

1. Título práctica de laboratorio:

IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

Reconocer las características de crecimiento, requerimientos metabólicos y las particularidades de identificación de las enterobacterias.

Específicos:

- Conocer, realizar e interpretar las diferentes pruebas metabólicas de identificación para bacterias Gram negativas fermentadoras.
- Identificar las bacterias comúnmente encontradas en el tracto gastrointestinal.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Las bacterias Gram negativas se diferencian de las Gram-positivas por la composición de la pared celular. Está hecha de una capa delgada de peptidoglucano y una membrana más, de tipo externo, compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos, lo que les confiere un comportamiento diferente frente a los reactivos de la tinción de Gram. Se pueden clasificar en dos grandes grupos, no fermentadores y fermentadores o Enterobacterias (1).

La familia Enterobacteriaceae es una familia diversa, cuyos miembros se caracterizan por ser bacterias Gram negativas de forma bacilar, que tienen como hábitat natural el tracto intestinal de humanos y animales. Algunos géneros incluidos dentro de esta familia, hacen parte de la flora normal del intestino y bajo ciertas condiciones pueden llegar a causar patologías (*E. coli*), sin embargo, otros géneros son generalmente patógenos para los humanos (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.). Los miembros de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por fermentar una amplia variedad de carbohidratos, propiedad que ha sido empleada para su identificación (1)

Los bacilos Gram Negativos no fermentadores son considerados patógenos porque están involucrados frecuentemente en infecciones nosocomiales y poseen multirresistencia. Dentro de los géneros de

importancia clínica se encuentran: *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Burkholderia* spp., *Moraxella* spp., *Stenotrophomonas* spp. Estas bacterias no utilizan los hidratos de carbono como fuente de energía, o pueden degradarlos por vías metabólicas diferentes a la de la fermentación.

La mayoría de enfermedades gastrointestinales resultan de la ingestión de agua o alimentos contaminados con microorganismos patógenos. La bacteria es aislada mediante la utilización de medios diferenciales, como por ejemplo el agar Mc Conkey, la identificación se lleva a cabo mediante un conjunto de pruebas bioquímicas las cuales permiten la identificación del género y la especie bacteriana, dentro de las pruebas bioquímicas principalmente empleadas se encuentran: Fermentación de lactosa, movilidad, producción de ureasa, utilización de citrato, producción de H₂S, producción de Indol, descarboxilación de lisina y ornitina, prueba del rojo de metilo, producción de DNAasa, prueba de Voges-Proskauer, fermentación de azúcares (2).

4. CONSULTA PREVIA

Describa el fundamento de las siguientes pruebas metabólicas:

- Agar Triple Azucar Hierro (TSI)
- Agar Sulfuro Indol Motilidad (SIM)
- Caldo Rojo de Metilo- Vogues Proskauer (MR-VP)
- Agar Lisina Hierro Agar (LIA)
- Agar Citrato de Simmons

Describa el fundamento de las siguientes pruebas metabólicas agares diferenciales:

- Agar Mc Conkey
- Agar Salmonella shiguella
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)
- Agar cetrimide

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos (Grupo 3 o 4 de estudiantes)	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • 1 Caja <i>Klebsiella</i> spp. • 1 Caja <i>Proteus</i> spp. • 1 Caja <i>Pseudomonas</i> spp. • 1 Caja <i>Escherichia coli</i> • 1 Caja <i>Salmonella</i> spp. • 5 Tiras de oxidasa • 1 Cajas Agar Mac Conkey • 1 Cajas Agar Salmonella Shiguella • 1 Cajas Agar EMB • 1 Caja Agar Cetrimide • 2 Tubos Agar SIM 	<ul style="list-style-type: none"> • Frasco gotero con 20ml de Peróxido de hidrógeno 3% • Frasco gotero con 20ml reactivo de Kovac's • Frasco gotero con 20ml reactivo para revelar Voges proskauer: VP1 (KOH) y VP2 (ALFA NAFTAOL). • Frasco gotero con 20ml de rojo de metilo

- 2 Tubos Agar TSI
- 2 Tubos Agar LIA
- 2 Tubos MR
- 2 Tubos VP
- 2 Tubos Agar citrato de simmons
- 1 c/u Asas de siembra curva y recta
- 1Unid Gradilla

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad
- Toallas desechables
- 1 Encendedor
- 1 Lápiz de cera o marcador indeleble Frasco de tinta china negra
- Lápices de colores

6. PROCEDIMIENTO

El laboratorio se dividirá en dos sesiones: Montaje y Lectura.

Se trabajará con cinco cepas: *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

MONTAJE:

1. SIEMBRAS EN AGAR (Mc Conkey, Salmonella/Shiguella, EMB, Cetrimide):

Identifique las placas correctamente. Siembre las cepas destinadas a estudio por estría gruesa usando asa redonda. Incube a 37°C en aerobiosis por 24 horas.

2. SIM (Sulfuro Indol Motilidad):

A partir de un cultivo puro, siembra en agar SIM por punción profunda con asa de inoculación recta (no usar asa con anillo), inoculando en el centro del tubo, hasta unos 2/3 de profundidad. Es importante que la siembra se realice en línea recta. Incubar durante 24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis. Luego de la incubación, agregar 3-5 gotas de reactivo de Kovac´s o de Erlich.

3. TSI (Triple Azúcar Hierro):

A partir de un cultivo puro, siembre en TSI, por punción hasta unos 2/3 de profundidad y luego estría en la superficie. Incube a 35-37°C durante 24 horas, en aerobiosis.

4. LIA (Lisina Hierro Agar):

A partir de un cultivo puro, siembre en LIA, por punción hasta unos 2/3 de profundidad y luego estría en la superficie. Incube a 35-37°C durante 24 horas, en aerobiosis.

5. CITRATO DE SIMMONS:

Usando un asa redonda siembre sobre la superficie del medio citrato en forma zigzag, un inóculo ligero, sin arrastrar el agar. Incube a 35-37 °C, durante 24-48 horas, en aerobiosis.

6. CALDO MR (Rojo de metilo):

Ponga en el caldo una buena cantidad de bacteria con un asa redonda. Incube a 35-37 °C, durante 24-48 horas, en aerobiosis.

7. CALDO VP (Vogues proskauer):

Ponga en el caldo una buena cantidad de bacteria con un asa redonda. Incube a 35-37 °C, durante 24-48 horas, en aerobiosis.

8. OXIDASA

El procedimiento consiste en impregnar la zona coloreada de la tira reactiva que contiene el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, con una masa de bacterias. Visualice la reacción dentro del próximo minuto y compare con el tubo indicador la reacción positiva.

9. CATALASA

Su determinación se hace por dos métodos:

- EN PLACA: Utilizar una placa con el microorganismo crecido y en una zona donde haya bastante crecimiento añadir unas gotas de agua oxigenada y observar si en el transcurso de unos segundos se produce o no la aparición de burbujas.
- EN LÁMINA: Tomar una pequeña cantidad de bacterias del cultivo primario, llevarlas a una lámina portaobjetos que contiene una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, se realiza una emulsión bacteriana y observar si en el transcurso de unos segundos se produce o no la aparición de burbujas.

Disposición de desechos: Al final de la lectura de resultados, disponga los residuos en la bandeja de material contaminado.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 26 ED. New York. McGraw-Hill. 2013
2. Cappuccino J and Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. 6 ED. San Francisco. Benjamin Cummings. 2001

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

TABLA DE RESULTADOS (1.5/5.0)

Con los resultados obtenidos y observaciones durante el desarrollo de la práctica, complete las siguientes tablas de resultados.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS (2.0/5.0)

Realice un análisis, correlacionando los resultados obtenidos y los conceptos teóricos que soportan la práctica. La discusión de resultados tiene un componente altamente teórico y es necesario que la información que soporte esta sección sea citada y verificada en función de utilizar las referencias pertinentes para el caso.

CONCLUSIONES (1.0/5.0)

Presente la conclusión en forma de un único párrafo en el que se incluya los hallazgos de la práctica con su respectiva justificación teórica, y las habilidades personales adquiridas durante el desarrollo del laboratorio como aporte al ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA (0.5/5.0)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver

Tabla 1. Tabla de resultados pruebas metabólicas

N° de cepa	Oxidasa	Catalasa	Citrato de Simmons	Agar SIM (Sulfuro Indol-Motilidad)	TSI Pico/Fondo* (Triple azúcar Hierro)	LIA (Lisina-Hierro Agar)	Caldo RM	Caldo VP

Indique en cada prueba según corresponda la correcta lectura.

Tabla 2. Tabla de resultados medios de cultivo diferenciales

MEDIO DE CULTIVO	N° DE CEPA/NOMBRE		
Agar Mc. Conckey			
Agar EMB			
Agar Salmonella/Shigella			
Agar cetrimide			

Indique para cada agar las reacciones según corresponda a cada medio de cultivo: Fermentación de azúcares, producción de H₂S y/o presencia de fluorescencia.

Tabla 3. Tabla de consolidación de resultados. Indique Positivo o negativo, de acuerdo a lo recopilado en pruebas bioquímicas y medios de cultivo

PRUEBA METABÓLICA	N° DE CEPA/NOMBRE		
1. Presencia de Catalasa			
2. Presencia de Citocromo Oxidasa			
3. Fermentación de Glucosa			
4. Fermentación de Sacarosa			
5. Fermentación de Lactosa			
6. Uso de citrato como única fuente de carbono			
7. Presencia de triptofanasas			
8. Presencia de movilidad			
9. Producción de ácido sulfhídrico			
10. Producción de Gas			
11. Producción de ácido por la vía ácido mixta			
12. Producción de ácido por la vía butanodiólica			
13. Presencia de pigmentos fluorescentes			

Tabla 4. Posible Microorganismo identificado

N° CEPA	POSIBLE MICROORGANISMO IDENTIFICADO	PORCENTAJE DE SIMILITUD*

* N° pruebas positivas que coinciden para el microorganismo/ N° de pruebas realizadas (Ver tabla N°3) *
100.