

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura

MANUAL PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DE
TRABAJO

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	
	DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y CONTAMINACIÓN AMBIENTAL SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA	Código
MANUAL DE CONSERVACION DE CEPAS DE REFERENCIA		N° de páginas: Versión: Fecha:
Elaborado por:	Br. Raúl Alejandro Serpas Tejada Br. Juan Manuel Pacheco Molina	Fecha:
Revisado por:		Fecha:
Aprobado por:		Fecha:

Indice

1. Introducción
2. PMC001. Cultivo inicial y estandarización de microorganismos por espectrofotometría
3. PMC002. Conservación de microorganismos en agar BHI
4. PMC003. Reanimación y proliferación de cultivos conservados en agar BHI
5. PMC004. Verificación de pureza de cultivos bacterianos
6. PMC005. Identificación y caracterización de ***Staphylococcus aureus***.
7. PMC006. Identificación y caracterización de ***Pseudomonas aeruginosa***.
8. PMC007. Identificación y caracterización de Enterobacterias.
9. RMC001. Registro de verificación de la calidad de cepas de referencia.

I. Objetivo.

Describir la técnica de conservación en agar infusión cerebro-corazón (BHI) para cepas de referencia bacterianas y los pasos a seguir para evaluar su desempeño durante un periodo de 2.5 años.

II. Alcance:

Los métodos descritos en este manual aplican para la conservación de cepas bacterianas (***Escherichia coli***, ***Pseudomona aeruginosa***, ***Salmonella***, ***Staphylococcus aureus***) para las que se han demostrado la adecuabilidad de la técnica de conservación en agar infusión cerebro corazón por al menos 3 meses.

La ejecución de los procedimientos será responsabilidad de los técnicos laboratoristas y estudiantes en servicio social previamente capacitados y autorizados para su realización.

La supervisión de estos procedimientos será realizada por los docentes responsables del laboratorio.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Cultivo inicial y estandarización de microorganismos por espectrofotometría	Código: PMC-001 Página 1 de 4 Versión:1.0 Fecha:

Descripción del método: Involucra el cultivo y cosecha del microorganismo, preparación de soluciones estandarizadas mediante el método de espectrofotometría y verificación de la densidad microbiana esperada mediante recuento en placa.

Materiales y equipo:	Medios y reactivos
- Espectrofotómetro UV-Vis Metertech SP-830 plus. - Tubos de Micro centrífuga - Perlas de ebullición estériles - Pipetas de 5 y 1 mL estériles	- Tubos de ensayo con tapón de rosca conteniendo 5 ml y 9.9 mL de solución salina estéril -Placas con agar nutritivo -Tubos inclinados con agar nutritivo

Paso 1. El cultivo inicial podrá proceder de:

- a) Un criovial o liofilizado obtenido de una fuente confiable (laboratorio farmacéutico, de análisis o proveedor de cepas de referencia), en cuyo caso para su cultivo se deberá seguir las instrucciones del proveedor.
- b) Una placa con microorganismo obtenida de una fuente confiable (laboratorio farmacéutico, de análisis, etc). En este caso se deberá sembrar cada microorganismo, usando el método de extendido, en dos tubos con agar nutritivo, y se incubará a 37 °C durante 24-48 h.
- c) 2 tubos inclinados procedentes de cultivo reanimado en el laboratorio de acuerdo a PMC-003.

Para garantizar la confiabilidad de la fuente disponible se deberá solicitar el certificado de cada cepa de microorganismo a utilizar.

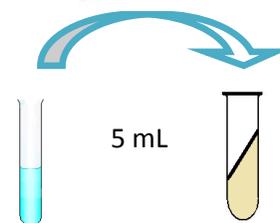
Paso 2. Encender el espectrofotómetro y dejarlo aclimatar durante 30 min. aproximadamente.



Paso 3.

a) Pipetear aproximadamente 5 mL de solución salina estéril y colocarla en los tubos con agar inclinado conteniendo el microorganismo de interés previamente cultivado como se indica en PMC-003.

b) Arrastrar suavemente el cultivo de la superficie de los tubos. Se pueden agregar perlas de ebullición estériles para ayudar a una mejor desprendimiento de los microorganismos.



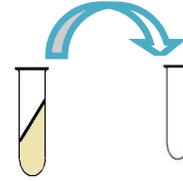


UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN

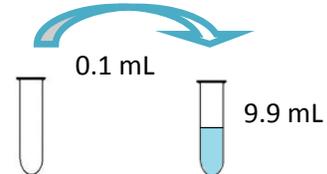
Cultivo inicial y estandarización de microorganismos por espectrofotometría

Código: PMC-001
Página 2 de 4
Versión:1.0
Fecha:

Paso 4. Decantar la suspensión a un tubo de ensayo estéril



Paso 5. Tomar 0.1 de la suspensión madre y diluir en 9.9 mL de solución salina estéril



Paso 6. Leer la suspensión diluida a una longitud de onda de 580 nm y ajustar agregando más microorganismo o suspensión salina hasta llegar a la absorbancia deseada para cada microorganismo de acuerdo a la siguiente tabla:

Microorganismo	Absorbancia
<i>Escherichia coli</i>	0.192
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.138
<i>Salmonella</i>	0.171
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.135

Las suspensiones así obtenidas tienen un recuento aproximado de 1×10^{10} UFC/mL de microorganismo.

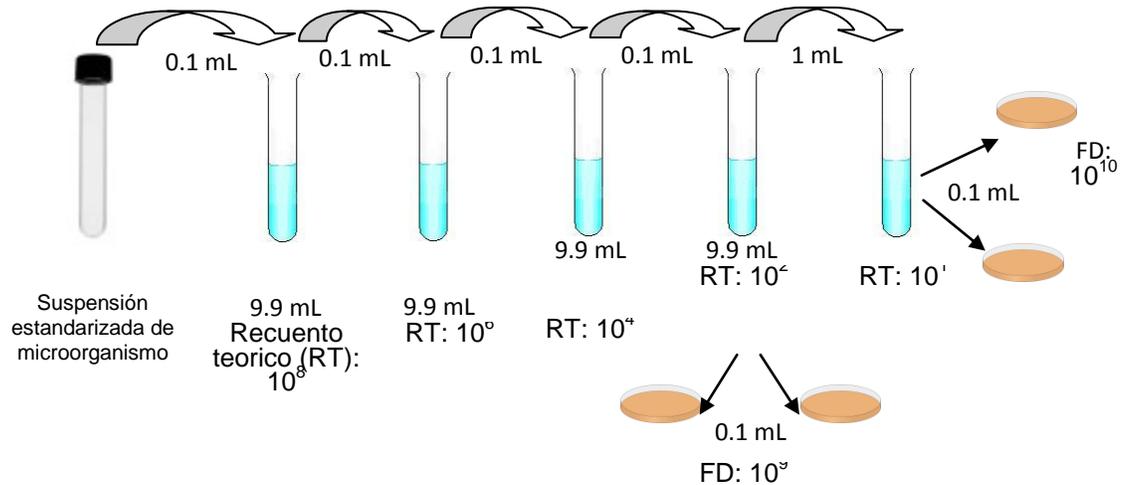
Paso 7. Confirmar la densidad celular obtenida mediante recuento en placa, realizando diluciones seriadas de acuerdo a lo indicado en el esquema. Determinar el recuento de la solución estandarizada mediante el plaqueo por duplicado de 0.1 mL de las dos últimas diluciones en placas con 20 mL de Agar Nutritivo, usando la técnica de placa dispersa.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN

Cultivo inicial y estandarización de microorganismos por espectrofotometría

Código: PMC-001
Página 3 de 4
Versión:1.0
Fecha:



Paso 8. Incubar las placas a 37 °C durante 24 horas.

Paso 9. Contar las placas conteniendo entre 25 y 250 colonias.

Paso 10. Hacer los cálculos utilizando el Factor de Dilución apropiado.

Ej: Recuento en placas inoculadas con dilución de recuento teórico 10^2 (FD: 10^9):

Placa 1: 24 UFC Placa 2: 17 UFC. Promedio = $(23+17) \div 2 = 20$ UFC/mL en suspensión estandarizada: Promedio de UFC \times FD = $20 \times 10^9 = 2 \times 10^{10}$.

Paso 11. Registrar la absorbancia y recuento obtenidos en la viñeta de identificación de los tubos con agar BHI (Presentado en PMC-002)

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Cultivo inicial y estandarización de microorganismos por espectrofotometría	Código: PMC-001 Página 4 de 4 Versión:1.0 Fecha:

Esquema general del procedimiento:

Obtener cultivo inicial: liofilizado, criovial, o placa procedente de fuente confiable cultivados en tubos inclinados, o tubos inclinados procedentes de PMC003.



Encender el espectrofotómetro y permitirle aclimatarse por 30 min.



Arrastrar el microorganismo cultivado usando 5 mL de solución salina estéril



Diluir 0.1 mL de la suspensión madre en 9.9 mL de solución salina estéril



Leer la suspensión a una longitud de onda de 580 nm y ajustar hasta llegar a las absorbancias deseadas.



Confirmar la densidad celular obtenida mediante la elaboración de diluciones seriadas y recuento en placa.

Fin del procedimiento.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN

Conservación de microorganismos en agar
BHI

Código: PMC-002
Página 1 de 3
Versión:1.0
Fecha:

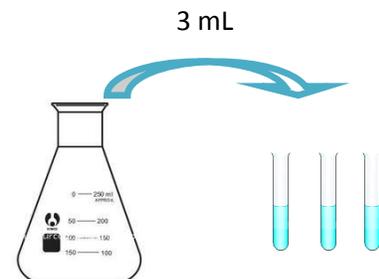
Descripción del método: Se fundamenta en la utilización del medio de conservación a largo plazo propuesto por el BAM (manual de análisis bacteriológico). Consiste en la adición de una suspensión de microorganismos a agar BHI, crecimiento y posterior conservación de este sistema a temperatura controlada.

Materiales y equipo:	Medios y reactivos:
<ul style="list-style-type: none">- Tubos- Autoclave- Asa bacteriológica- Tapones de gasa y algodón- Papel parafilm- Asa en punta	<ul style="list-style-type: none">- Agar BHI, pH 7.4 \pm (composición: agar-agar 2.5 g, caldo BHI marca BD 6.1 g, agua desmineralizada 160 mL) dispensado en tubos.

Procedimiento

Paso 1. Preparar y esterilizar la cantidad de agar BHI a utilizar

Paso 2. Dispensar en porciones de 3 mL. Preparar 7 tubos por cada cepa de microorganismo a conservar. Dejar solidificar en posición totalmente vertical, tapando con tapones de torunda de algodón y gasa.



Paso 3. Esterilizar un asa en punta sometiéndola a la llama de un mechero y tomar un inculo del tubo de microorganismos estandarizados (Obtenido según procedimiento indicado en PMC-001)



Paso 4. Inocular el tubo con agar BHI, perforando con el asa hasta la mitad del medio.



	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Conservación de Microorganismos en Agar BHI	Código: PMC-002 Página 2 de 3 Versión:1.0 Fecha:

Paso 5. Tapar con tapones de torunda de algodón y gasa.

Paso 6. Incubar los tubos a 35°C por 24 horas

Paso 7. Sellar los tubos con papel parafilm para evitar una posible contaminación.

Paso 8. Identificar cada tubo de cada microorganismo conservado usando la siguiente etiqueta:

Microorganismo: _____
N° de ATCC: _____ N° de Pase: _____ Tubo N° _____
Fecha de preparación: _____ Preparó: _____
Abs. y recuento inicial de inóculo estandarizado: _____

Paso 9. Almacenar a temperatura controlada entre 8 y 10 °C durante seis meses.

Paso 10. Al principio del sexto mes de conservación tomar el tubo N° 7 de cada microorganismo conservado, reanimar y proliferar de acuerdo a lo indicado en PMC003 y repetir este procedimiento de conservación para dar lugar a otro lote de microorganismos.

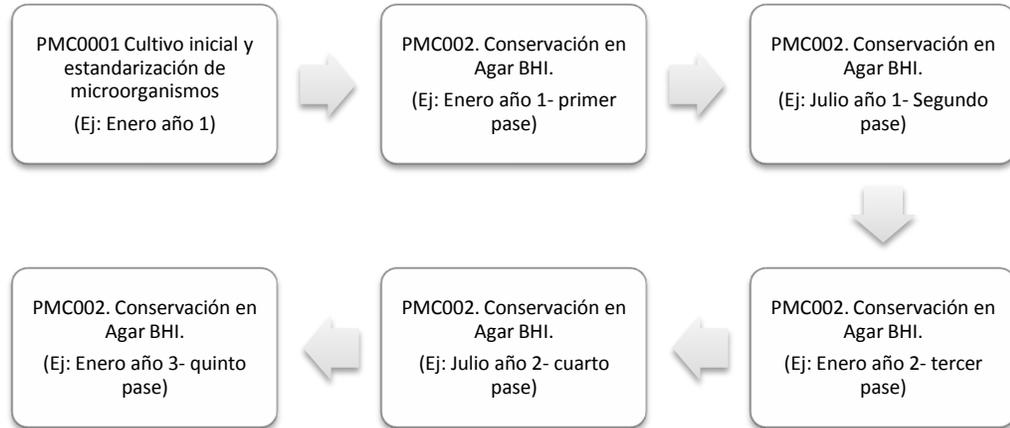
Frecuencia: Realizar este procedimiento en Enero, y Julio de cada año hasta llegar al quinto pase desde el inoculo inicial: como indica el siguiente diagrama:



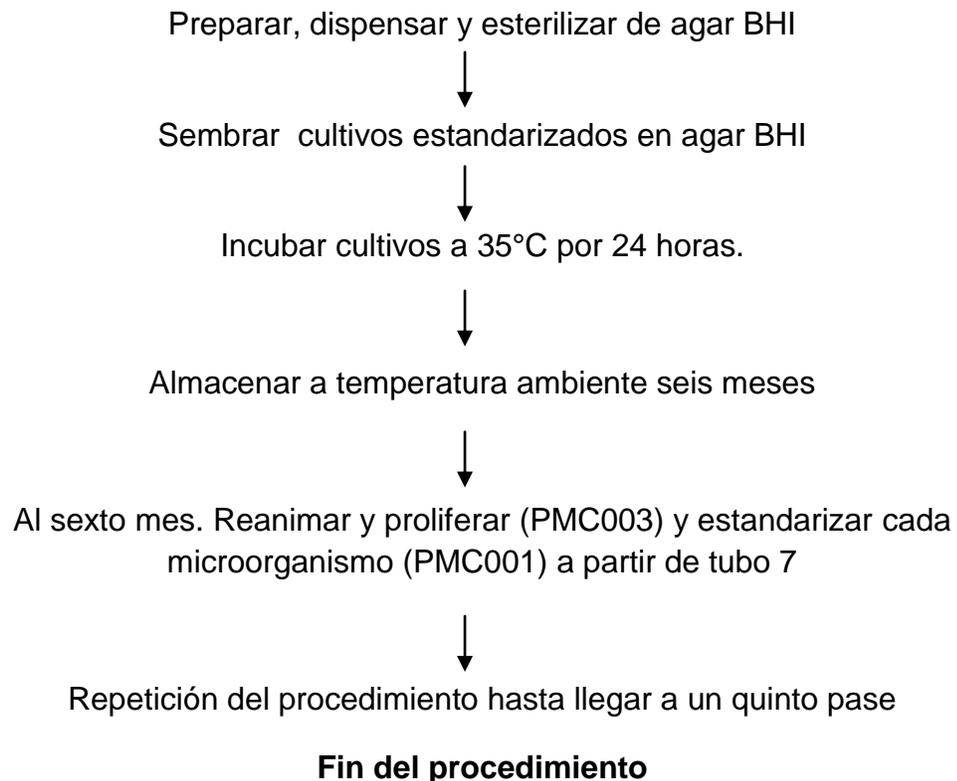
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN

Conservación de Microorganismos en Agar BHI

Código: PMC-002
Página 3 de 3
Versión:1.0
Fecha:



Esquema general del procedimiento:



	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Reanimación y proliferación de cultivos conservados en Agar BHI	Código: PMC-003 Página 1 de 2 Versión:1.0 Fecha:

Descripción del método: Preparación de una suspensión de microorganismos mediante la desintegración de un tubo de agar BHI conteniendo el microorganismo de interés para permitir su reanimación en un medio de cultivo, proliferación y posterior utilización en los ensayos deseados.

Materiales y equipo:	Medios y reactivos:
Pipetas morh Incubadora Mechero Bunsen Placas de petri Asa bacteriológica Espátula estéril	Tubos grandes conteniendo 10 mL de Solución Salina Estéril. Placas o tubos de agar nutritivo u otro medio apropiado

Paso 1. Tomar un tubo de agar BHI con el microorganismo conservado y con ayuda de asa bacteriológica o espátula estéril transferirlo completo a un tubo conteniendo 10 mL de solución salina y perlas de ebullición.



Paso 2. Homogenizar con ayuda de un vortex

Paso 3. Sembrar el producto del paso anterior en el formato y medio de cultivo apropiado según necesidad:

- a) **Cultivo de trabajo para el laboratorio:** tomar del tubo correspondiente al mes (Ej. Tubo 1 – Enero. Tubo 3 – Marzo, etc), y sembrar 1 mL de la suspensión del paso 2 en un número apropiado de placas o tubos inclinados con agar nutritivo o TSA dependiendo de la posterior utilización del cultivo de trabajo. Después de la incubación y verificación, estas placas y tubos se conservaran durante un máximo de un mes.
- b) **Cultivo para conservación:** En el sexto mes después de la conservación se sembrará 1 mL de la suspensión del paso 2 en un mínimo de dos tubos inclinados con agar nutritivo, los cuales serán posteriormente utilizados según indica el procedimiento PMC-002

Adicionalmente, en ambos casos, se deberá sembrar en una placa 0.5 mL de la suspensión del paso 2, mediante la técnica de estriado de tal forma que se pueda realizar la verificación de la pureza de los cultivos.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Reanimación y proliferación de cultivos conservados en Agar BHI	Código: PMC-003 Página 2 de 2 Versión:1.0 Fecha:

Paso 4. Incubar a 37 °C de uno a cinco días, elegir el tiempo suficiente que muestre crecimiento significativo.

Paso 5. Se verificará la pureza microbiológica del crecimiento de la placa sembrada por estriado siguiendo la metodología indicada en PMC-004.

Paso 6. En caso de detectar alguna anomalía en el paso 5, comunicar al jefe de laboratorio.

Paso 7. Si la pureza microbiológica corresponde con los resultados esperados proceder de acuerdo al tipo de cultivo:

- a) Cultivo de trabajo para el laboratorio. Utilizar según necesidad.
- b) Cultivo para conservación.

Identificar y caracterizar la cepa en estudio según corresponda (PMC-005, PMC-006, PMC-007), dejar registro de resultados en RMC001.

Esquema general de procedimiento:

Desintegrar el contenido de un tubo de agar BHI con el cultivo de interés, en un tubo con 10 mL solución salina estéril y homogenizar.



Sembrar volumen adecuado de la suspensión obtenida mediante el método de extendido en un número apropiado de tubos o placas de acuerdo a necesidad.



Incubar a 37 °C de uno a cinco días.



Utilizar y/o verificar la pureza del cultivo como se indica en PMC-004.



En el caso de cultivo para conservación, identificar y caracterizar la cepa en estudio según corresponda, como se indica en PMC-005, PMC-006, PMC-007

Fin del procedimiento.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Verificación de pureza de cultivos bacterianos.	Código: PMC-004 Página 1 de 2 Versión:1.0 Fecha:

Descripción del método: Verificación de la pureza de los cultivos iniciales (en placa) procedentes de cualquiera de las fuentes indicadas en el PMC-001, realizada mediante observación macroscópica y microscópica de los microorganismos y contraste con referencia bibliográfica y certificado de cada cepa.

Materiales y equipo:	Medios y reactivos:
Asa bacteriológica Incubadora Mechero Bunsen Placas de petri Portaobjetos Microscopio Cubreobjetos.	Solución salina Agar nutritivo Kit de tinción gram

Paso 1. Tomar una placa de las obtenidas en la verificación del recuento indicada en el PMC-001, en la que se observen colonias aisladas.

Paso 2. Observar la morfología macroscópica de las colonias y describir en la sección correspondiente del registro RMC-001

Paso 3. Con la ayuda del asa bacteriológica tomar una colonia aislada y verificar su pureza microscópica mediante una tinción gram.

Descripción de la técnica de tinción diferencial de gram.

- Colocar una gota de solución salina estéril en un portaobjetos.
- Agregar mediante una asa bacteriológica una colonia aislada del microorganismo de interés.
- Fijar mediante flameado.
- Añadir el colorante cristal violeta por un minuto.
- Enjuagar con agua
- Aplicar el mordiente (lugol) aplicar por un minuto.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Verificación de pureza de cultivos bacterianos.	Código: PMC-004 Página 2 de 2 Versión:1.0 Fecha:

- Lavar con alcohol-acetona.
- Aplicar safranina o fucsina que teñirá las bacterias decoloradas por medio minuto.
- Lavar con agua y secar suavemente.
- Observar al microscopio.

Paso 4. Un cultivo puro debe presentar una sola clase de morfología microscópica, en caso de no encontrarse el cultivo puro se deberá comunicar al jefe de laboratorio.

Paso 5.

Anotar los datos obtenidos en el registro RMC-001

Esquema general de procedimiento

Tomar placa con microorganismo de interés y recuento contable obtenido del procedimiento indicado en PMC-001



Observar la morfología macroscópica y describir las colonias.



Realizar una tinción de gram.



Observar la morfología microscópica



Llenar el registro RMC-001 con los datos obtenidos.

Fin del procedimiento.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Identificación y caracterización de <i>Staphylococcus aureus</i>	Código: PMC-005 Página 1 de 3 Versión:1.0 Fecha:

Descripción del método: Para la identificación del ***Staphylococcus aureus***, bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada, se realizan siembras en medios selectivos tales como Baird Parker y agar Chapman, verificando el cumplimiento de las características esperadas de este microorganismo en dichos medios y adicionalmente se realiza la prueba de la coagulasa.

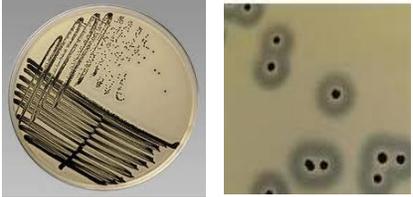
Materiales y equipo:	Medios y reactivos:
Asa bacteriológica Incubadora Mechero Bunsen Placas de petri	Solución salina Agar nutritivo Agar Chapman Agar Baird Parker Telurito + yema de huevo Caldo infusión cerebro corazón Plasma de conejo

Paso 1 De la placa con microorganismo de interés obtenido del procedimiento indicado en PMC-001 que cumpla a su vez con lo establecido en el PMC-004, tomar una colonia aislada y sembrar por método de estrias en agar nutritivo e incubar a 37° C por 24 horas.

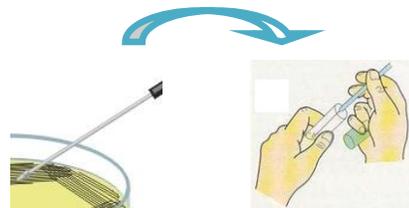
Paso 2 A partir de una colonia aislada obtenida del paso anterior, estriar sobre una placa con medio Baird Parker y otra en agar chapman.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Identificación y caracterización de <i>Staphylococcus aureus</i>	Código: PMC-005 Página 2 de 3 Versión:1.0 Fecha:

Paso 3. Comparar con características descritas en la siguiente tabla

Medio de cultivo	Morfología macroscópica	
Baird Parker	Colonias redondas, de bordes lisos, convexas, de 2-3 mm de diámetro, húmedas, brillantes, negras, con un borde blanco fino, rodeadas de una zona opaca y de un halo claro de 2-5 mm.	
Agar chapman	Colonias redondas, de bordes lisos, convexas, de 2-3 mm de diámetro, húmedas, brillantes, amarillas.	

Paso 4. De las colonias con características apropiadas en medio Baird Parker: tomar dos o mas con una asa bacteriológica y sembrarla en 0.3 mL de caldo infusión cerebro corazón. (BHI)



Paso 5. Incubar por 24 horas a 35°C

Paso 6. Agregar 0.5 mL de plasma de conejo e incubar por 4 a 6 horas, la prueba se considera positiva para ***Staphylococcus aureus*** si se forma un coagulo que se mantiene al invertir el tubo.



	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN	
	Identificación y caracterización de <i>Staphylococcus aureus</i>	Código: PMC-005 Página 3 de 3 Versión:1.0 Fecha:

Paso 7. Llenar el registro RMC-001 con los datos obtenidos.

Esquema general de procedimiento:

Tomar una placa con microorganismo de interes y recuento contable obtenido del procedimiento indicado en PMC-001 y verificando que cumpla con lo establecido en PMC-004



Tomar del agar nutritivo una colonia aislada y sembrar por método de estrias en agar Baird Parker y agar Chapman e incubar a 35°C por 24 h.



Verificar que las características macroscópicas del microorganismo se cumplan para cada medio de cultivo.



Realizar la prueba de la coagulasa



Llenar el registro RMC-001 con los datos obtenidos.

Fin del procedimiento.

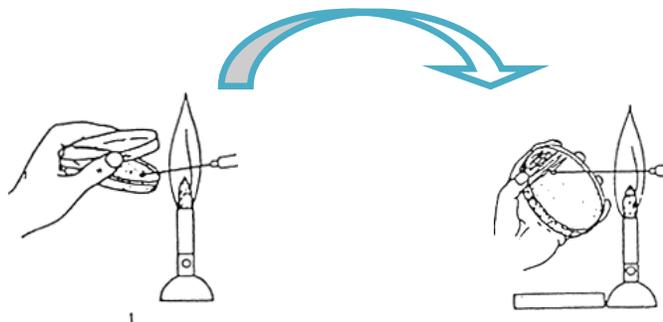


Descripción del método: La ***Pseudomona aeruginosa*** es una bacteria Gram-negativa no fermentadora, aeróbica; secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo), para su identificación se realizan las pruebas de: crecimiento característico en agar cetrimide, prueba de la oxidasa, prueba de la catalasa y reducción de nitratos/nitritos.

Materiales y equipo:	Medios y reactivos:
Asa bacteriológica Incubadora Mechero Bunsen Placas de petri	Solución salina Agar nutritivo Agar Cetrimide Caldo nitrato (compuesto por: Extracto de carne 3g, peptona de gelatina 5g, nitrato de potasio 0.1% 1g, agua desmineralizada 1000 mL) Peróxido de hidrogeno Reactivos de Kovacs

Paso 1 De la placa con ***Pseudomona aeruginosa*** obtenida del procedimiento indicado en PMC-001 tomar una colonia aislada y sembrar por el método de estrias en una placa con agar nutritivo e incubar a 37°C por 24 horas

Paso 2 Siembra en agar Cetrimide A partir de la placa obtenida en el paso anterior, tomar una colonia aislada y sembrarla mediante técnica de estrias en una placa con agar cetrimide e incubar por 24 horas a 35 °C.



Paso 3 La formación de un pigmento verde alrededor de las colonias constituye un resultado positivo para la prueba.



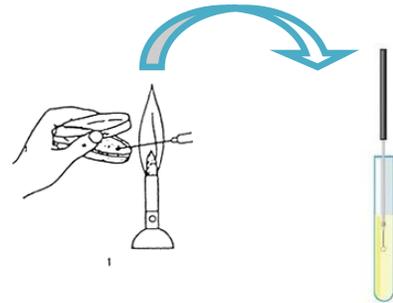
	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	
	Identificación y caracterización de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Código: PMC-006 Página 2 de 3 Versión:1.0 Fecha:

Paso 4 Prueba de la oxidasa: a un trozo de papel filtro agregar de 2 a 3 gotas de reactivo de kovacs en el centro.

A partir de las colonias características desarrolladas en agar cetrimide pasar una colonia con la ayuda de un asa de platino o un hisopo estéril y extenderlo sobre el centro del papel impregnado, una coloración de morado a azul se considera positiva para ***Pseudomona aeruginosa***.

Paso 5 Prueba de la catalasa, a partir de las colonias características desarrolladas en agar cetrimide tomar una colonia y colocarla sobre un portaobjetos y añadir a esta un par de gotas de peróxido de hidrogeno, el desarrollo de un burbujeo se considera como positivo para esta prueba.

Paso 6 Prueba de reducción de nitratos/nitritos, a partir de las colonias características desarrolladas en agar cetrimide tomar una colonia y sembrarla en un tubo conteniendo caldo nitrato e incubar por 24 h a 35°C el desarrollo de gas en la campana de Durham se considera como positivo para esta prueba.



Paso 8 Llenar el registro RMC-001 con los datos obtenidos

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	
	Procedimiento de identificación y caracterización de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Código: PMC-006 Página 3 de 3 Versión:1.0 Fecha:

Esquema general del procedimiento.

Reanimar al microorganismo como se describe en PMC-003 y verificar su pureza como indica PMC-004



Sembrar en agar cetrimide



Realizar la prueba de la oxidasa



Efectuar la prueba de la catalasa



Hacer la prueba de reducción de nitratos/nitritos.



Llenar el registro RMC-001 con los datos obtenidos.

Fin del procedimiento.

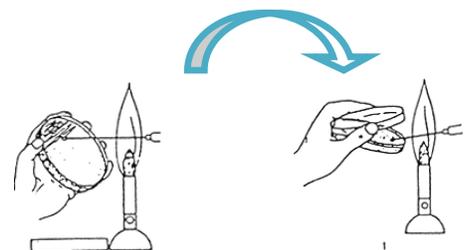
	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	
	Procedimiento de identificación y caracterización de Enterobacterias	Código: PMC-007 Página 1 de 4 Versión:1.0 Fecha:

Descripción del método: El grupo de las enterobacterias son en su mayoría bacterias gram negativas en general bacilos, anaeróbicos facultativos y fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin presencia de gas. Las cepas para las cuales se elaboro este procedimiento son **Salmonella** (siendo aplicable a todas las especies de este género) y **Escherichia coli** a los cuales se les realiza pruebas de crecimiento característico en agares selectivos y las pruebas bioquímicas brindadas por galerías RapID ONE 20E.

Materiales y equipo:	Medios y reactivos:
Asa bacteriológica Incubadora Mechero Bunsen Placas de petri	Solución salina Agar nutritivo Agar EMB Agar XLD Kit RapID ONE 20 E System de Remel

Paso 1. Tomar la placa con la enterobacteria correspondiente proveniente del procedimiento indicado en el PMC001. Tomar una colonia aislada y sembrar por el método de estrías en una placa de agar nutritivo e incubar a 37°C por 24 horas.

Paso 2. A partir de la placa preparada en el paso anterior, tomar una colonia aislada y sembrarla por técnica de estrías en una placa con agar selectivo para la bacteria de interés.

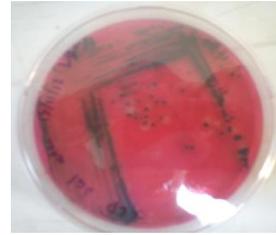


Para la *E. coli* sembrar en agar EMB, el desarrollo de un brillo verde metálico se considera como positivo para esta *Escherichia coli*.



	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	
	Identificación y caracterización de Enterobacterias	Código: PMC-007 Página 2 de 4 Versión:1.0 Fecha:

Para Salmonella sembrar en agar XLD el desarrollo de colonias húmedas, rosadas con centro negro se considera positivo para Salmonella.



Paso 3. A partir de los cultivos del paso 2 que hayan mostrado crecimiento característico tomar una colonia aislada y sembrarla en agar nutritivo por la técnica de estrías u otro medio de promoción, e incubar por 24 horas a 35° C a modo de obtener un cultivo joven y posteriormente realizarle la prueba RapidOne



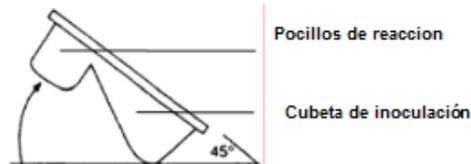
Paso 4. Ejecución de prueba RapidOne; preparación del inóculo: A partir de la placa con medio de promoción que contiene al microorganismo en estudio, tomar con una torunda de algodón o una asa de inoculación suficiente crecimiento del cultivo y suspender en el líquido de inoculación RapidID (2 mL) para conseguir una turbidez visual igual a la del estándar de turbidez N°2 de McFarland o equivalente.

Paso 5. Inoculación de los paneles Rapid One.

- Abrir la tapa del panel sobre el acceso de inoculación, tirando de la pestaña marcada hacia arriba y hacia la izquierda.
- Con una pipeta, transferir suavemente el contenido de todo el tubo de líquido de inoculación a la esquina superior derecha del panel. Volver a sellar el acceso de inoculación del panel, presionando la pestaña de apertura para que vuelva a su posición previa al proceso.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	
	Identificación y caracterización de Enterobacterias	Código: PMC-007 Página 3 de 4 Versión:1.0 Fecha:

- Después de añadir la suspensión de prueba y mientras se mantiene el panel sobre una superficie nivelada, incline el panel hacia el lado contrario a los pocillos de reacción, aproximadamente en un ángulo de 45°.



- Mientras se inclina, debe mecerse suavemente el panel de lado a lado para distribuir homogéneamente el inoculó a lo largo de las depresiones posteriores.
- Mientras se mantiene la posición horizontal nivelada (que se consigue mejor usando la parte superior de la mesa de trabajo contra el fondo de los pocillos), debe inclinarse lentamente el panel hacia delante, hacia los pocillos de reacción, hasta que el inoculó fluya a lo largo de las depresiones de los pocillos de reacción. De esta manera todo el inoculó de la parte posterior del panel será evacuado.
- Devolver el panel a su posición nivelada.
- Incubar a 35°C por 4 horas. (aunque puede aumentarse hasta 8 horas para mejores resultados).

Paso 6. Leer los resultados agregando los reactivos provistos en el kit a los pozos que lo requieran y realizar el puntaje según las tablas de interpretación incluidas en el kit.

Paso 7. Llenar el registro RMC-001 con los datos obtenidos.

Paso 8 Ingresar los resultados en la base de datos de Rapid (www.remel.com/ERIC/), imprimir los resultados y anexarlos al registro RMC-001

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA	
	Identificación y caracterización de Enterobacterias	Código: PMC-007 Página 4 de 4 Versión:1.0 Fecha:

Esquema general de procedimiento.

Reanimar al microorganismo como se describe en PMC-003 y verificar su pureza como indica PMC-004



A partir de una placa con agar de nutritivo tomar una colonia aislada y sembrarla en un medio selectivo para la enterobacteria a estudiar (EMB para E. coli y XLD para Salmonella).



Tomar una colonia aislada de uno de estos cultivos y sembrarla en agar nutritivo incubar a 35°C por 24 h.



Realizar la prueba RapidOne



Ingresar los datos de la prueba en la base de datos para obtener la identificación del microorganismo, imprimir y anexar al registro RMC-001

Fin del procedimiento.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

Registro de verificación de calidad de cepas de referencia.

Código: RMC-001
Versión:1.0
Fecha de emisión:
Fecha de última revisión:

Cepa: _____ N°ATCC _____

Fecha de inicio: _____ Fecha de finalización: _____

Fecha de conservación: _____

Método de conservación: _____

Agar BHI Otro _____.

Recuento inicial de suspensión estandarizada: _____

Cultivo de enriquecimiento: _____

Medio de cultivo	Fecha de esterilización del medio	Crecimiento satisfactorio	
		Positivo	Negativo

Resultados de prueba RAPID _____

Cumple especificaciones: Si No

Analista: _____

Observaciones: _____

Pureza de cultivo
Observación macroscópica

Medio de cultivo y fecha de esterilizado		
Descripción del crecimiento en el medio de cultivo		
Anomalías en cultivo		

Observación microscópica

Gram				
Positivo <input type="checkbox"/>	Bacilos <input type="checkbox"/>	Cadenas <input type="checkbox"/>		
Negativo <input type="checkbox"/>	Cocos <input type="checkbox"/>	Racimos <input type="checkbox"/>		
Preparación al fresco:				
Estructura microscópica característica				<input type="checkbox"/>