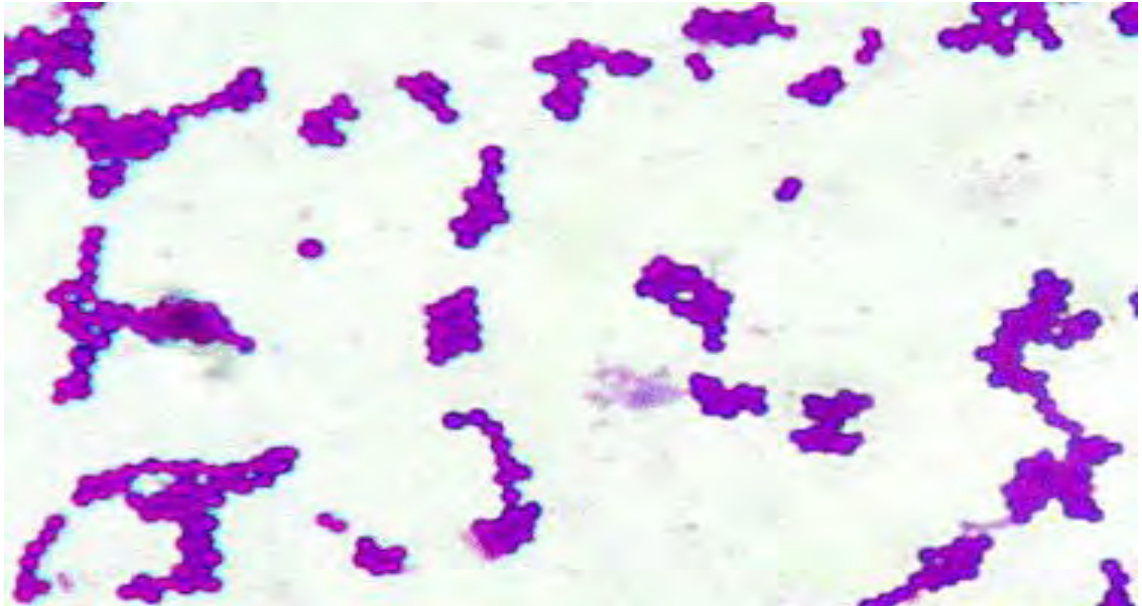


Fig. N° 47: *Staphylococcus aureus* (5)



Fig. N° 48: *Staphylococcus aureus* (5)

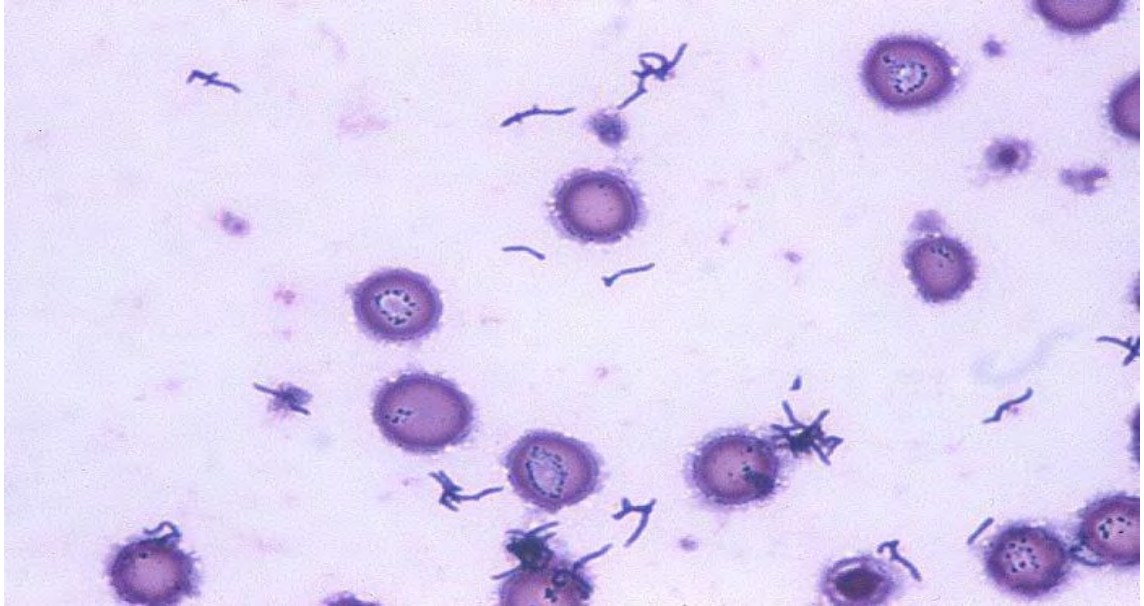


Fig. N° 49: *Propionibacterium acnes* (5)

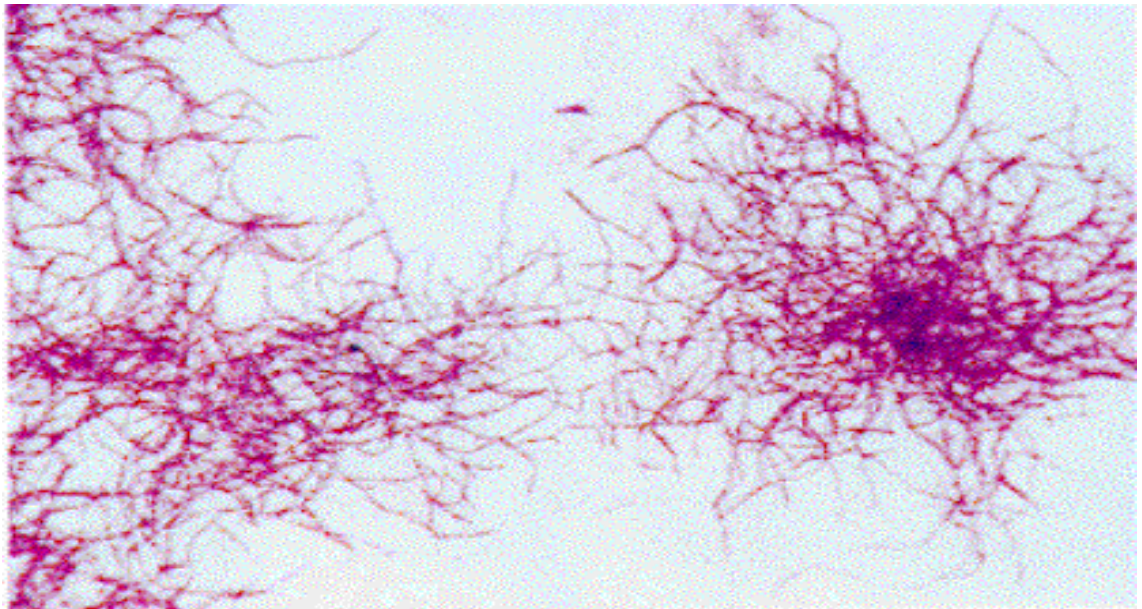


Fig. N° 50: *Nocardia sp* (5)

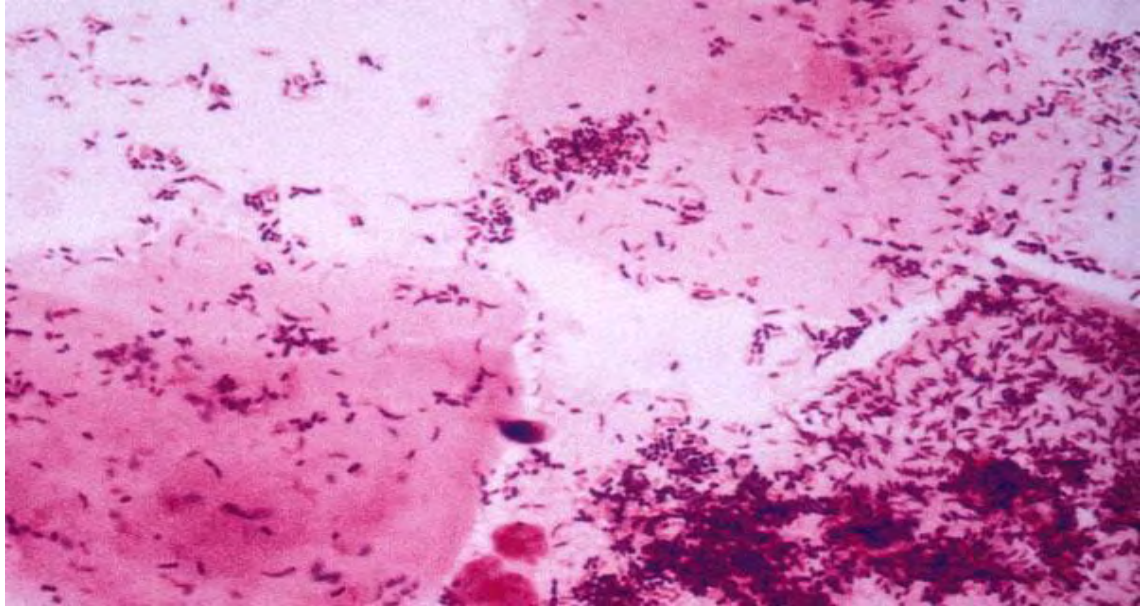


Fig. N° 51: *Mobiluncus sp* (5)

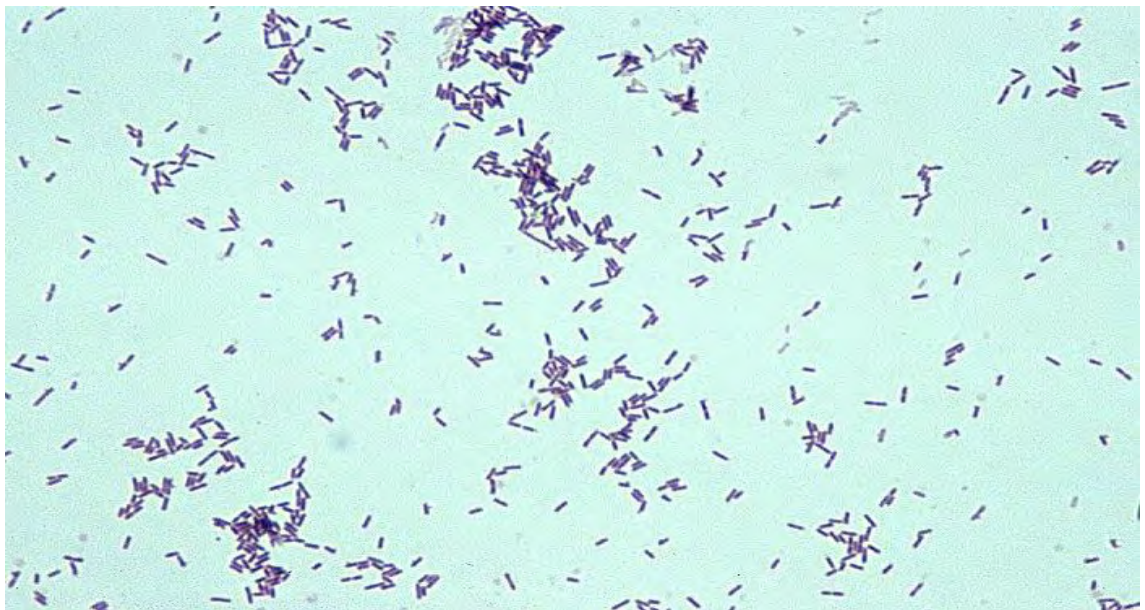


Fig. N° 52: *Listeria monocytogenes* (5)

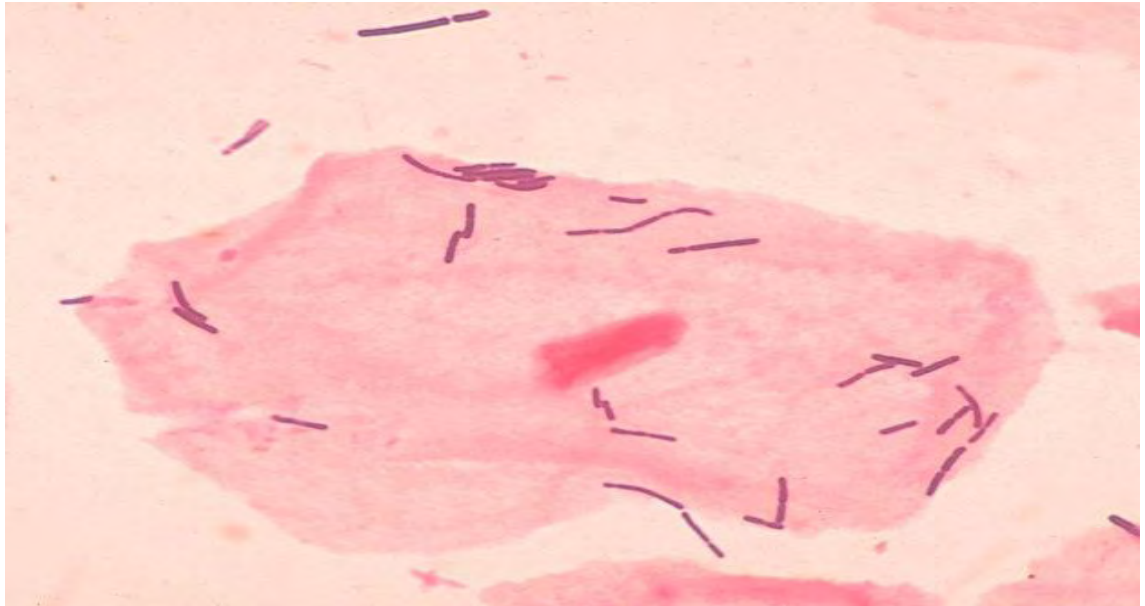


Fig. N° 53: *Lactobacillus sp* (5)

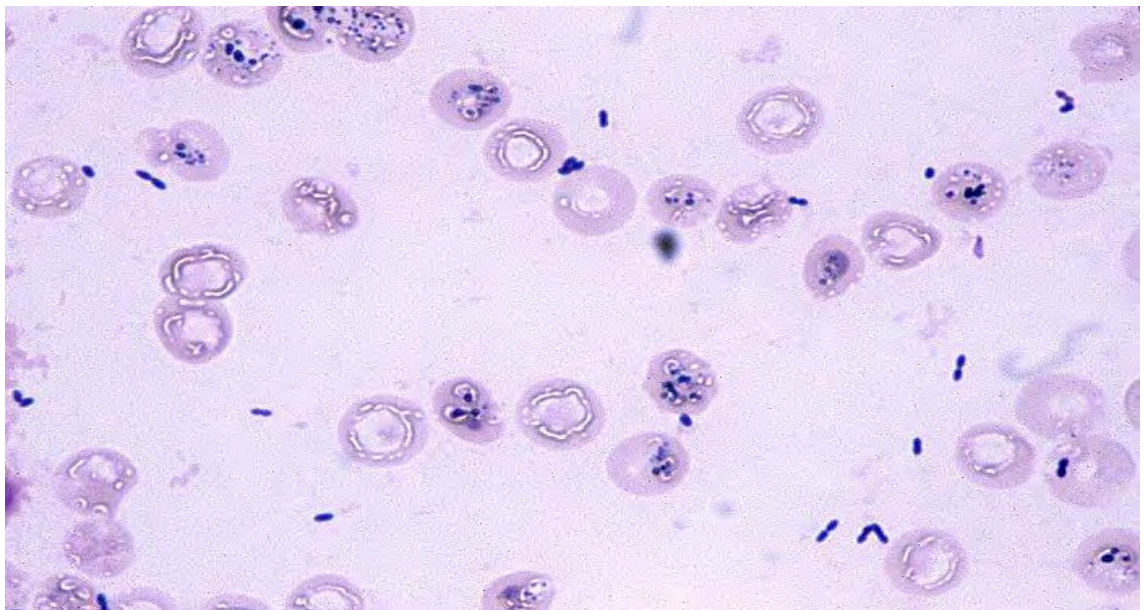


Fig. N° 54: *Enterococcus faecalis* (5)



Fig. N° 55: *Corynebacterium diphtheriae* (5)



Fig. N° 56: *Clostridium botulinum* (5)

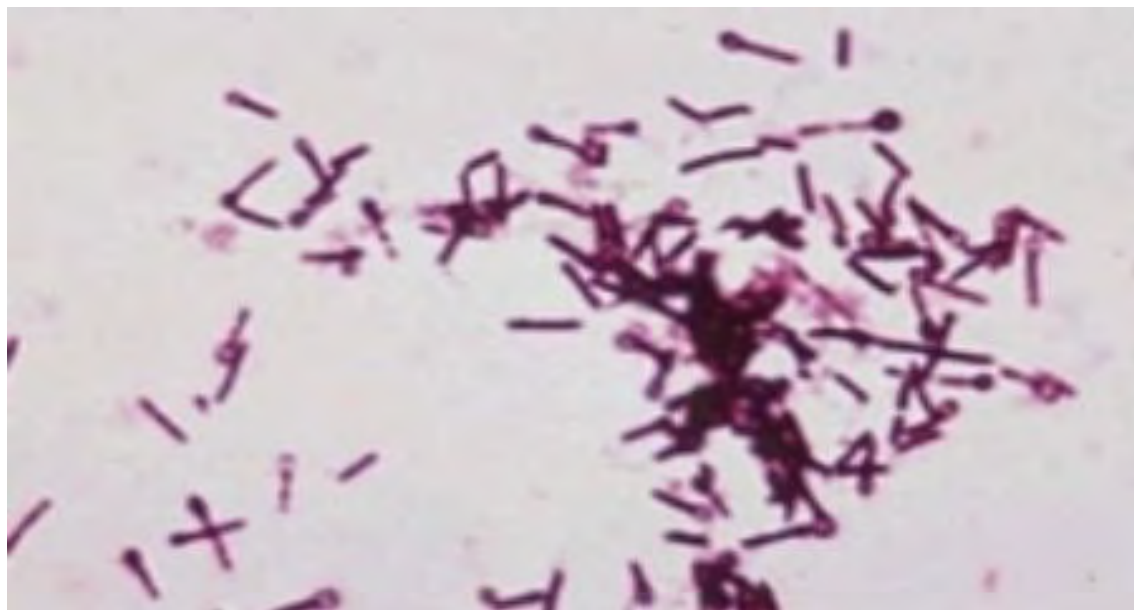


Fig. N° 57: *Clostridium tetani* (5)

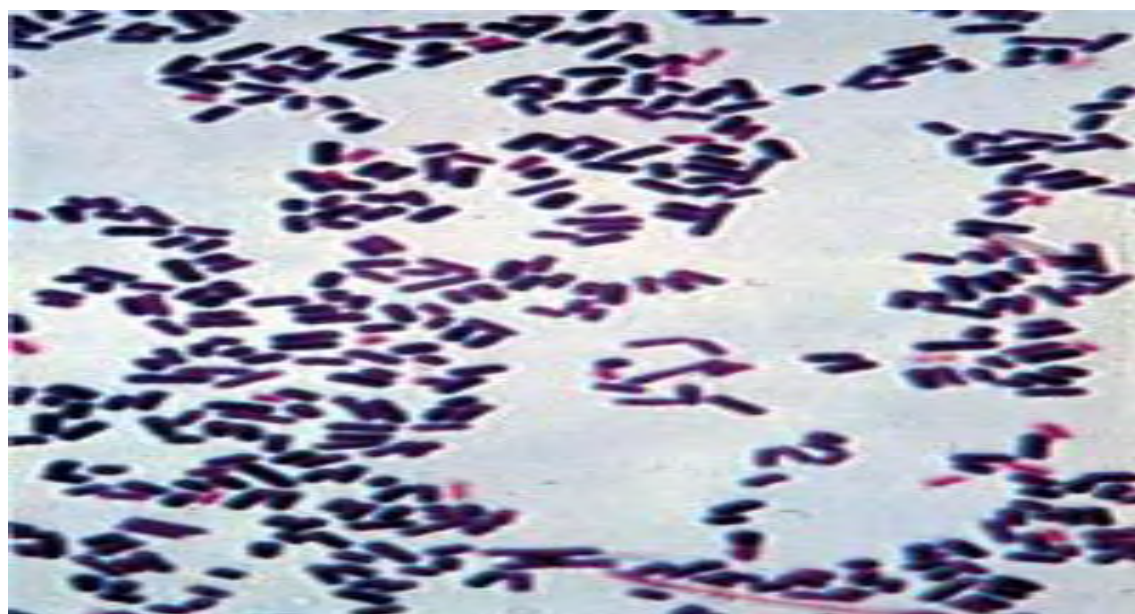


Fig. N° 58: *Clostridium perfringens* (5)

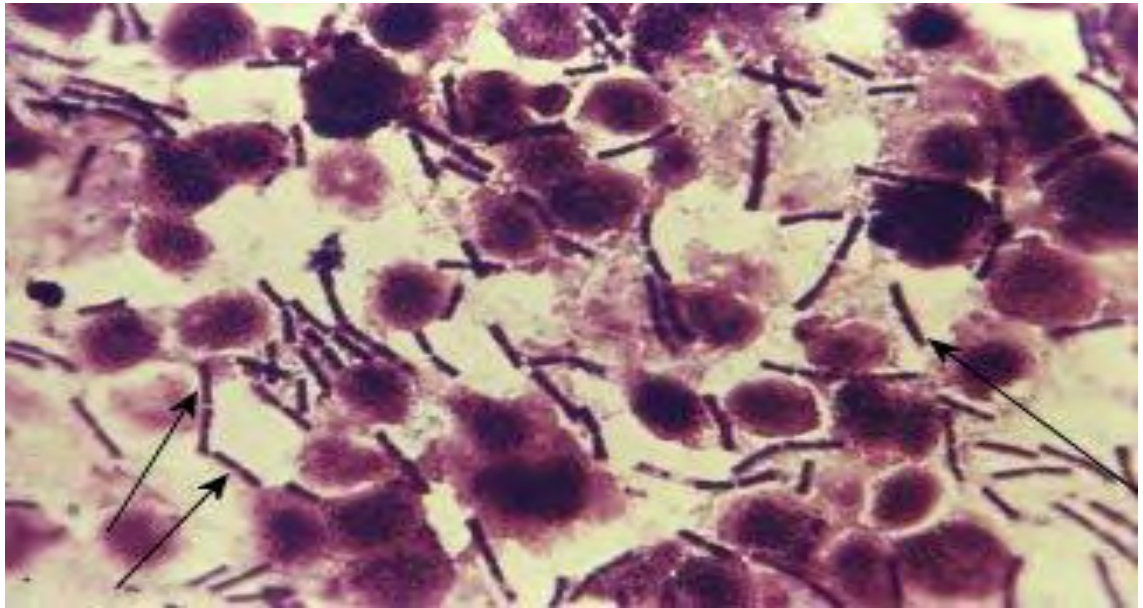


fig. N° 59: *Bacillus anthracis* (5)

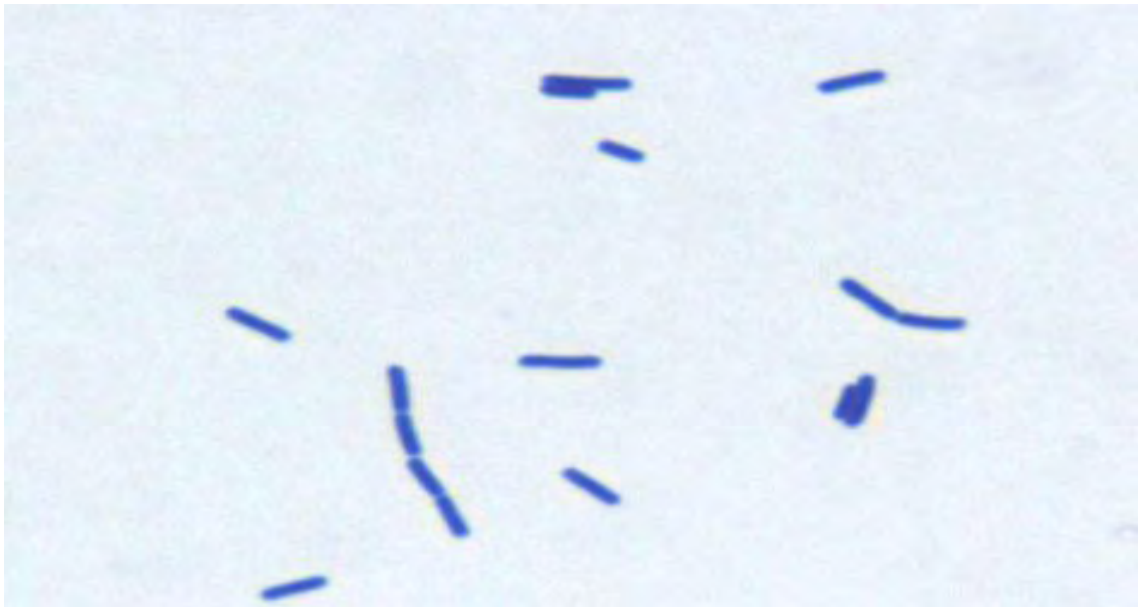


Fig. N° 60: *Bacillus subtilis* (5)

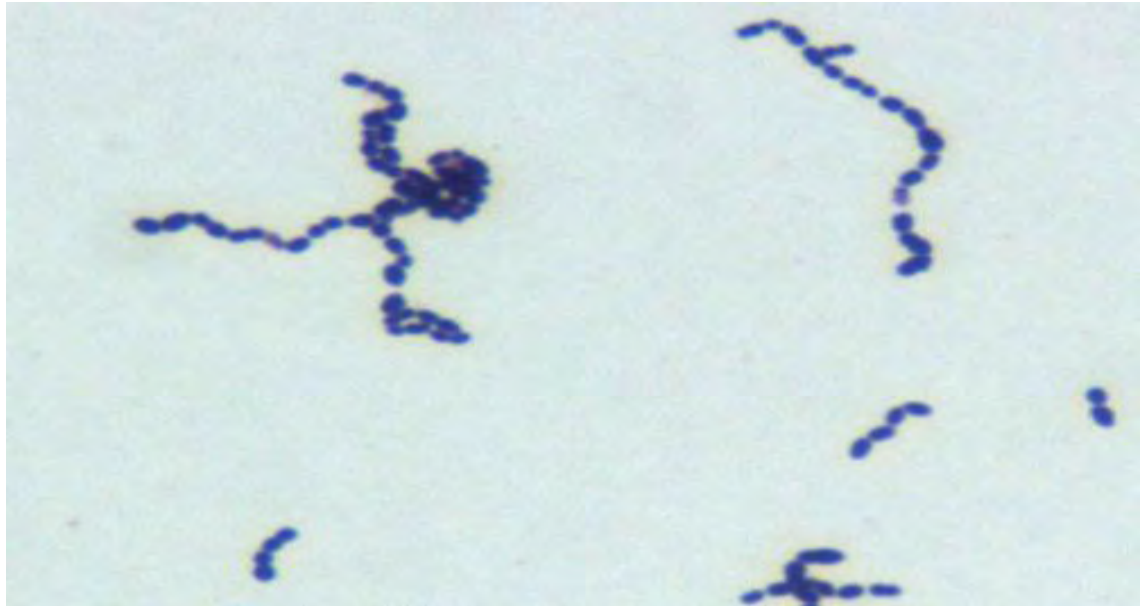


Fig. N° 61: *Streptococcus oralis* (5)

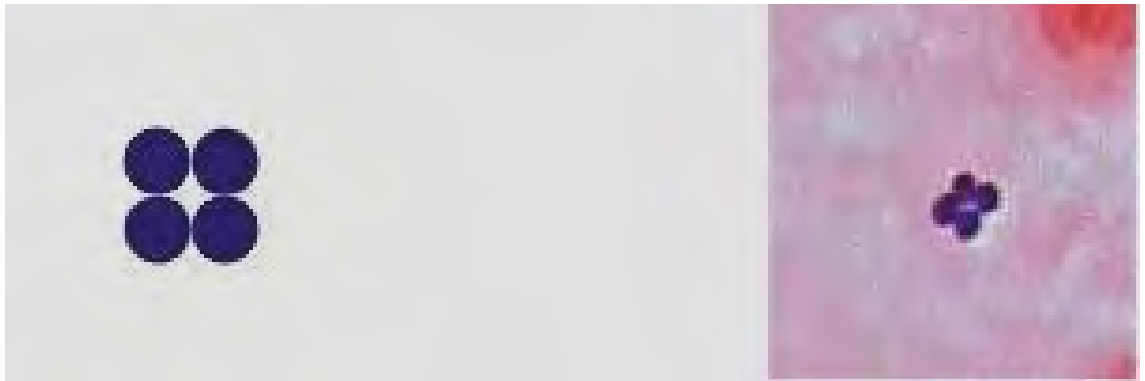


Fig. N° 62: *Micrococcus sp* (5)

13.2 Bacterias Gram (-)

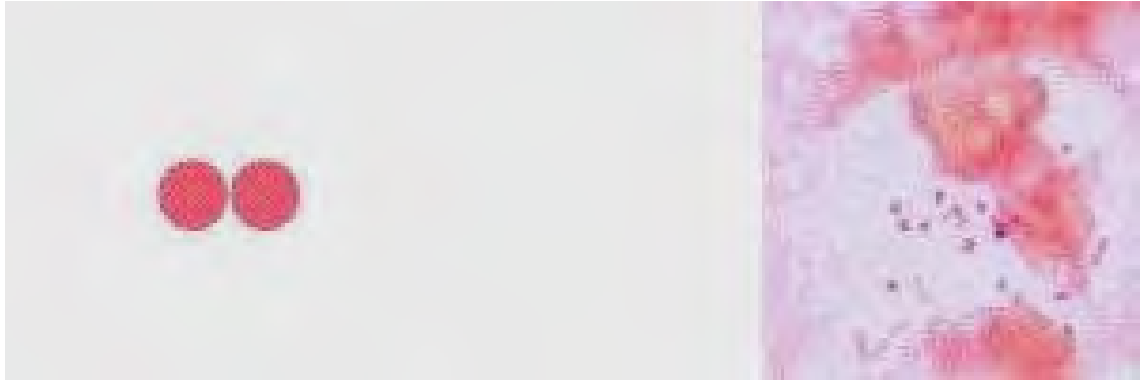


Fig. N° 63: *Acinetobacter sp* ⁽⁵⁾

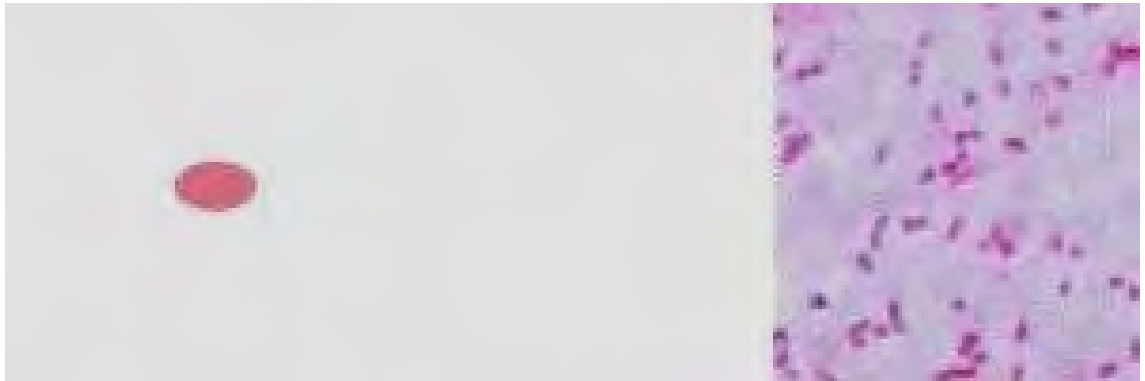


Fig. N° 64: *E coli* ⁽⁵⁾

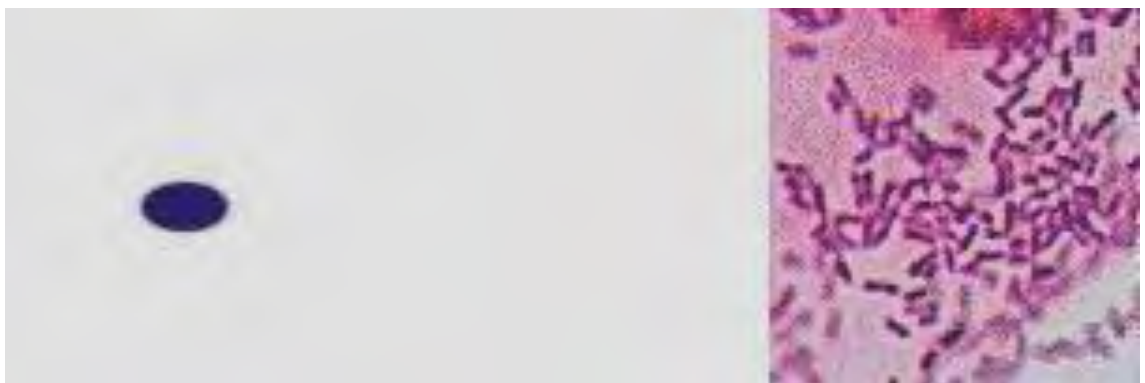


Fig. N° 65: *Haemophilus sp* ⁽⁵⁾

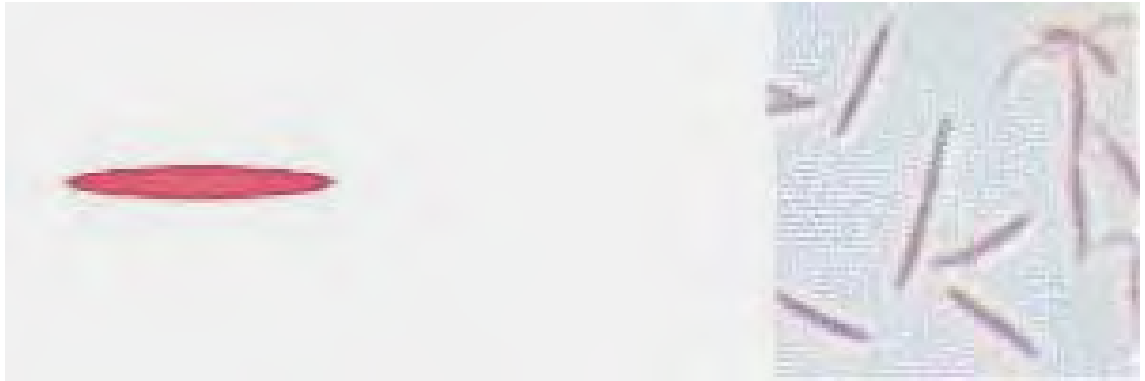


Fig. N° 66: *Fusobacterium* sp. (5)



Fig. N° 67: *Salmonella thypi* (5)

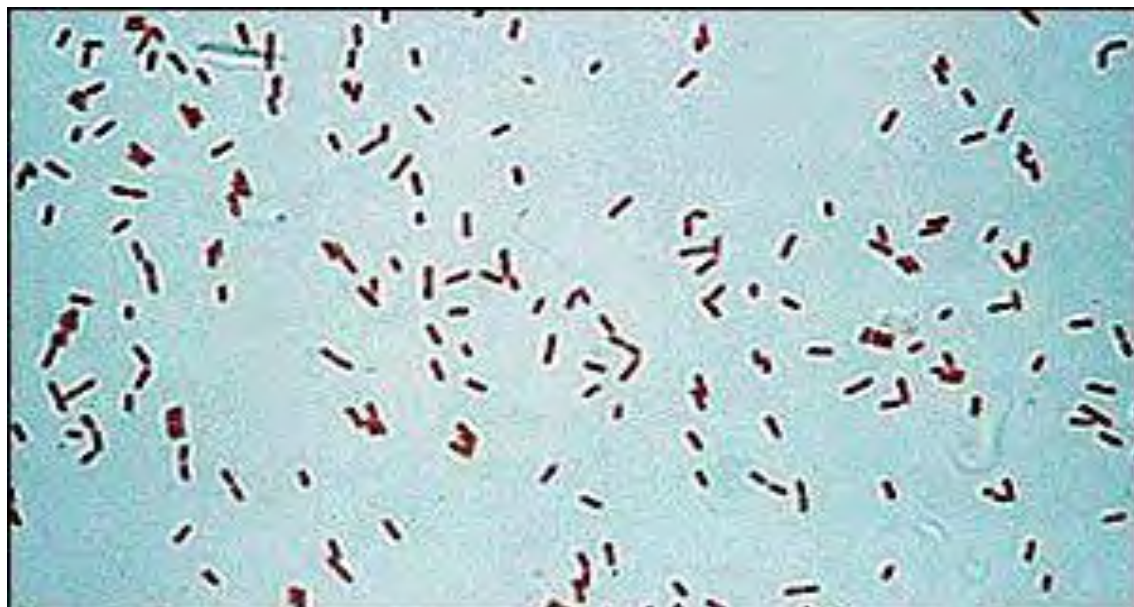


Fig. N° 68: *Pseudomonas aeruginosa* (5)

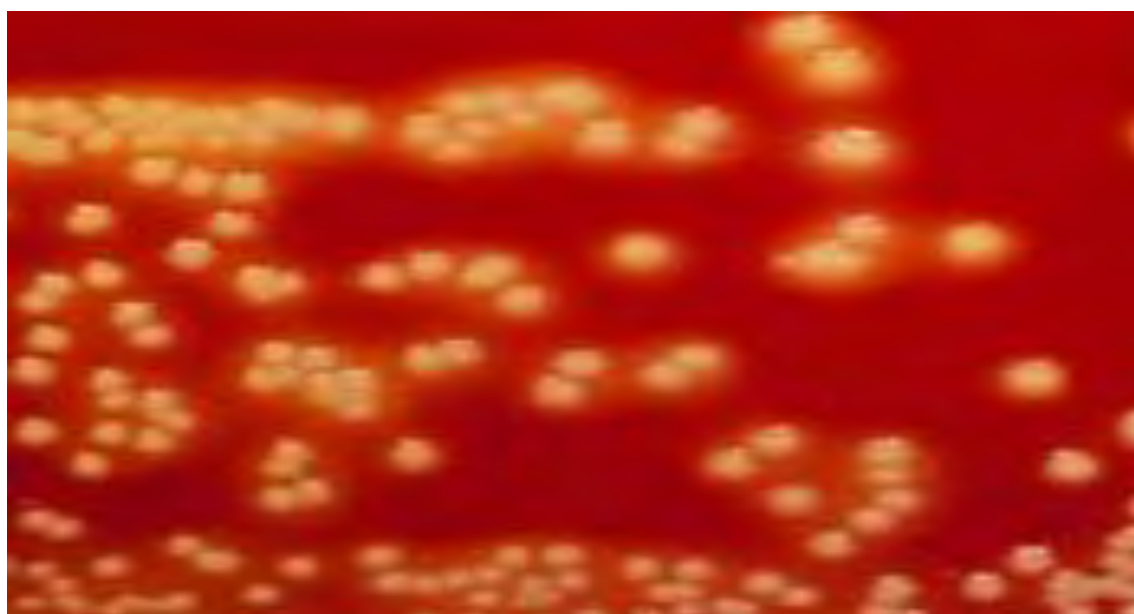


Figura N° 69: *Aeromonas hydrophyla* en Agar sangre. (1)

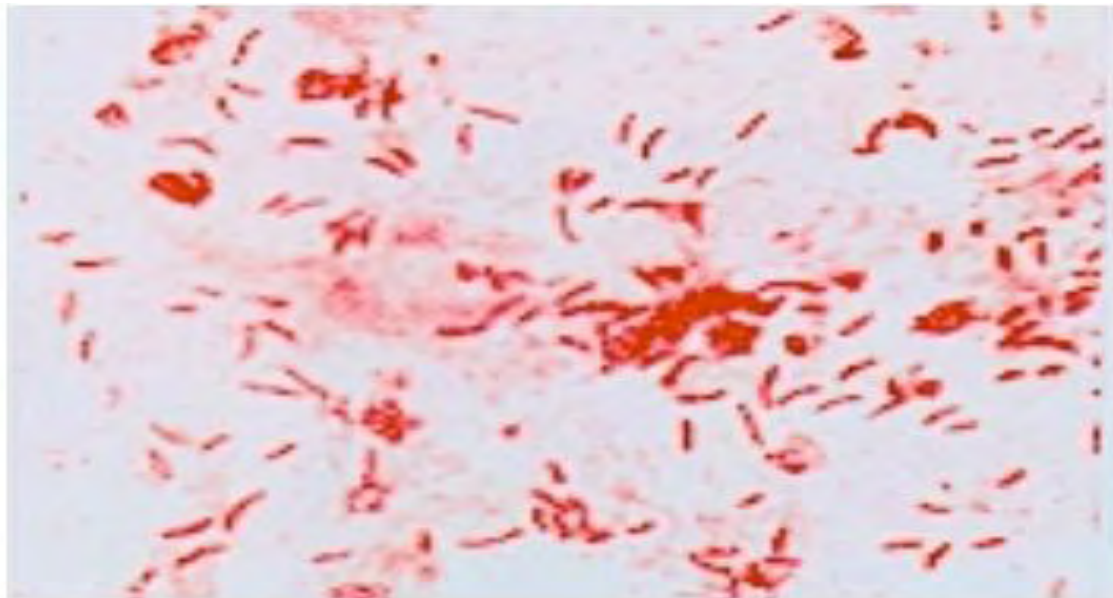
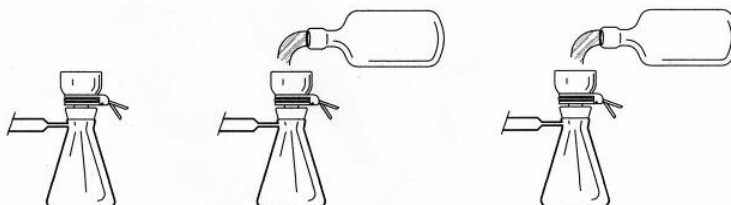


Fig. N°70: *Vibrio cholera* (5).

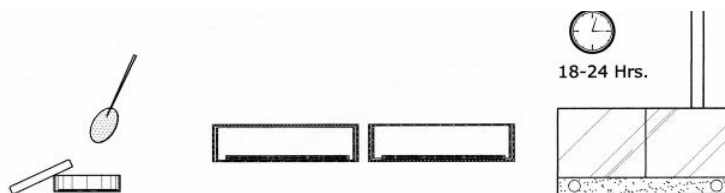
14. ESQUEMATIZACIÓN DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS MACROSCÓPICAS PARA BACTERIAS.



Colocar la almohadilla en la placa de Petri, colocar 2 ml de caldo selectivo luego ensamblar la unidad de filtración colocando una membrana filtrante estéril sobre el soporte poroso.



Vacíe el volumen de muestra elegido como óptimo según el tipo de muestra. Si la muestra es de menos de 10 ml se añadirá 20 ml de agua de dilución al recipiente superior antes de la filtración luego aplique el vacío. Desconecte el vacío y enjuagar con 20 o 30 ml de agua de dilución.



Desmontar el equipo y utilizando una pinza estéril, coloque la membrana filtrante en la placa de Petri sobre la almohadilla con el lado reticulado hacia arriba, incubar de forma invertida a 35° ó 37° C durante 18 a 24 horas con un 100 % de humedad.

Fig. N° 71: Filtración por membrana (16)

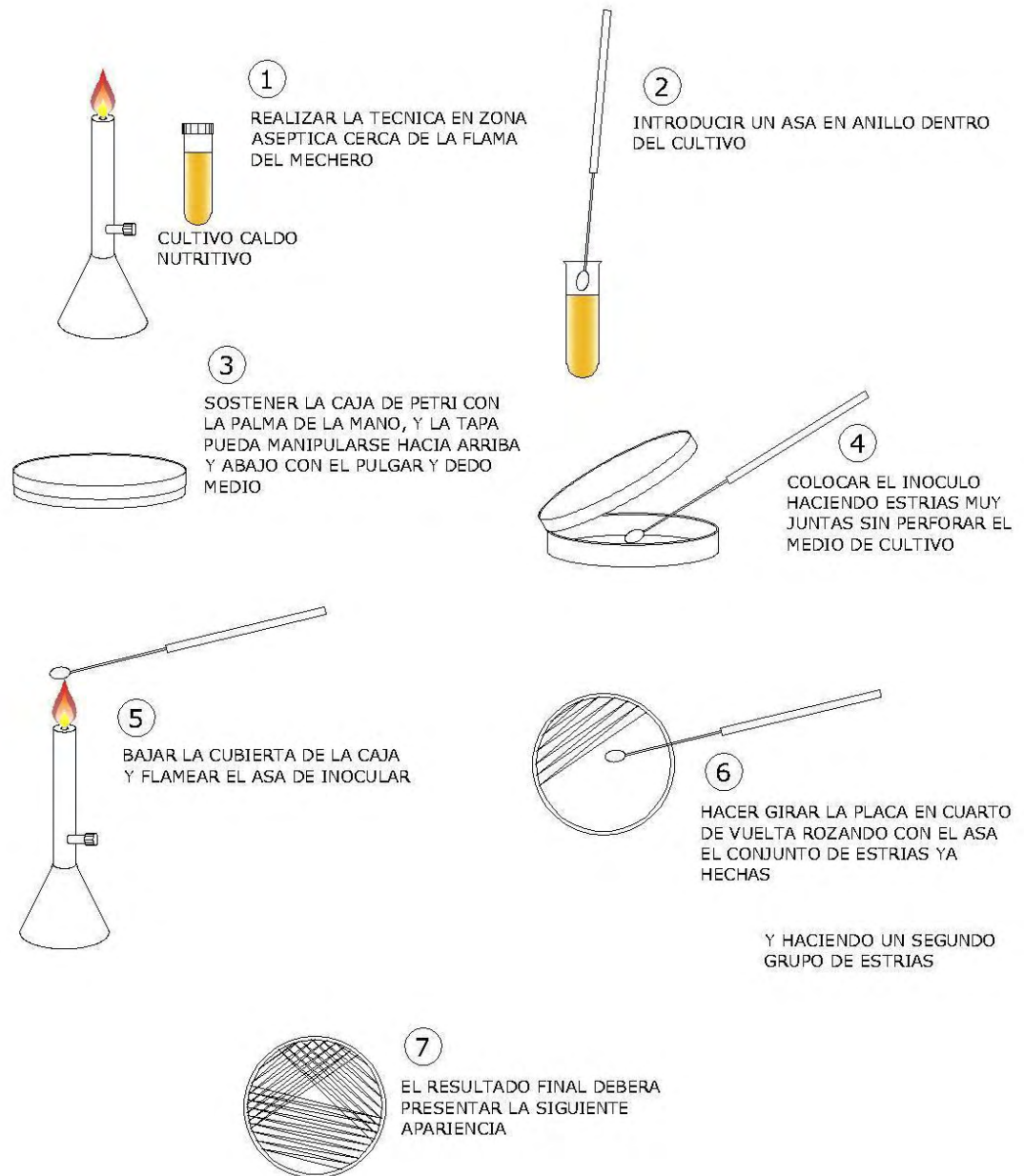


Fig. N° 72: Técnica de la estría cruzada en placa de Petri (2)

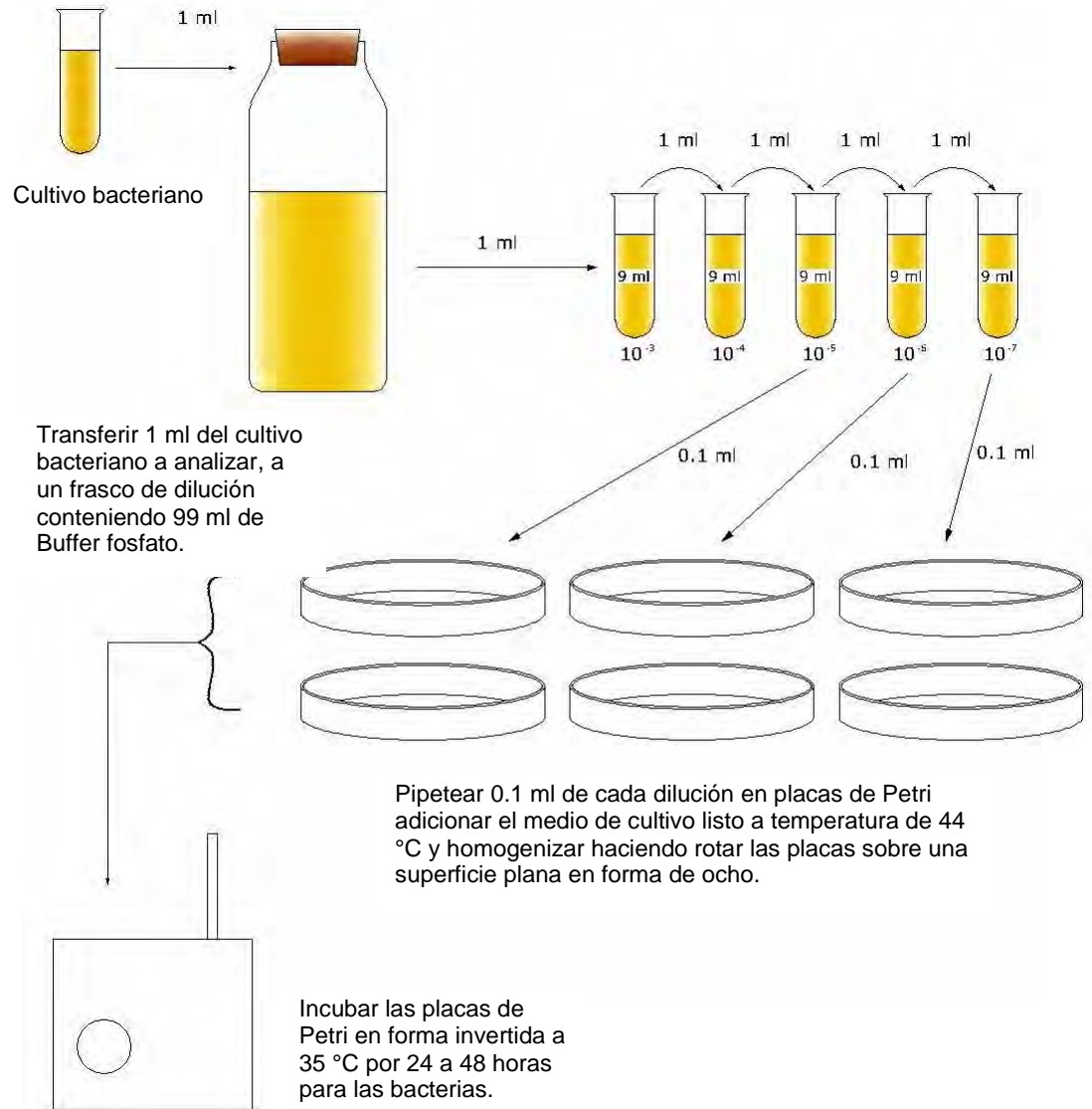


Fig. Nº 73: Técnica de dilución y cuenta en placa (2)

Pesar 10 g o medir 10 ml de muestra y diluir en frasco de dilución con 90 ml de Buffer fosfato, agitar durante 2 minutos.

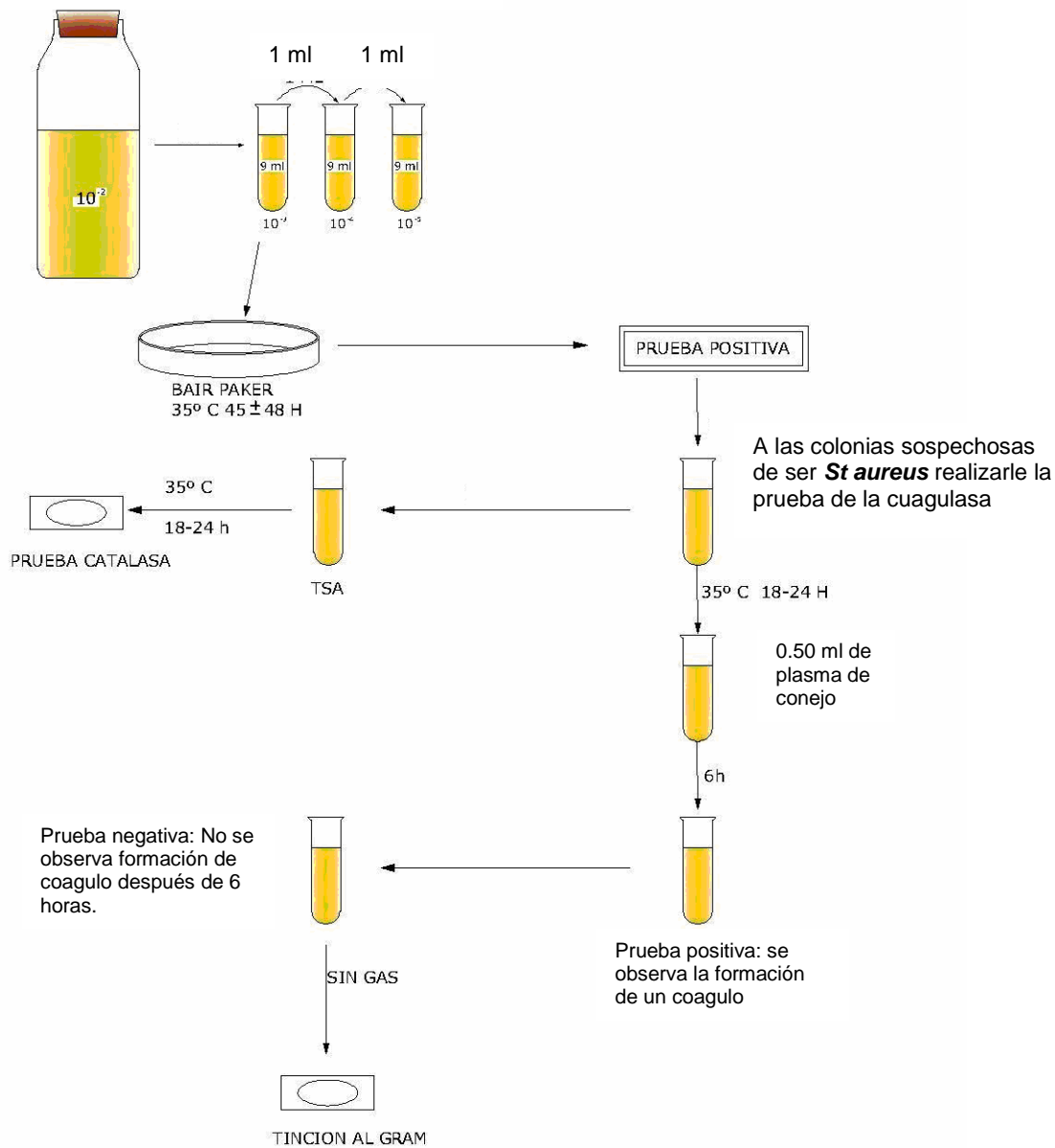


Fig. N° 74: Identificación de *Staphylococcus aureus*.⁽⁹⁾

API STAPH

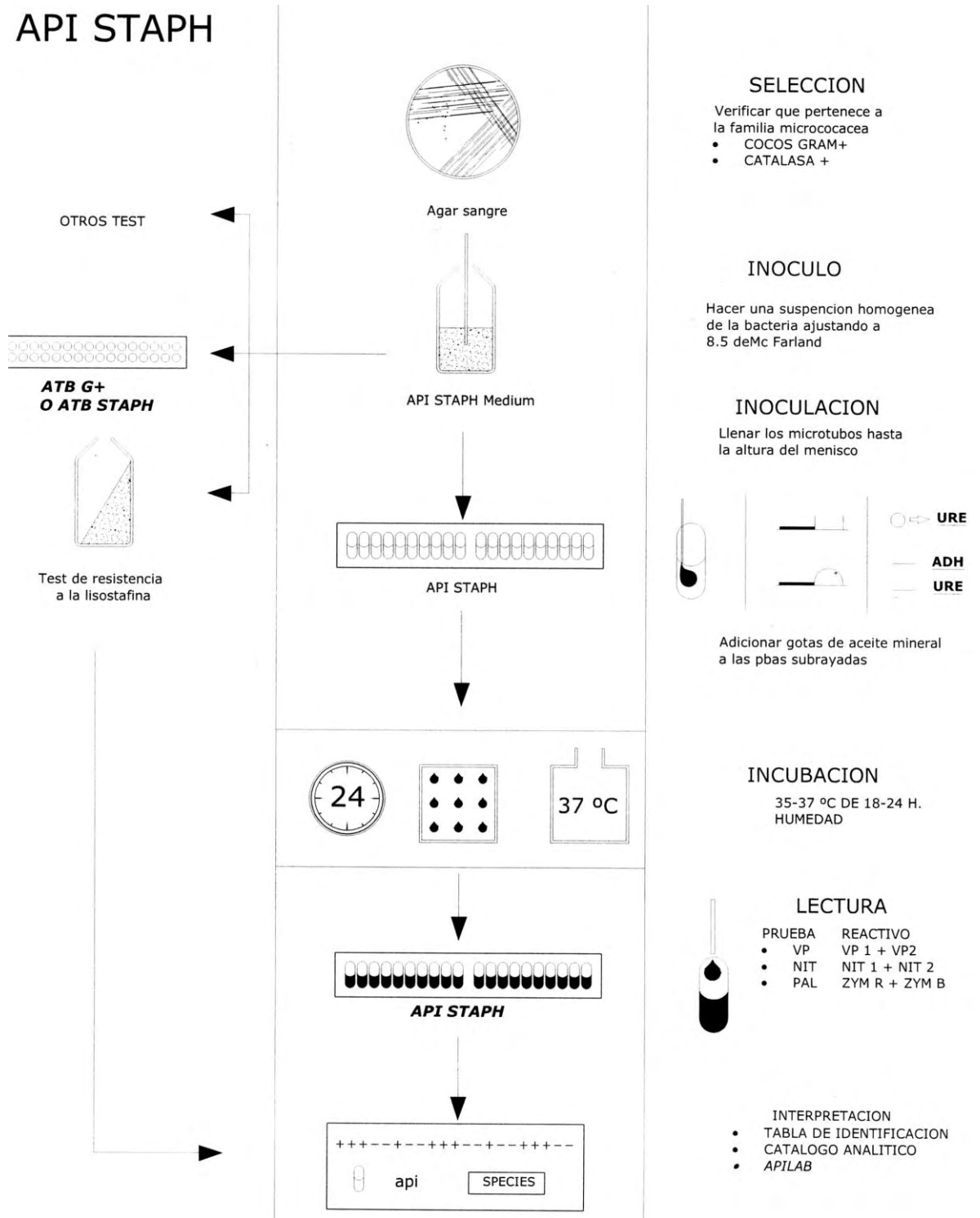


Fig. N° 75: Inoculación del sistema API Staph.(3)

API 20 STREP

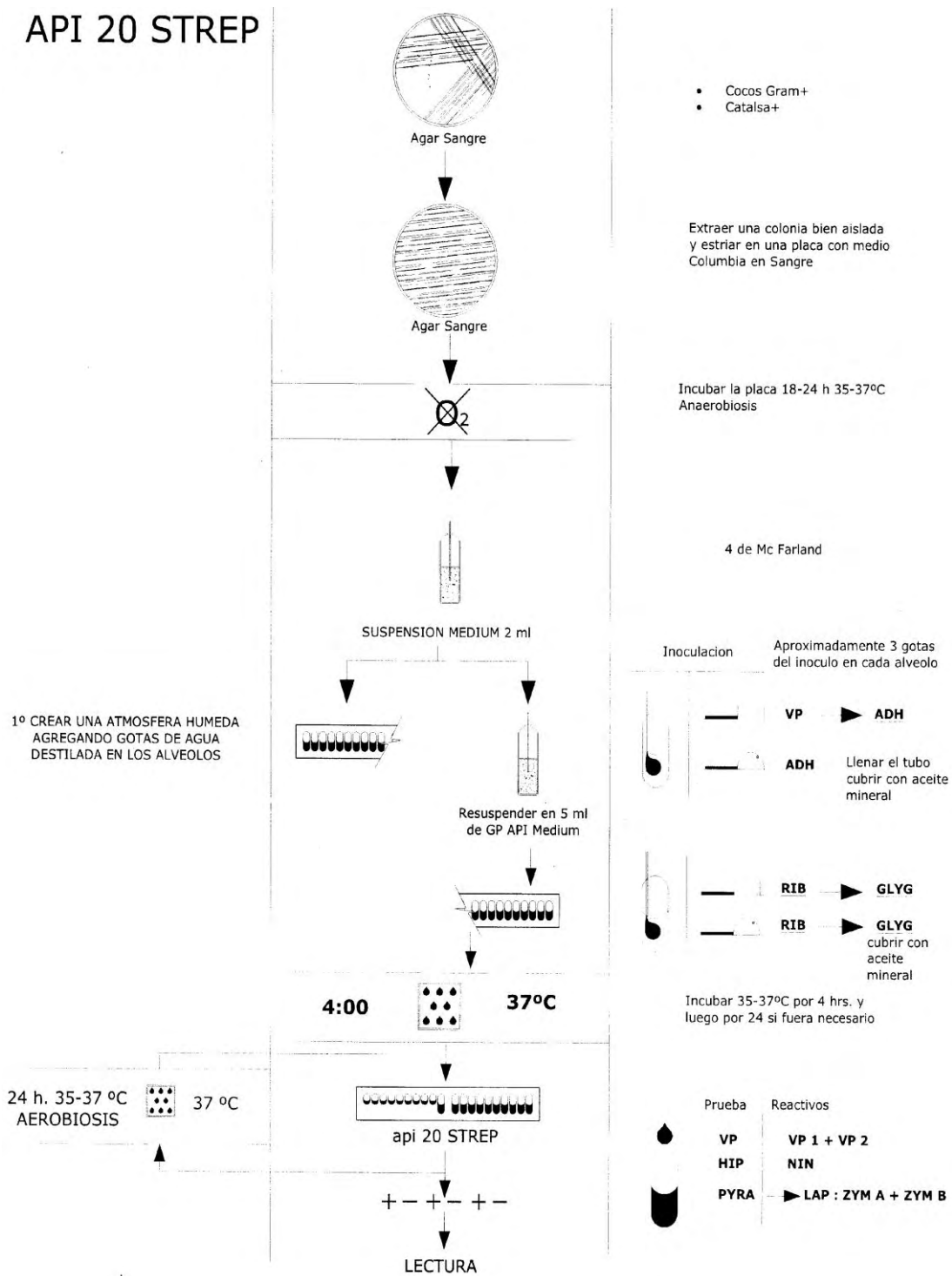


Fig. N° 76: Inoculación del sistema API Strep.(3)

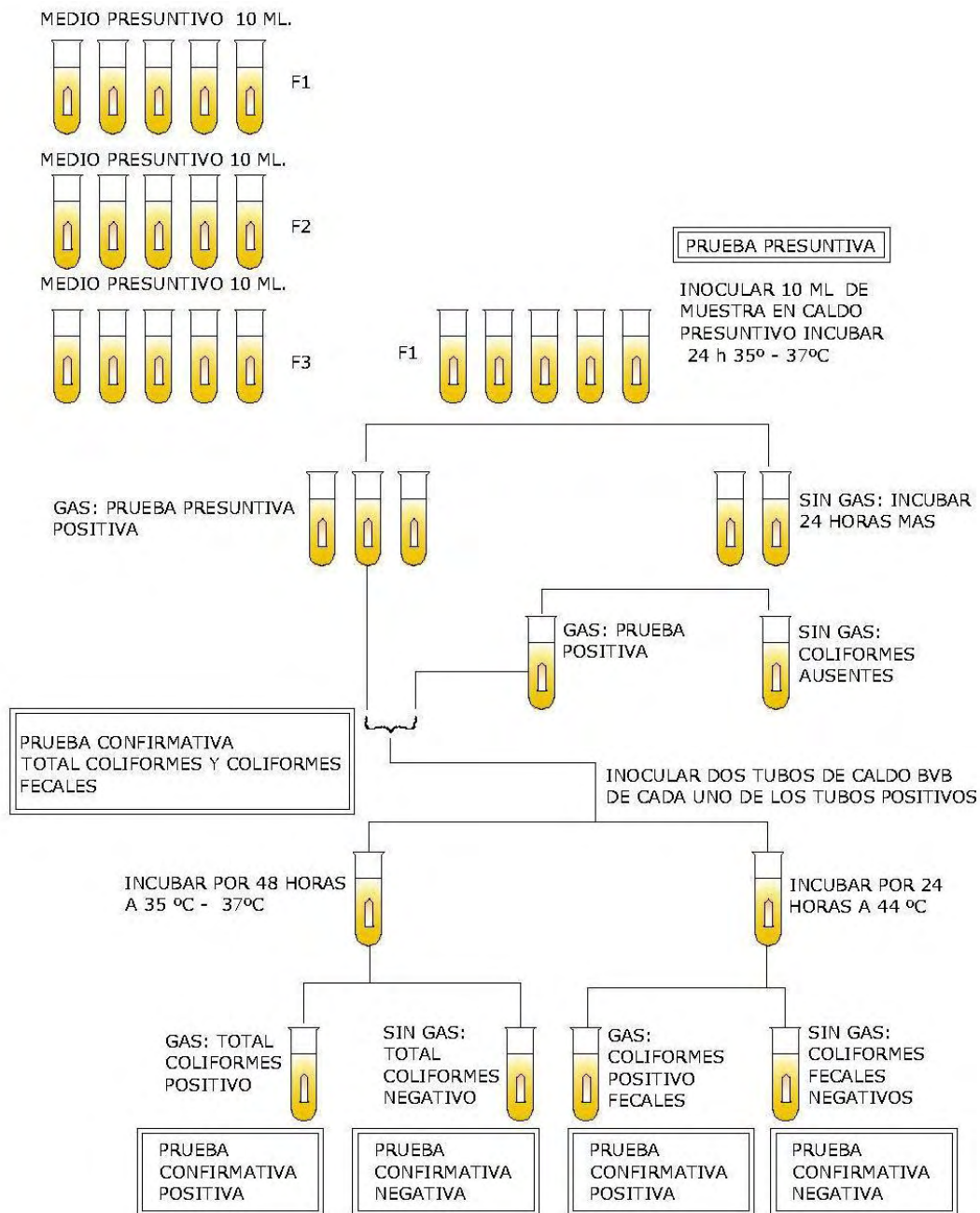


Fig. N° 77: Determinación de coliformes totales y fecales por el método de NMP.(16).

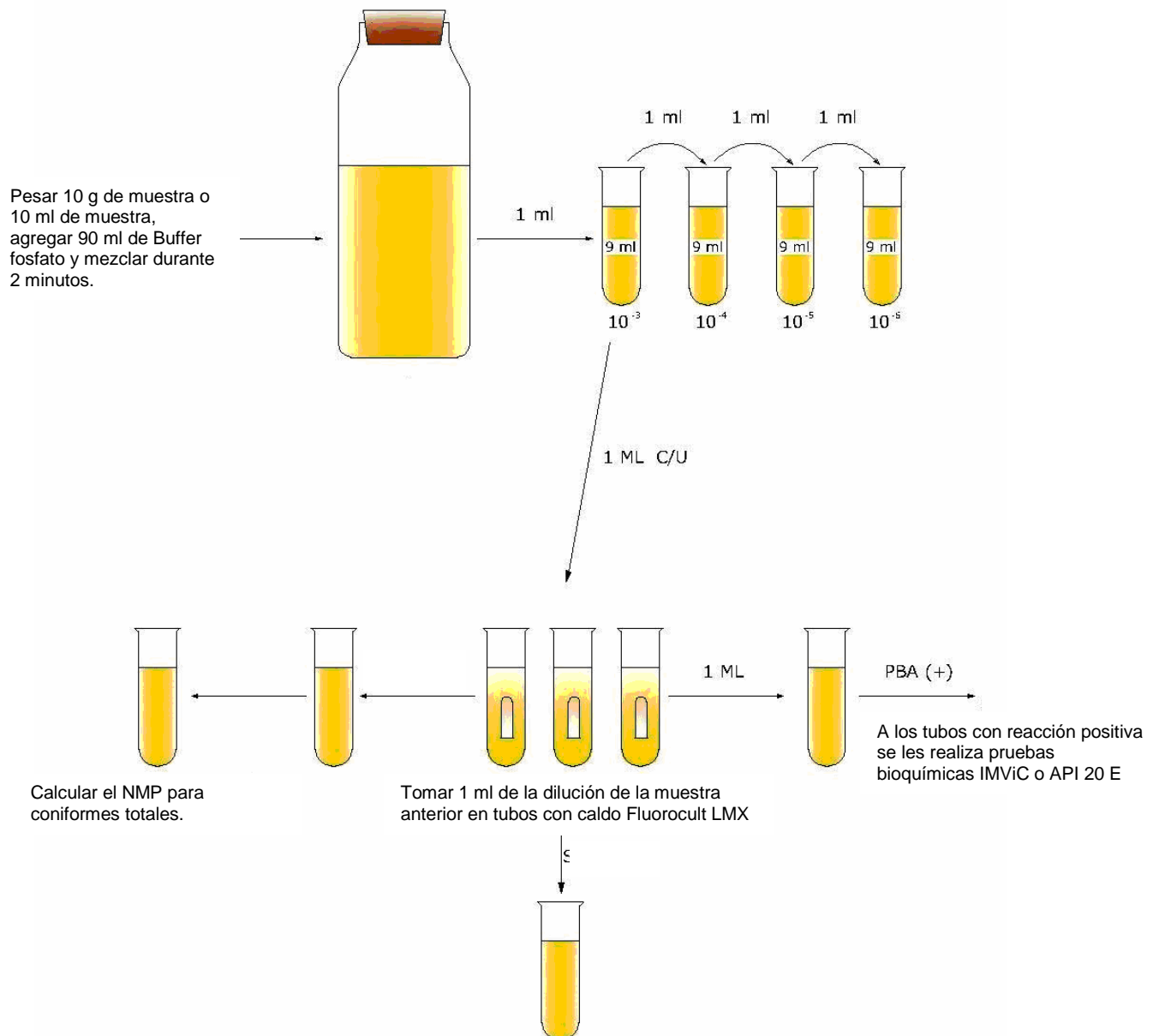


Fig. N° 78: Identificación de *E. coli* y bacterias coliformes. (4)

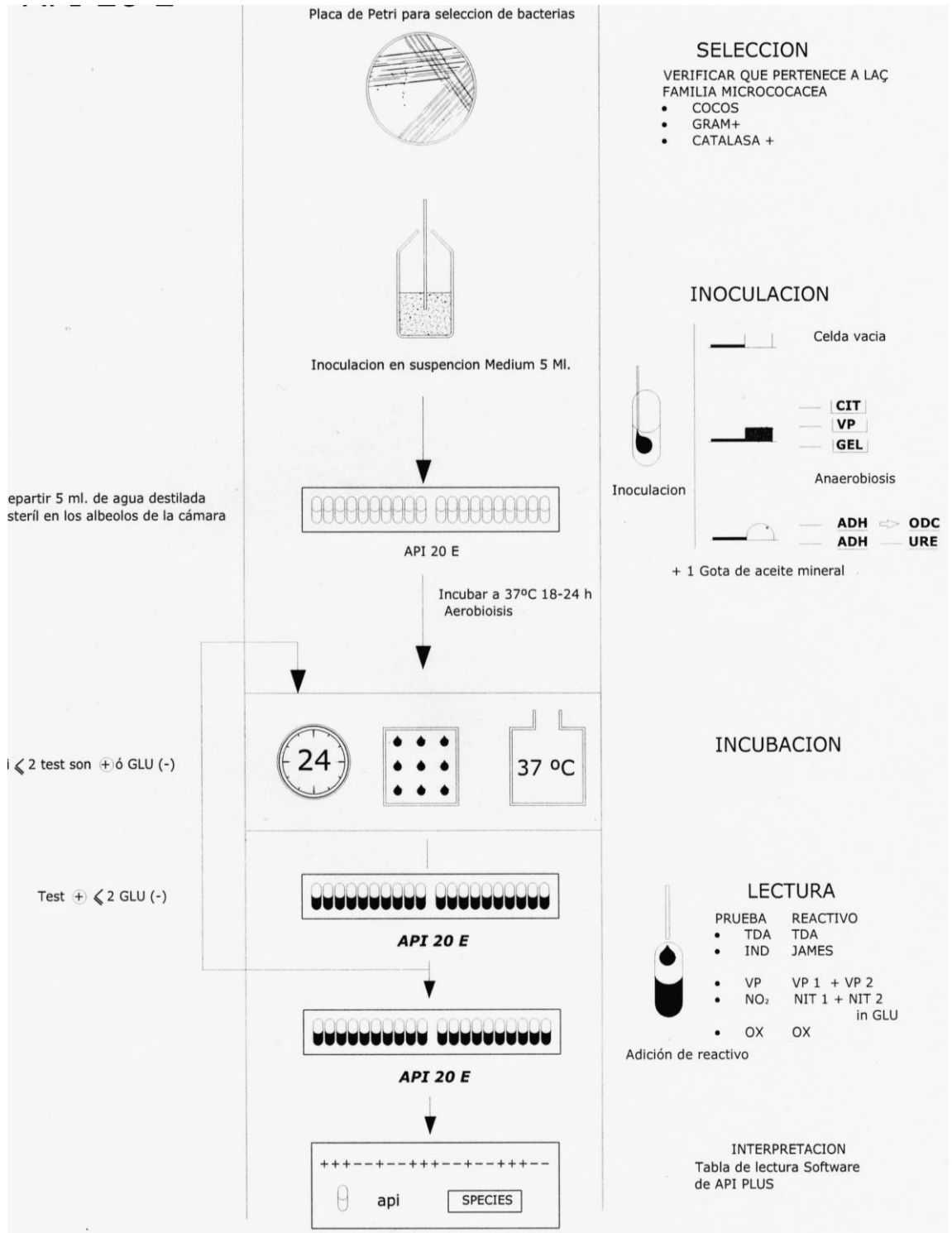


Fig. N° 79: Inoculación del sistema API 20 E (3)

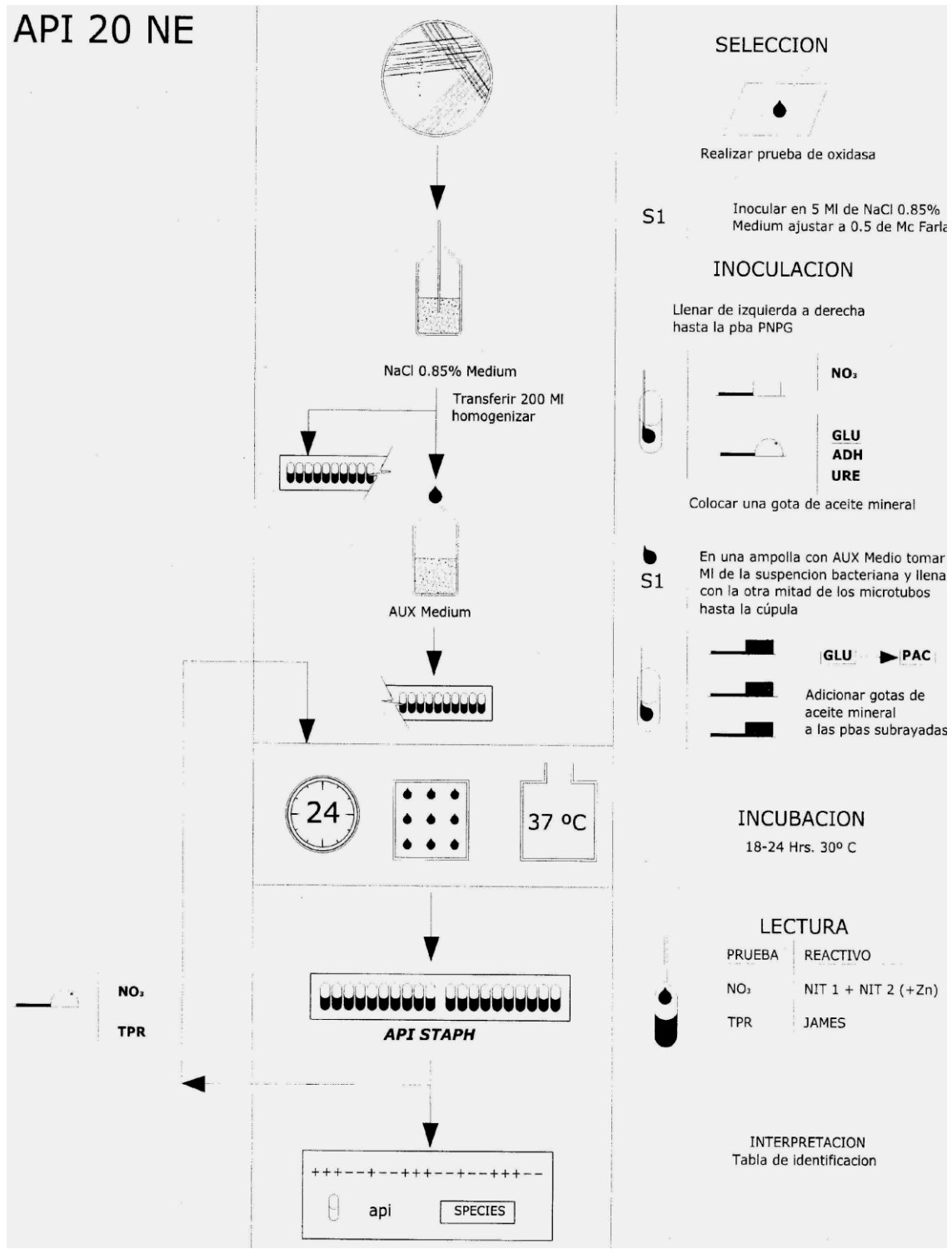


Fig. N° 80: Inoculación del sistema API 20 NE.(3)

15 DESCRIPCIÓN MORFOLOGICA MACROSCOPICA DE BACTERIAS
GRAM (+) Y GRAM (-) UTILIZADAS EN MICROBIOLOGÍA GENERAL.

15.1 Bacterias Gram (+)



Fig. N° 81: *Bacillus cereus* en Agar Plate Count. (14)



Fig. N° 82: *Staphylococcus aureus* en Agar Baird Parker. (14)



Fig. N° 83: *Staphylococcus aureus* en Agar Cerebro Corazón. (14)



Fig. N° 84: *Streptococcus pyogenes* en Agar Sangre. (14)

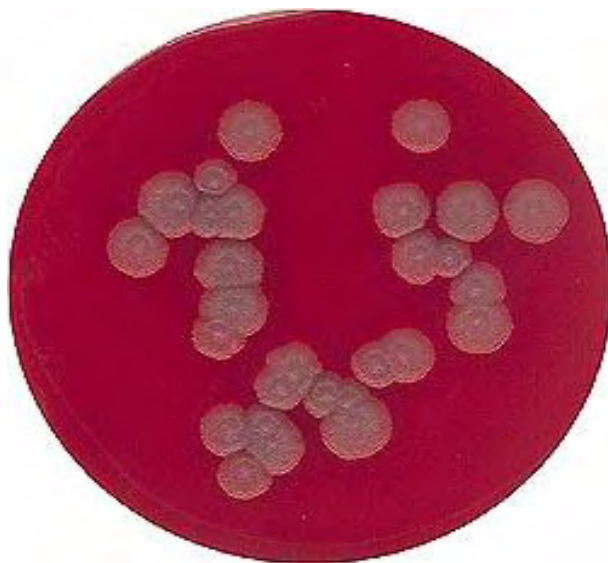


Fig. N° 85: *Bacillus cereus* en Agar Sangre. (14)

15.2 Bacterias Gram (-)



Fig. N° 86: *Salmonella typhi* en Agar nutritivo. (14)



Fig. N° 87: *Escherichia coli* en Agar EMB. (14)



Fig. N° 88: *E. coli* y *Proteus* en Agar MacConkey. (14)

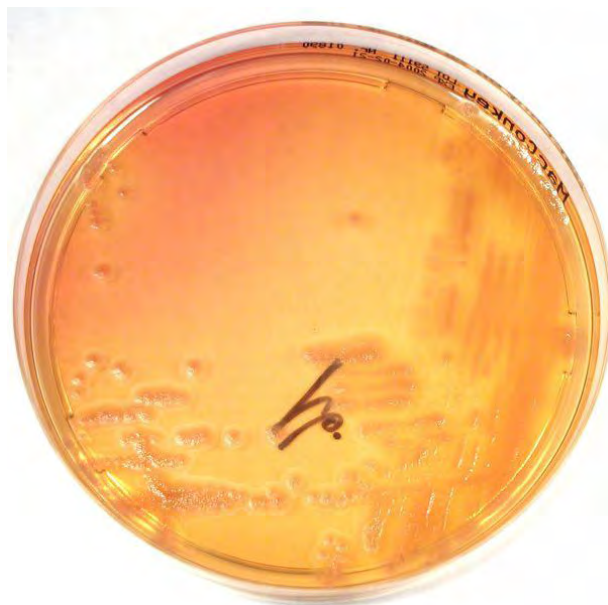


Figura N° 89: *Alcaligenes* en Agar MacConkey. (7)

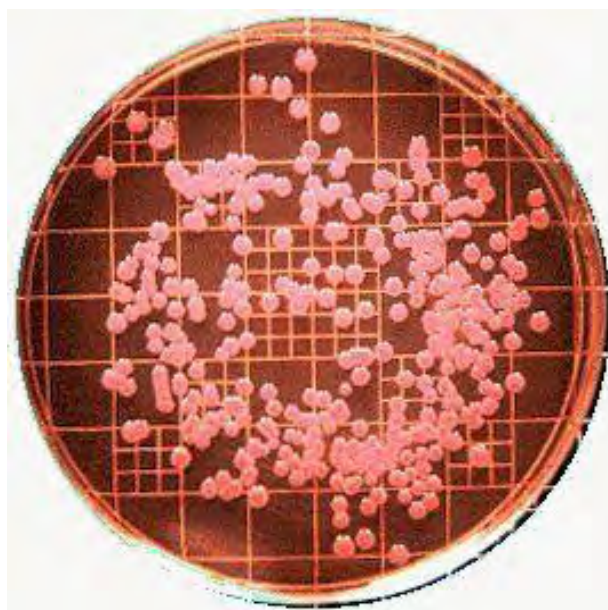


Figura N° 90: *Enterobacter* en Agar MacConkey. (7)



Figura N° 91: *Escherichia coli* en Agar EMB (7).

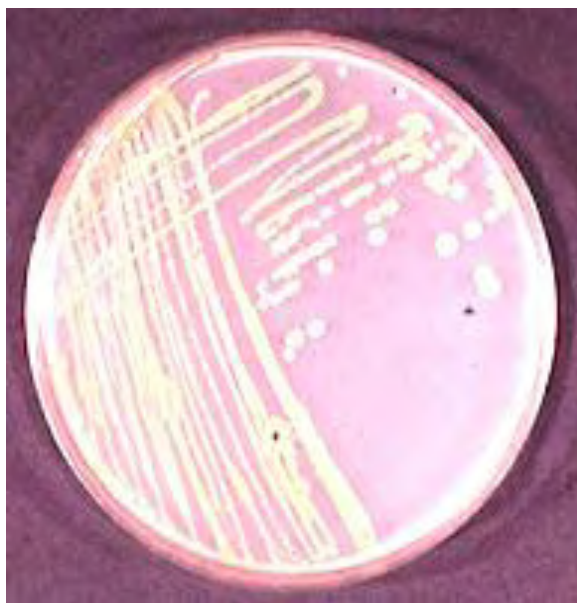


Fig. N° 92: *Flavobacterium* en Agar Sangre. (10)



Fig. N° 93: *Klebsiella pneumoniae* en Agar MacConkey. (19)

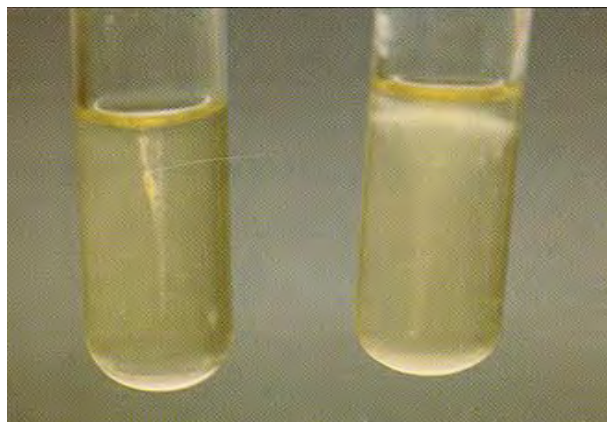


Fig. N° 94: *Listeria monocytogenes* en Medio Movilidad. (6)

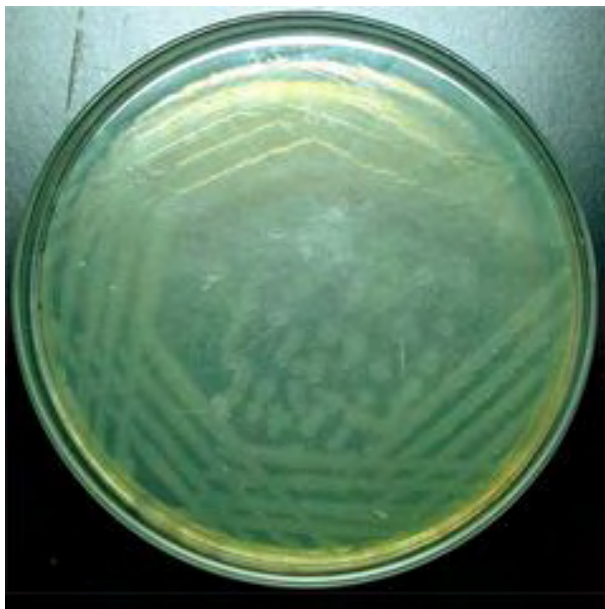


Fig. N° 95: *Pseudomonas aeruginosa* en medio Cetrimide. (7)

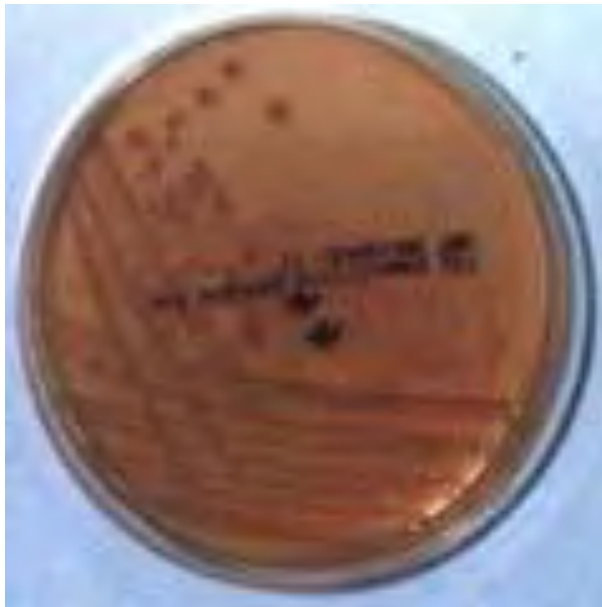


Fig. N° 96: *Salmonella* en Agar MacConkey (19)



Fig. N° 97: *Shigella* en Agar X.L.D. (19)



Fig. N° 98: *Yersinia enterocolitica* en Agar MacConkey. (19)

16. ESQUEMATIZACIÓN DE TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA DE HONGOS (LEVADURAS Y MOHOS).

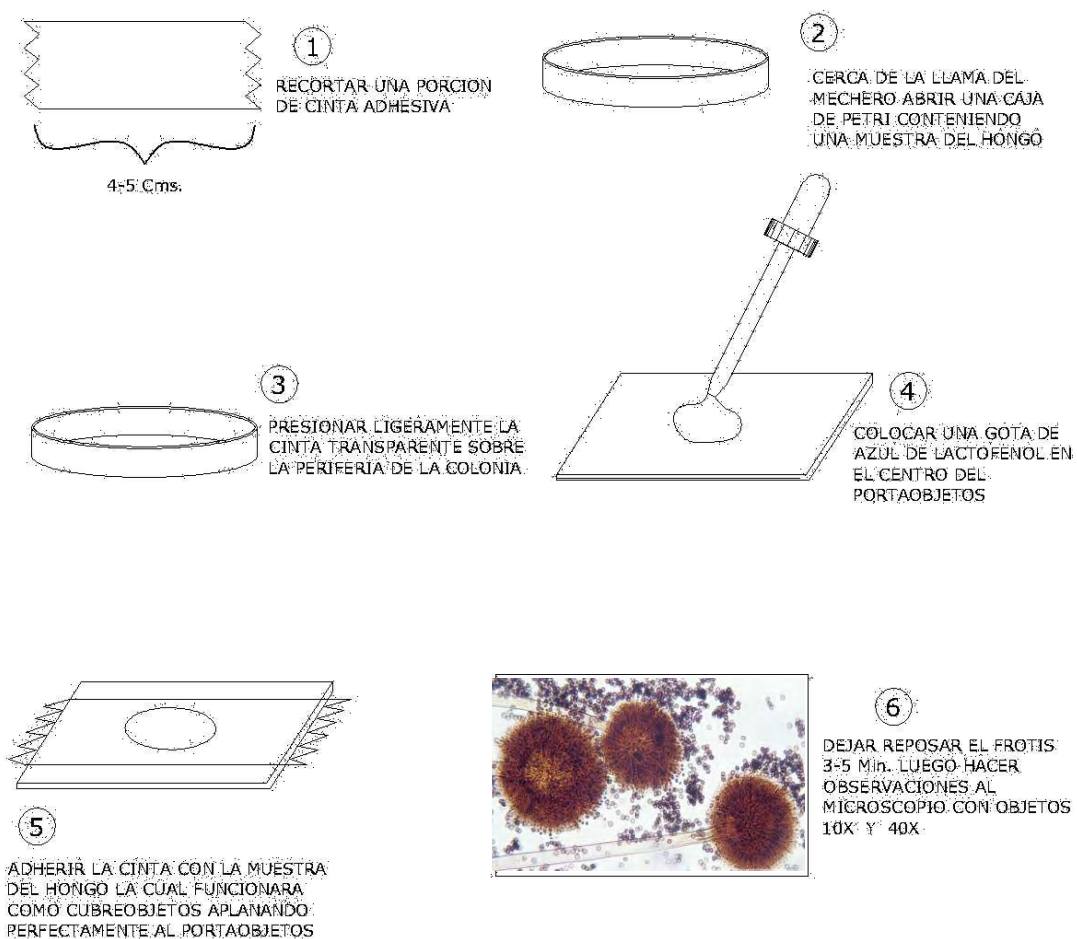


Fig. N° 99: Técnica de identificación microscópica para hongos (mohos y levaduras). (2)

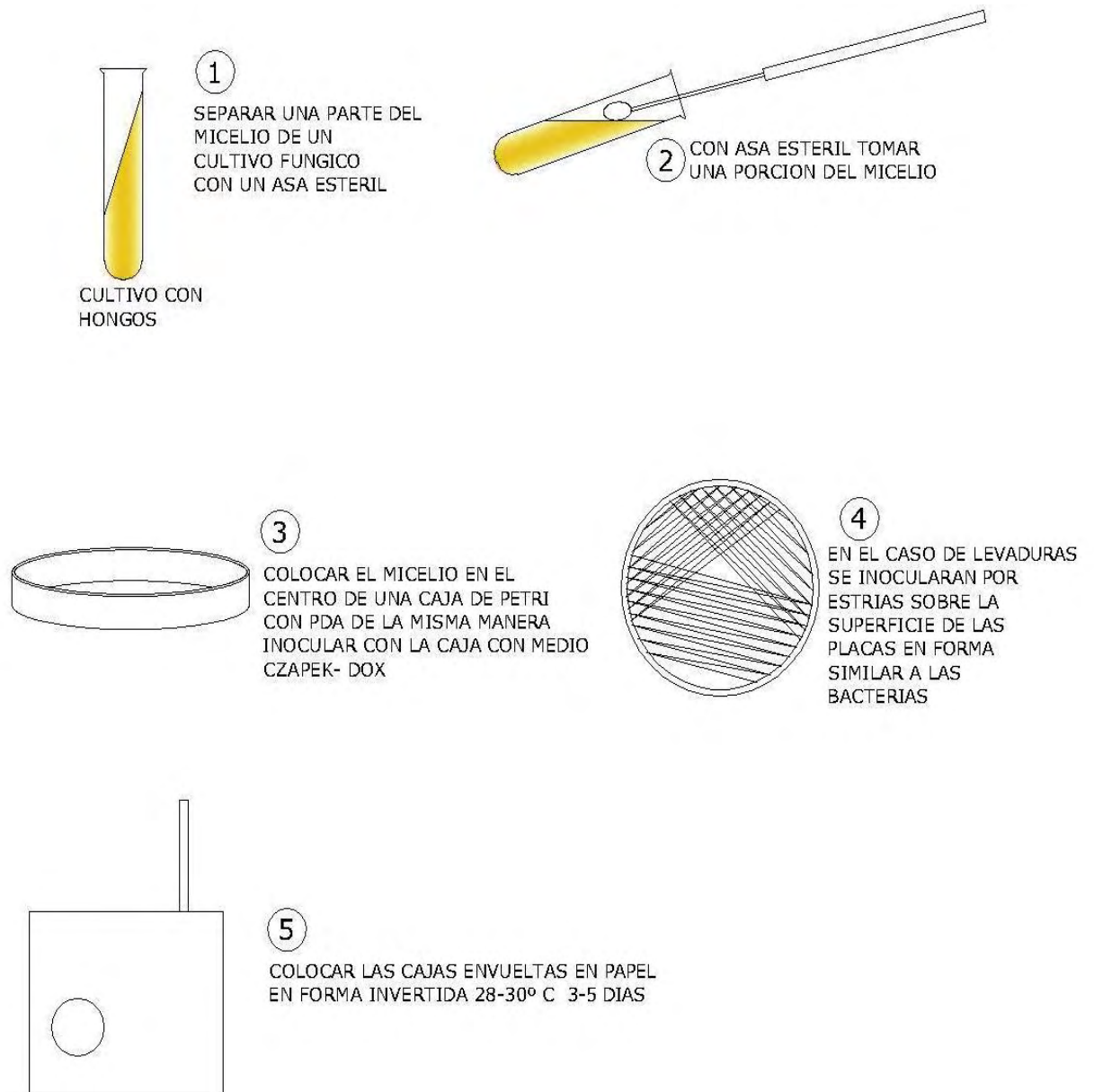


Fig. N° 100: Cultivo y descripción morfológica macroscópica de mohos.(2)

**17. DESCRIPCIÓN MORFOLOGICA MICROSCOPICA Y MACROSCOPICA
DE HONGOS PATOGENOS UTILIZADOS EN MICROBIOLOGÍA
GENERAL.**

17.1 Morfologías microscópicas.

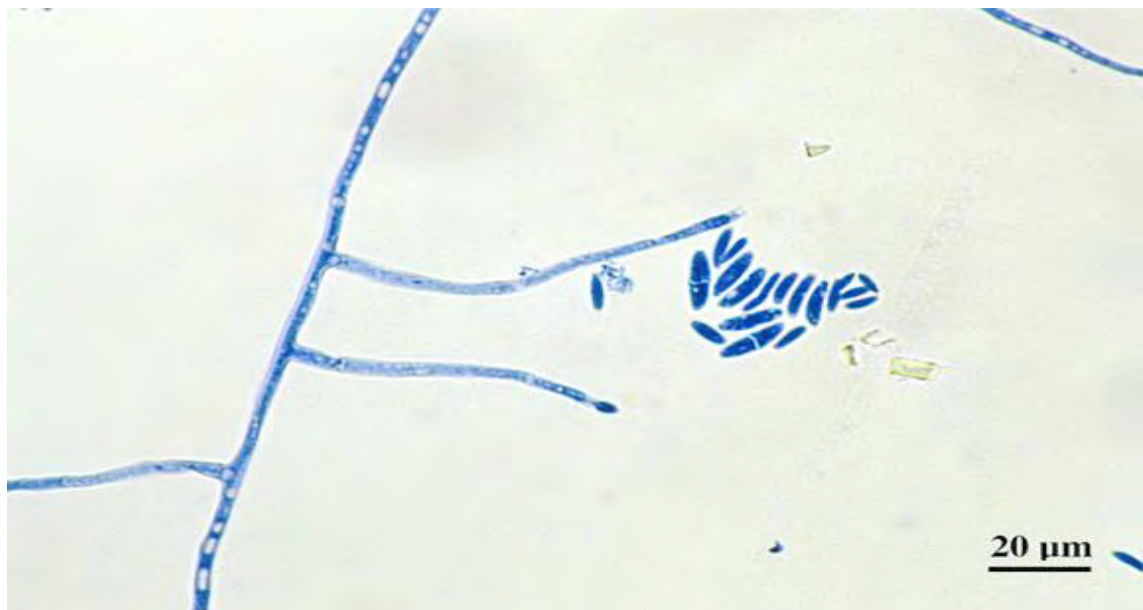


Fig. N° 101: Tinción de *Fusarium solani*.⁽¹³⁾



Fig. N° 102: Tinción de *Blastomyces dermatitidis*. (18)

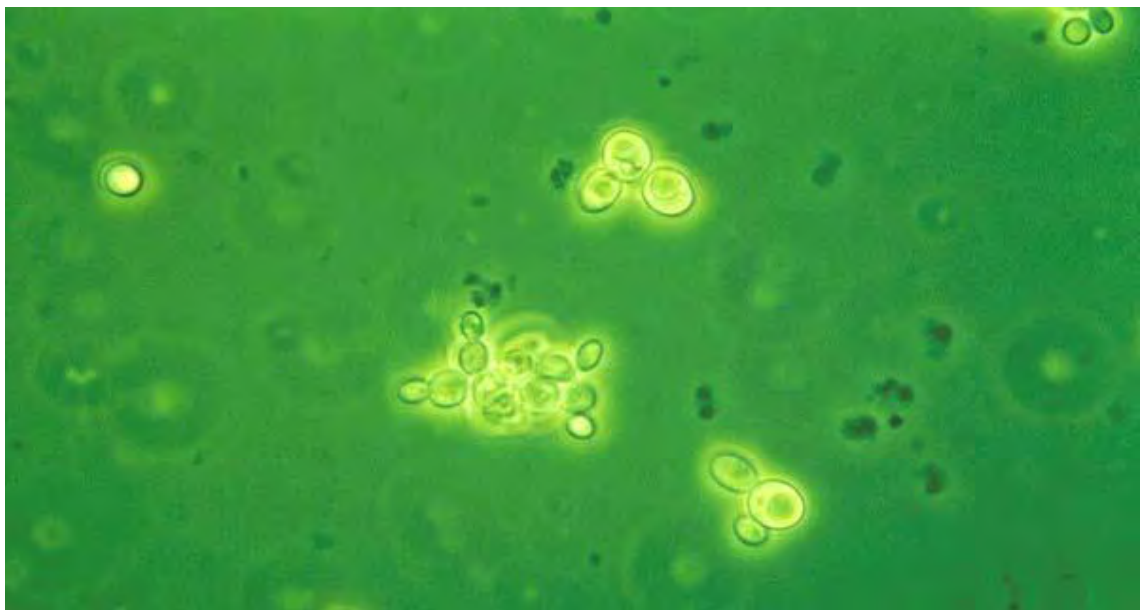


Fig. N° 103: Tinción de *Candida albicans* (18)

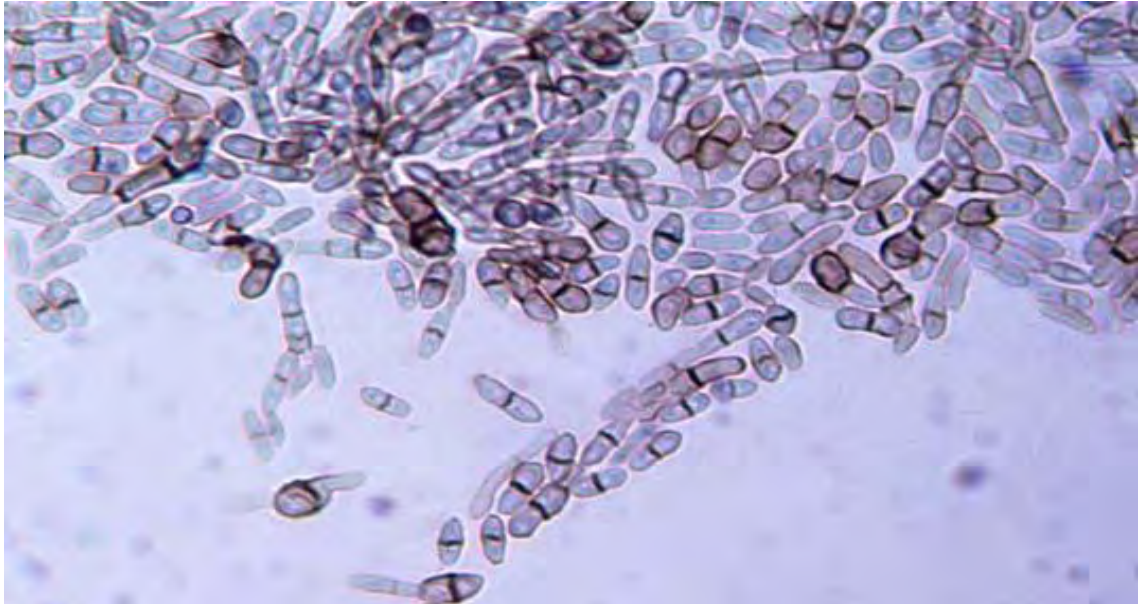


Fig. Nº 104: Tinción de *Exophiala werneckii*. (18)

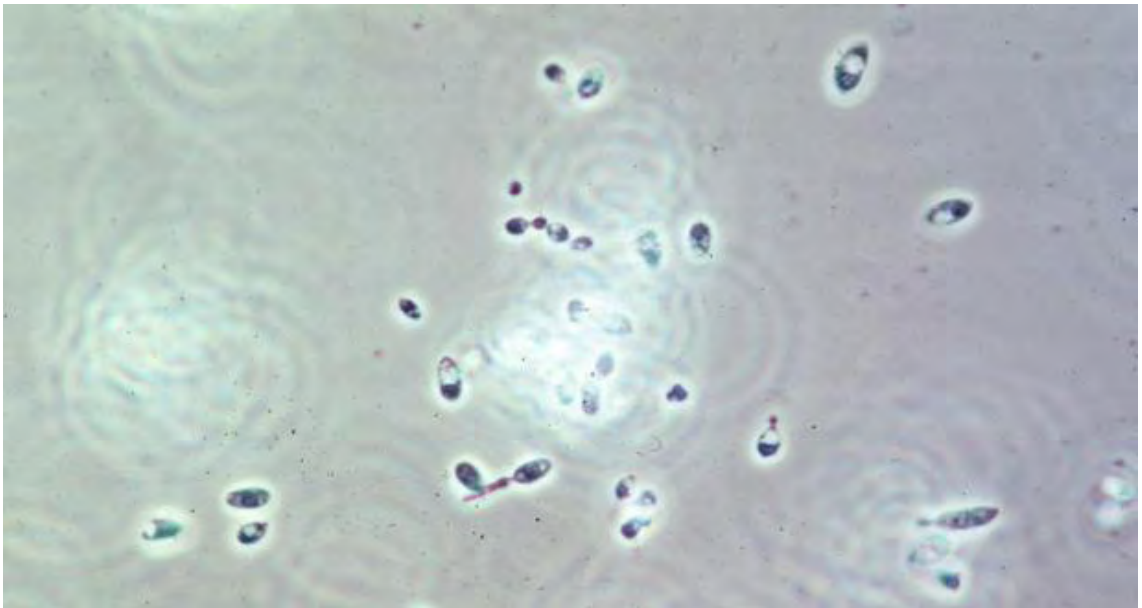


Fig. Nº 105: Tinción de *Histoplasma capsulatum*. (18)

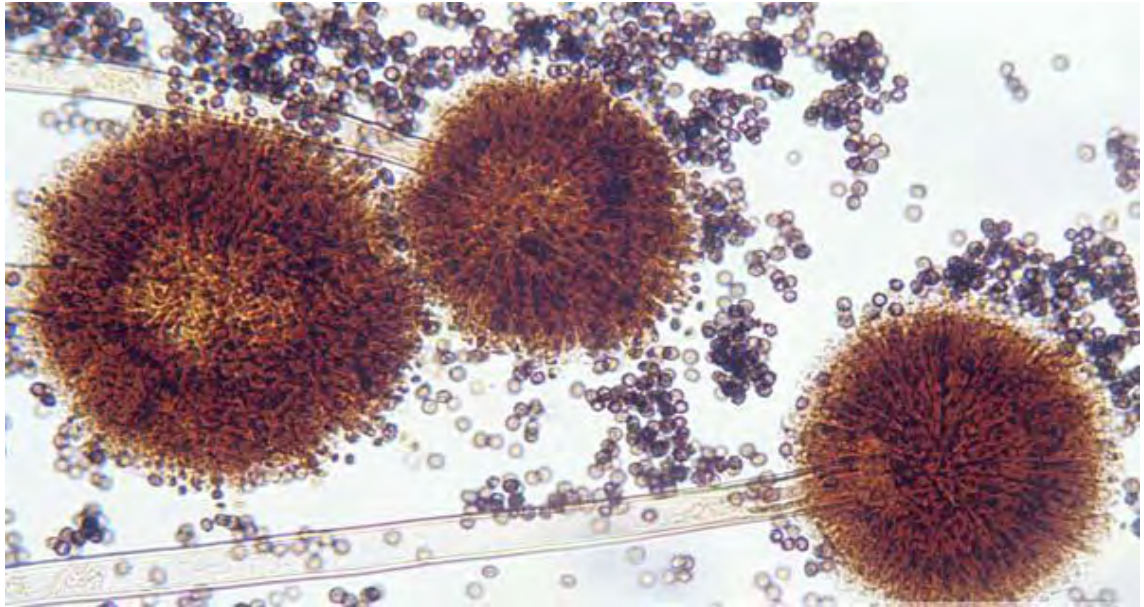


Fig. N° 106: **Aspergillus niger** (18).



Fig. N° 107: **Basidiomycetes** (18)

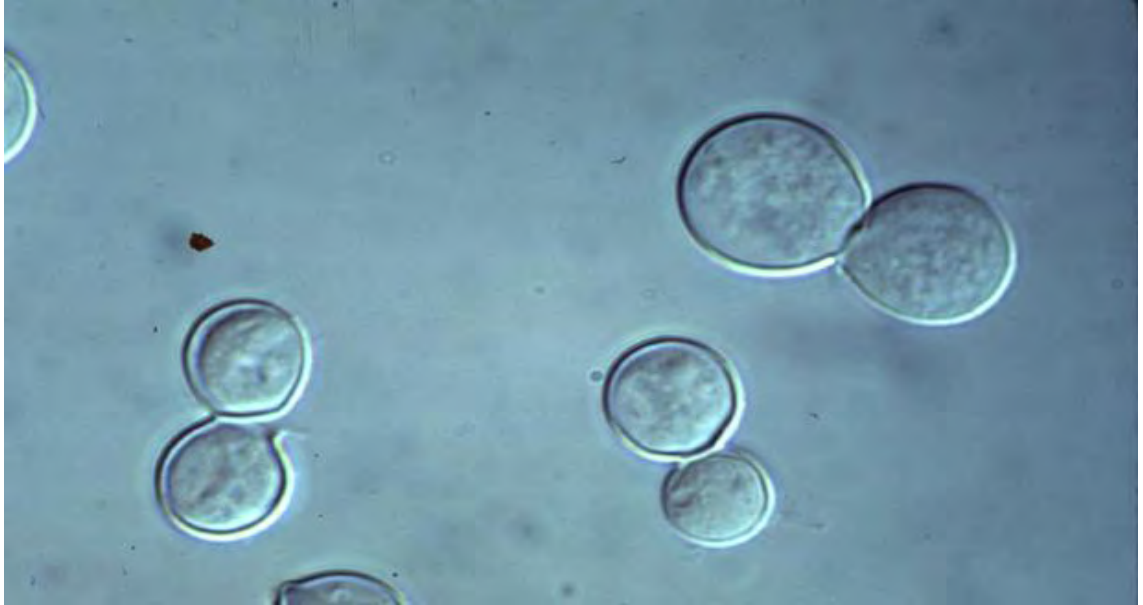


Fig. N° 108: *Blastomyces dermatitidis* (18)



Fig. N° 109: *Candida albicans* (18)

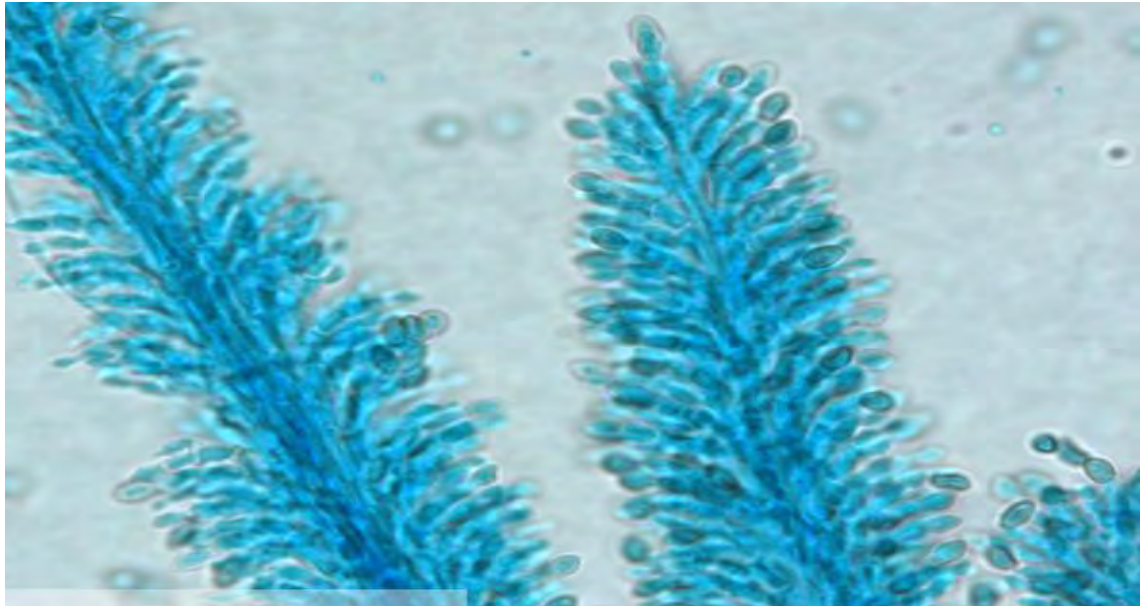


Fig. N° 110: *Cephalotrichium sp* (18)

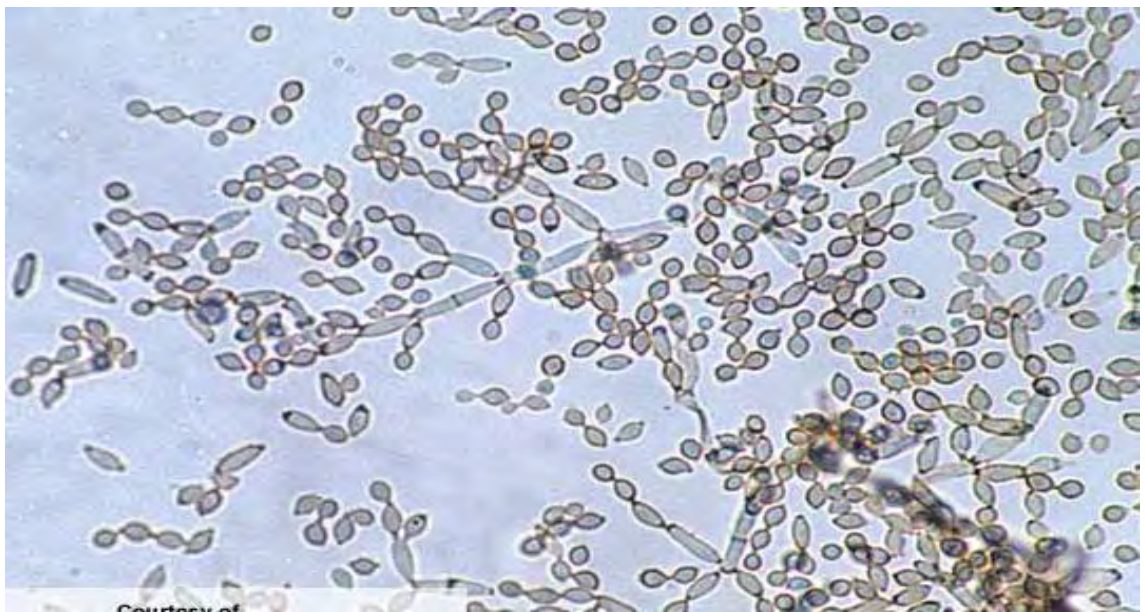


Fig. N° 111: *Cladosporium sp* (18)

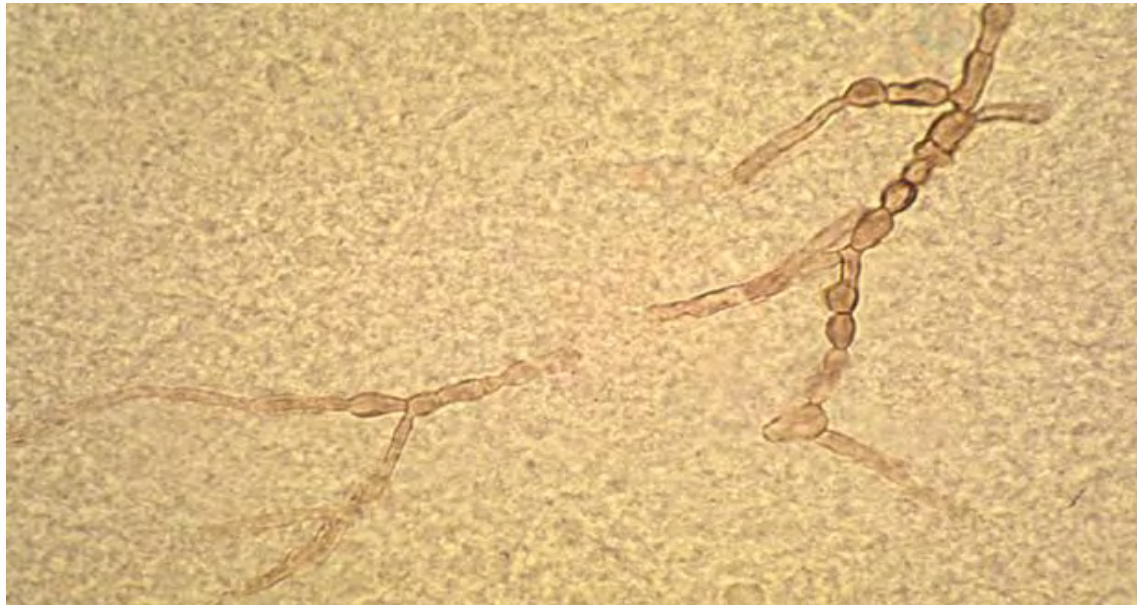


Fig. N° 112: *Exophiala sp* (18)

17.2 Morfologías macroscópicas.

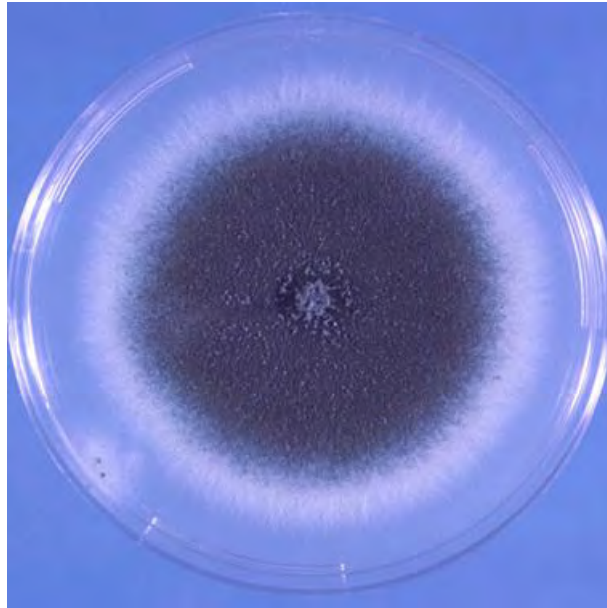


Fig. N° 113: *Aspergillus niger* en Agar PDA. (13)



Fig. 114: *Alternaria sp.* en Agar PDA. (13)



Fig. N° 115: *Aspergillus niger* en Agar Papa Dextrosa. (14)



Fig. N° 116: *Saccharomyces cerevisiae* en Agar Papa Dextrosa. (14)

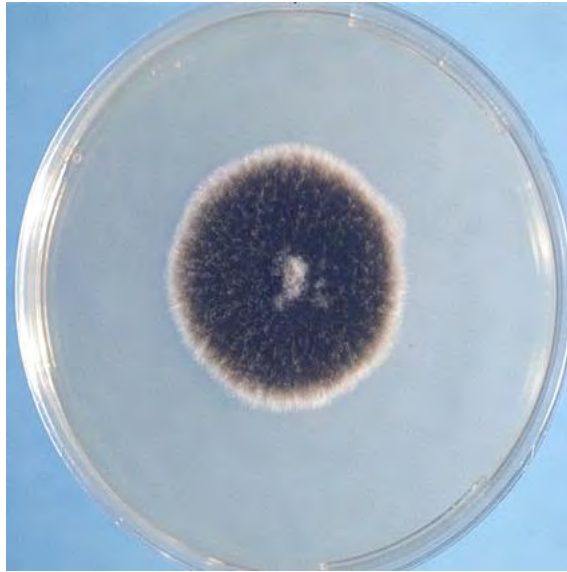


Fig. N° 117: *Alternaria* sp en Agar Czapek Dox. (14)

V CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

1. En la universidad de El Salvador, existe poco recurso bibliografico actualizado disponible que describa en forma práctica las técnicas básicas y avanzadas de microbiología.
2. La mayoría de estudiantes relacionados a las carreras de la salud, expresan la necesidad de tener una guía práctica de microbiología, que reúna de forma completa técnicas básicas como: tinción simple, tinción de Gram., inoculación, etc.; y técnicas innovadoras como: bioquímicas API y PETRIFILM®.
3. Las técnicas PETRIFILM® y las bioquímicas API, comparadas con las técnicas tradicionales, permiten optimizar tiempo recursos costos y mejorar la especificación en la identificación de microorganismos.
4. Todas las técnicas de aislamiento, identificación, manipulación y multiplicación de bacterias y hongos que se describen en la guía se encuentran dispersas en diferentes fuentes bibliograficas. Esta compilación facilita a estudiantes, docentes e interesados el acceso a las técnicas oficiales e innovadoras en una sola fuente.

5. La guía práctica para el aislamiento, identificación, manipulación y multiplicación de bacterias y hongos presenta la descripción de las técnicas básicas de microbiología general, de manera que sean comprensibles por cualquier persona sin conocimientos especializados en la materia.

6. La guía no aborda contenidos de la microbiología y parasitología o de las microbiologías aplicadas de la Facultad de Química y Farmacia. Su objetivo es servir de consulta general a cualquier nivel de estudio de la Microbiología General.

VI RECOMENDACIONES

6.0 RECOMENDACIONES

1. Que los docentes y estudiantes se interesen en la actualización de los diferentes manuales utilizados para impartir las cátedras de microbiología en las carreras relacionadas a la salud de la universidad de El Salvador.
2. Utilizar las técnicas expuestas en la presente guía como un apoyo para los estudiantes y docentes en las cátedras de microbiología general de la Universidad de El Salvador.
3. Incluir en las cátedras de microbiología general las técnicas innovadoras de aislamiento, identificación, manipulación y multiplicación de bacterias y hongos, dado el aumento de su uso a nivel internacional.
4. Que la Universidad de El Salvador capacite a los estudiantes, especialmente a los de química y farmacia, en las técnicas innovadoras PETRIFILM[®] y bioquímicas API; apesar de sus altos costos, ya que las empresas actualmente prefieren estas técnicas porque reducen insumos, ahorran tiempo y son fáciles de manipular.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. APSnet. sa 2003, Culture Collection (en línea), Consultado en Septiembre de 2006, Disponible en: www.apsnet.org.
2. M^a. Aquiahuatl, 2004. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. Iztapalapa México .104 Pág.
3. BIOMÉRIEUX sa, 2004, Automated Identification, API the France.
4. Blackmore G. 1982, Annual Review of microbiology (en línea) volume 36 pág. 217-238 consultado en Agosto 2007, Disponible en: coli.usal.es/micro/cap04.
5. Earl D. 2007 Microbiology and Immunology Montgomery County Community College, consultado en Junio 2007, disponible en: <http://www.mc3.edu>.
6. Gini y otros, 2007 Atlas de Microbiología (en línea), consultado en junio de 2007, disponible en : www.uvg.edu/bacteriología.

7. Hagemann O y otros, Atlas de Bakteriologie (en línea), consultado en Septiembre de 2006, disponible en: www.bakteriologieatlas.
8. Jackson G. F.D.A., 2005 Center for Food Safety & Applied Nutrition, Microscopic examination of foods and care and use of the microscope (en línea), consultado en Septiembre de 2006, disponible en: rim/kwg/las/dav/cjm.
9. Jackson G. y otros, bacteriological Analytical Manual (BAM) Nov. 2002, 8th Ed, consultado en Septiembre de 2006, disponible en: www.BAM.com
10. Korin K. 2007, Flavobacterium, soil microbiology (en línea), consultado en junio 2007, disponible en: filebox.vt.edu/microbes/flavobacterium
11. Martínez L., 2007, Sistemas de siembra y cultivo en anaerobiosis, Laboratorio de ecología microbiana y de alimentos, Universidad de los Andes (en línea) consultado de Agosto 2007, Disponible en: www.cienciasbiologicas.uniandes.edu.co.

12. Martinez C. Revista de la Facultad de Agronomía, sa (en línea). Caracas, Consultado en Septiembre 2006, disponible en: www.scielo.org.ve.
13. MEDFAR, sa Microbiology Medio Library (en línea) consultado el 20 de noviembre 2004, disponible en: MEDFAR.ORG/ATLAS/ATLAS.ASP
14. Microsoft, us sa 2005. Window 98 Microbiology Manual MERK 12th ed 1 disco compacto, 8mm.
15. Molina R, 2007, Descripción y, manejo del microscopio de Campo claro, Universidad de Extremadura (en línea), consultado en Agosto 2007, Disponible en <http://www.unex.es/botanica>.
16. O.P.S. sa. Guía para la calidad del agua potable. Washington DC. 132 Pág.
17. Sampieri R. y otros, 1998, Metodología de la Investigación, 2º ed. McGrawhill, México DF. 203-208 Pág.

18. Sotton D. y otros, DoctorFungus, Culture Collection (en línea), Consultado en Septiembre de 2006, Disponible en <http://www.doctorfungus.org>.

19. Werner M, Programa de enfermedades infecciosas, Montefiore Medical Center and Albert Einstein College of Medicine, última modificación 4 Oct 2001, consultado en Junio de 2007, disponible en: werner@aecom.yu.edu.

20. 3M MICROBIOLOGY PRODUCTS, 2001, PETRIFILM™, disponible en: www.3M.com/microbiology.

GLOSARIO

GLOSARIO

Agar-Agar₍₅₎: extraído de algas rojas (Ej. gelidium), del cual existen versiones más o menos purificadas, las más puras están enriquecidas con el polisacárido agarosa; son las que se emplean para los medios de cultivo, con objeto de evitar la introducción de sustancias "contaminantes" inadvertidas que falseen las interpretaciones sobre el comportamiento nutricional de la bacteria.

Anaerobiosis ₍₅₎: Fenómeno por el que se puede vivir sin la presencia de oxígeno; opuesto a aerobiosis.

Asepsia ₍₁₁₎: Conjunto de procedimientos destinados a eliminar los gérmenes. Se aplican principalmente a la esterilización del material de laboratorio y del lugar de trabajo.

Bacteria ₍₁₁₎: Organismo unicelular, microscópico, sin clorofila ni núcleo, pero con gránulos de cromatina dispersos en el protoplasma y provistos a veces de flagelos o cilios mediante los cuales se mueve en un medio líquido. Muchas de sus especies viven en las aguas, dulces o marinas; abundan en sustancias orgánicas, en el suelo y en materias orgánicas en putrefacción; otras son parásitas, más o menos patógenas.

Cepa ₍₁₁₎: En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Colonia ⁽⁵⁾: Asociación de talófitos en la que las células proceden todas de una sola célula madre, similar a los cenobios pero más permanentes y en la que se suceden las generaciones.

Conidióforo ⁽⁵⁾: Hifa que porta células conidiógenas productoras de conidios.

Desinfectante ⁽¹¹⁾: Biocida, sistema físico o físico-químico que destruye o inactiva irreversiblemente microorganismos patógenos.

Enzima ⁽¹¹⁾: Catalizador biológico, normalmente una proteína, que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares.

Especie cultivada ⁽¹¹⁾: Especie en cuyo proceso de evolución han influido los seres humanos para satisfacer sus propias necesidades.

Esporangio ⁽⁵⁾: Estructura en forma de saco que contiene esporas.

Esporangiospora ⁽⁵⁾: Espora producida en un esporangio.

Esporangióforo ⁽⁵⁾: Hifa que lleva un esporangio.

Hifa ⁽⁵⁾: Filamento tubuloso unidad estructural del micelio de los hongos.

Laboratorio de Microbiología ⁽¹¹⁾: Todo Laboratorio que realice investigaciones microbiológicas (diagnóstico bacteriológico, micológico, virológico y de parasitología) a partir de cultivos y estudios serológicos.

Medio de Cultivo ⁽⁵⁾: Es una solución acuosa bien como tal, o bien incorporada a un coloide en estado de gel en la que están presentes todas las sustancias necesarias para el crecimiento de un(os) determinado microorganismo(s).

Medios diferenciales ⁽¹¹⁾: Son aquellos que permiten distinguir a simple vista dos o más tipos de bacterias en función de su distinto comportamiento respecto de algún nutriente del medio. Ese comportamiento diferencial se traduce normalmente en un viraje de color de una sustancia Indicadora presente en el medio.

Medios selectivos ⁽¹¹⁾: Son aquellos que permiten seleccionar un tipo (o unos pocos tipos) de Microorganismos. En el laboratorio se emplean muchos medios selectivos sólidos que incorporan ciertas sustancias que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias, pero permiten el crecimiento de otras. (Ej. medios que llevan violeta cristal inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas).

Micelio ⁽⁵⁾: Conjunto de hifa del talo de muchos hongos.

Micra ⁽¹¹⁾: Milésima parte del milímetro. Por tanto 1mm= 1000 micras.

Microorganismo ⁽⁵⁾: Organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos.

Mitosis ⁽⁵⁾: Proceso de división de una célula. Véase meiosis

Organismo ⁽⁵⁾: Entidad biológica capaz de reproducirse o de transmitir material genético, incluyéndose dentro de este concepto a las entidades microbiológicas, sean o no celulares. Casi todo organismo está formado por células, que pueden agruparse en órganos, y éstos a su vez en sistemas, cada uno de los cuales realizan funciones específicas.

Patógeno ⁽⁵⁾: Productor o causante de enfermedad.

pH⁽⁵⁾: Un acrónimo utilizado para designar la concentración de iones hidrógeno en una solución, en éste caso en el agua. Viene definido como el número resultante de realizar la operación $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ siendo $[\text{H}^+]$ la concentración de iones hidrógeno

Placa de Petri ⁽⁵⁾: Platos de vidrio de 10 cm de diámetro que se utilizan para el cultivo de bacterias.

Toxina ⁽⁵⁾: Proteína responsable de la especificidad funcional de ciertas bacterias, que es venenosa para determinados organismos. Entre las mejor conocidas, tanto por su estructura como por los mecanismos de acción, figuran las toxinas colérica y tetánica que interaccionan con las células diana a través de gangliósidos de membrana.

ANEXOS

**ANEXO 1
ENCUESTA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y CONTAMINACION AMBIENTAL**

PROPÓSITO: Conocer las opiniones, necesidades y expectativas de los estudiantes de diversas carreras en el área de la salud, que se sirven en la Universidad de El Salvador, con respecto al conocimiento que poseen y la utilidad que presta la Microbiología General y Aplicada así como la importancia que ellos creen que tiene en su ámbito como futuros profesionales .

I DATOS GENERALES

Edad: _____ Sexo: _____ Nivel Académico: _____

Año de ingreso a la Universidad: _____

Facultad a la que pertenece:

Carrera que cursa:

II PREGUNTAS

1. Subraye una o mas de de los siguientes métodos utilizad

Microbiología que ud. Conoce:

- a) Tinción simple.
- b) Tinción de Gram.

- c) Técnicas de inoculación en cajas de Petri (estría cruzada).
- d) Descripción macroscópica y microscópica de hongos y levaduras.
- e) Métodos de Cuantificación de Microorganismos.
- f) Preparación y esterilización de materiales y medios de cultivo.
- g) Otros.
- h) Ninguno.

2. Enumere uno o mas de los recursos bibliográficos que mas utiliza para el estudio y/o investigación de Microbiología:

- a) Libros de Microbiología.
- b) Tesis de la Facultad.
- c) Internet.
- d) Enciclopedias.
- e) apuntes de clases.
- f) otros.

¿Cuáles?:

3. Ha consultado en alguna ocasión una guía practica para la identificación v manipulación de microorganismos :

- a) no.
- b) Sí .

¿Cuáles?

4. Que elementos considera serian importantes o relevantes en el contenido de una guía practica para el aislamiento, identificación, manipulación y multiplicación de bacterias y hongos:

- a) Recopilación de las técnicas fundamentales en el aislamiento el identificación de microorganismos.
- b) Reunir técnicas de preparación y uso de medios de cultivo.
- c) Esquematizar metidos microbiológicos oficiales basados en las normativas nacionales e internacionales.
- d) Ninguno.
- e) Otros.

¿Cuales?


ANEXO 2
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS API STAPH
LISTA DE PERFILES

api Staph	V4.0	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>		0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>		0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>		0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>		0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>		0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>		0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>		0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph. cohnii ssp urealyticum</i>		0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>		0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>		0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>		0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>		0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>		0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>		0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>		0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosum</i>		0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>		0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria varians/rosea</i>		0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
<i>Micrococcus spp</i>		0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91

ANEXO 3 INTERPRETACION DE RESULTADOS API 20 STREP LISTA DE PERFILES

api 20 Strep V6.0	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	BHEM
<i>Aerococcus viridans</i> 1	13	90	96	54	33	16	37	1	5	1	83	33	85	70	83	99	33	41	70	33	1
<i>Aerococcus viridans</i> 2	15	70	51	76	10	20	25	1	5	5	25	1	35	2	70	89	1	5	24	1	5
<i>Aerococcus viridans</i> 3	22	88	99	40	85	48	14	14	1	1	8	2	82	5	91	99	37	99	14	1	1
<i>Alloiococcus otitis</i>	0	25	0	100	0	3	100	1	90	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus avium</i>	99	80	99	94	15	0	24	1	99	0	99	40	100	95	95	99	1	40	15	0	1
<i>Enterococcus durans</i>	100	43	100	97	32	2	76	0	91	100	99	15	2	0	84	76	0	0	56	0	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	99	46	99	97	1	0	21	4	99	94	98	0	98	92	92	100	0	0	96	2	1
<i>Enterococcus faecium</i>	94	43	99	95	42	1	90	3	97	93	85	70	78	18	84	98	26	9	73	3	1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	99	100	100	95	45	99	0	99	99	99	100	99	1	100	100	99	99	83	20	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	95	0	0	0	1	53	0	99	0	46	6	1	0	1	0	0	0	73	53	0
<i>Gemella haemolysans</i>	25	0	0	70	0	0	1	84	40	1	1	0	20	10	5	2	0	0	10	5	1
<i>Gemella morbillorum</i>	3	0	0	35	0	0	10	35	86	4	5	0	1	0	1	11	3	1	16	5	0
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	98	15	91	1	13	0	41	4	89	0	27	0	17	0	96	30	0	20	25	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	90	40	99	35	3	0	35	3	96	95	95	15	45	1	72	87	4	5	90	3	1
<i>Leuconostoc</i> spp	91	1	80	5	55	0	65	2	70	10	37	35	29	4	35	65	0	42	11	0	0
<i>Listeria</i> spp	97	79	98	0	0	0	0	0	85	0	6	0	0	0	49	92	1	1	72	0	26
<i>Abiotrophia adiacens</i>	0	0	10	80	0	25	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Abiotrophia defectiva</i>	25	0	15	99	100	0	100	0	92	0	0	0	0	0	99	100	5	93	99	0	0
<i>Streptococcus acidominimus</i>	1	95	4	13	1	66	30	60	96	18	17	0	42	10	70	65	0	0	10	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	99	1	1	4	79	1	96	99	99	98	0	1	1	50	87	0	1	35	4	75
<i>Streptococcus anginosus</i>	100	0	100	0	44	0	1	99	100	100	0	0	33	0	99	88	0	44	97	0	37
<i>Streptococcus bovis</i> I	97	2	100	2	71	4	14	0	97	0	2	13	86	0	100	90	63	90	100	90	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 1	95	4	97	1	86	1	17	0	100	1	0	14	0	0	93	30	61	99	73	65	0
<i>Streptococcus bovis</i> II 2	86	4	100	13	85	88	94	0	100	13	0	1	0	0	99	99	13	72	40	13	0
<i>Streptococcus canis</i>	0	1	25	4	95	1	80	100	100	100	100	0	0	0	99	1	0	1	99	0	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	100	1	27	0	0	0	5	99	100	100	0	0	0	0	10	72	0	0	12	0	61
<i>Streptococcus dys.</i> ssp <i>dysgalactiae</i>	0	0	1	1	1	99	0	100	99	100	99	0	1	50	86	100	0	1	99	30	2
<i>Streptococcus dys.</i> ssp <i>equisimilis</i>	0	1	25	1	1	99	1	99	100	97	97	1	1	1	45	99	0	1	98	40	94
<i>Streptococcus equi</i> ssp <i>equi</i>	1	0	1	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0	1	0	0	100	100	100	
<i>Streptococcus equi</i> ssp <i>zooepidemicus</i>	0	1	15	0	0	100	1	99	100	99	85	0	0	99	100	0	0	0	99	99	99
<i>Streptococcus equinus</i>	100	0	95	0	28	0	1	1	100	0	0	0	30	0	25	7	25	15	17	10	0
<i>Streptococcus group</i> L	0	75	1	0	0	100	1	100	100	100	100	0	0	0	75	100	0	0	100	98	94
<i>Streptococcus intermedius</i>	100	0	87	0	0	0	44	99	100	100	0	0	0	0	99	99	3	3	99	0	40
<i>Streptococcus mitis</i> I	1	0	3	1	21	0	25	35	99	19	14	1	0	1	94	7	3	26	67	5	0
<i>Streptococcus mitis</i> 2	0	0	3	0	31	0	35	50	100	99	1	0	1	0	100	1	1	31	84	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	99	0	99	1	64	0	1	1	100	18	0	0	99	90	90	100	81	81	1	0	1
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	1	1	50	0	46	72	100	5	1	0	1	0	99	32	1	72	96	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	99	60	70	3	79	3	100	57	3	0	0	0	99	98	64	87	84	10	1
<i>Streptococcus porcinus</i>	100	5	99	1	19	99	1	97	97	100	98	0	88	88	83	99	0	0	50	0	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1	5	98	0	15	0	100	100	99	0	0	8	1	99	98	0	1	61	22	98
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp <i>salivarius</i>	85	0	98	1	8	0	70	20	100	0	0	0	5	1	86	67	34	88	74	1	1
<i>Streptococcus sanguis</i>	0	1	82	0	63	0	1	5	100	90	0	0	1	48	83	98	33	55	67	0	0
<i>Streptococcus suis</i> I	0	1	82	53	80	94	76	1	100	91	0	0	7	0	94	100	75	0	100	89	0
<i>Streptococcus suis</i> II	0	1	78	41	91	91	52	3	100	95	0	0	3	1	99	98	63	93	99	96	2
<i>Streptococcus uberis</i>	99	98	100	35	10	86	5	30	100	98	99	0	99	98	99	100	89	10	50	20	0



ANEXO 4
 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS API 20 E
 LISTA DE PERFILES

 V4.0		ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2	N2	MOB	McC	OF/O	OF/F
<i>Salmonella paratyphi A</i>		0	5	0	99	100	1	0	0	0	0	0	100	99	0	99	98	0	96	0	99	0	100	0	95	100	100	100
<i>Salmonella pullorum</i>		0	1	75	100	100	85	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	75	0	100	0	0	100	100	100
<i>Salmonella typhi</i>		0	1	99	0	100	8	0	0	0	0	0	100	99	0	99	0	0	99	0	0	0	100	0	97	100	100	100
<i>Salmonella spp</i>		1	56	82	93	65	83	0	0	1	0	1	99	100	40	99	85	1	90	1	99	1	100	0	95	100	100	100
<i>Serratia ficaria</i>		99	0	0	0	100	0	0	0	0	40	90	100	100	50	99	74	99	99	100	99	0	92	0	100	100	100	100
<i>Serratia fonticola</i>		99	0	73	99	75	0	0	0	0	0	0	100	100	97	100	99	30	99	99	99	0	99	0	91	100	100	100
<i>Serratia liquefaciens</i>		95	1	78	98	80	0	2	0	0	59	65	100	99	80	98	2	99	72	97	97	0	100	0	95	100	100	100
<i>Serratia marcescens</i>		94	0	95	95	96	0	25	0	1	70	87	100	99	85	98	1	99	68	97	25	0	95	0	97	100	100	100
<i>Serratia odorifera 1</i>		95	0	95	99	95	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	99	0	100	100	100	100
<i>Serratia odorifera 2</i>		95	0	96	1	95	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	1	99	99	95	0	99	0	100	100	100	100
<i>Serratia plymuthica</i>		99	0	0	0	65	0	0	0	0	65	50	100	90	70	70	1	99	85	98	98	0	99	0	50	100	100	100
<i>Serratia rubidaea</i>		99	0	30	0	92	0	1	0	0	71	82	99	99	75	1	3	99	95	99	99	0	100	0	85	100	100	100

ANEXO 5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS API 20 NE LISTA DE PERFILES

api 20 NE	V6.0	N03	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNGP	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADia	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	92	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Comamonas acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Comamonas testosteroni/Ps.alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Chryseomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2	
<i>Flavimonas oryzae</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Shewanella putrefaciens</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	0	99	4	95	70	0	0
<i>Acinetobacter lawffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99
<i>Aer. salm. ssp. masoucida/achromogenes</i>		100	21	0	0	0	2	99	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Alcaligenes denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Alcaligenes xyloxydans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	77	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	100
<i>CDC gr. IV C-2</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	12	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella haemolytica</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	2	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	85	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio hollisae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	50	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100

* Comparar las reacciones de la hoja de resultados con los de la Tabla de Identificación, con la lista de perfiles, con el Catálogo Analítico API STAPH, o el software APILAB PLUS.

		REF.: _____												bioMérieux 5a 67000 Marcy l'Étoile/France Tel. 78 87 24 00 Fax 78 87 20 00 DRAMONDEX SA All England Way, Welwyn Garden City Herts SG13 9JQ, UK						
		Origine / Source / Herkunft / Origin / Prelevo: _____																		
																				
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
0	GLU	FDU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	URE	URE	URE	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests: _____																				
Ident: _____																				


ANEXO 8
HOJA DE RESULTADOS API STAPH

* Comparar el perfil bioquímico obtenido con la Tabla de identificación o con el Catálogo Analítico Index API 20 STREP o bien con el software APILAB PLUS.

api 20 Strep D7226 A

REF.: _____

 Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelievo: _____

 **bioMérieux**

	4h	24h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
	VP	HP	ESC	PYR	GAL	GAL	BAL	PAL	LAP	ADH	PIB	ASA	MAN	SOR	LAC	TRE	RAJ	RAF	ANO	GLY	HEM			
4h	○																							
24h	○																							

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri testis / Otros tests : _____

Ident. : _____

ANEXO 9
HOJA DE RESULTADOS API STREP