



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DETERMINADA IV SEMESTRE

Lucy Margarita Villafañe Ferrer QF MSc.

Facultad de Ciencias de la Salud Programa
de Bacteriología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología

Rosana de la Torre Barboza

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Elayne Flórez Julio

Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo

Zarina Durango Herazo

Raúl Padrón Villafañe

Autor

Lucy Villafañe Ferrer



TABLA DE CONTENIDO

	Págs.
PRESENTACIÓN	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	5
PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE	7
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES	9
PRÁCTICA No. 1. IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM-POSITIVOS. <i>Género Staphylococcus.</i>	10
PRÁCTICA No. 2. IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM-POSITIVOS. <i>Géneros Streptococcus y Enterococcus.</i>	15
PRÁCTICA No. 3. ENTEROBACTERIAS. <i>E. coli</i> y género <i>Klebsiella</i> .	21
PRÁCTICA No. 4. ENTEROBACTERIAS. Géneros <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .	25
PRÁCTICA No. 5. ENTEROBACTERIAS. Géneros <i>Proteus</i> y <i>Providencia</i> .	29
PRÁCTICA No. 6. COCOS GRAM-NEGATIVOS. Géneros <i>Neisseria</i> y <i>Moraxella</i> .	33
PRÁCTICA No. 7. BACILOS GRAM-NEGATIVOS NO FERMENTADORES. Género <i>Pseudomonas spp.</i>	37
PRÁCTICA No. 8. FAMILIA VIBRIONACEAE. Género <i>Vibrio</i> .	41
BIBLIOGRAFÍA	45



PRESENTACIÓN

Un saludo de bienvenida para los estudiantes de la asignatura Microbiología Determinada.

La presente guía tiene por objetivo mostrar los recursos y técnicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Se hace énfasis en los procedimientos relacionados con aislamiento, cultivo e identificación bioquímica.

La metodología utilizada para cada una de las prácticas es clara y sencilla lo que facilita la comprensión del estudiante.

Es el deseo del autor que los estudiantes consideren a esta guía como un aporte a su formación como bacteriólogos, y que encuentren en ésta respuestas a sus inquietudes iniciales en el estudio de la Microbiología.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

- Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.
- Siempre respetar las señalizaciones de bioseguridad.
- Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el laboratorio.
- Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos cortopunzantes como agujas, lancetas y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
- Utilice siempre dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos, nunca bucal.
- Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso, conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- En caso de derrames, neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
- Nunca debe esterilizar material limpio con contaminado.



- Nunca debe utilizar reactivos y/o sustancias químicas vencidas.
- Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente. Si un equipo se contamina con una muestra biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- En caso de rompimiento de un tubo o derrame en la centrifuga, apáguela inmediatamente y espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.
- Al inicio y al final de una práctica de laboratorio o después de salpicaduras con sangre u otros líquidos corporales, las superficies de las mesas deberán ser descontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.
- Toda muestra biológica diferente a orina deberá ser descontaminada con peróxido de hidrógeno al 30% para luego ser eliminada en bolsas rojas.
- Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.



PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se va a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarios para la ejecución de la misma.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también por sus propias observaciones, investigación y deducciones.
3. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
4. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
5. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas, tubos, cajas de y/o cultivos.
6. Tome todas las precauciones necesarias (evite contacto con ojos, boca y el resto del cuerpo) al momento de trabajar con microorganismos. Recuerde que los microorganismos con los que va a trabajar son patógenos.
7. Practique varias veces el procedimiento y en caso de dudas pregunte a su docente.
8. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
9. Al terminar, limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los medios usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.



11. Limpie el microscopio antes y después de la práctica. Recuerde que este equipo es fundamental para su trabajo. ¡¡¡¡¡Cuídelo!!!!
12. Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

1. Láminas (portaobjetos).
2. Laminillas (cubreobjetos).
3. Lápiz de Cera o marcador cristalográfico.
4. Cinta de enmascarar.
5. Colores.
6. Palillos.
7. Guantes desechables.
8. Mascarilla o tapabocas.
9. Gafas de protección.
11. Toalla pequeña
12. Papel de arroz.
13. Asa bacteriológica.
14. Muestra solicitada.
15. Guías de laboratorio previamente estudiadas.



PRÁCTICA No. 1. IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM-POSITIVOS. Género *Staphylococcus.*

I. INTRODUCCIÓN

Las especies del género de estafilococos son de los principales microorganismos productores de infecciones en humanos. Para la identificación bioquímica de estas bacterias se deben estudiar la morfología microscópica y macroscópica, y los requerimientos nutricionales que permiten la diferenciación de especies patógenas. En el presente laboratorio el estudiante aprenderá las pruebas bioquímicas para identificación de estos cocos Gram-positivos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Proporcionar al estudiante el conocimiento de las técnicas para la identificación de las principales especies de cocos Gram-positivos que afectan al hombre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Conocer la morfología microscópica y macroscópica de los estafilococos.
- 2- Diferenciar los dos tipos de estafilococos que existen teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En el género *Staphylococcus* se incluyen bacterias Gram-positivas que tienen importancia por la capacidad que tienen de causar infecciones en el ser humano y en los animales. *S. aureus* es reconocido como un patógeno importante. De este género también hacen parte los *Staphylococcus coagulasa-negativa* que producen numerosas infecciones en seres humanos, así como también en animales.

Los *Staphylococcus* son cocos Gram-positivos, sin embargo en cultivos viejos se observan Gram-negativos. El diámetro de una célula individual es de 0.7 a 1.2 μm . La clásica morfología de racimos de uva es más evidente en cultivos sobre medios



sólidos. Esta morfología se debe a que los *Staphylococcus* se dividen en tres planos perpendiculares sucesivos y a que las células hijas no se separan completamente. *Staphylococcus* crece bien en medios de cultivo como agar sangre, agar nutritivo y agar tripticosa soya. Las colonias individuales de *Staphylococcus* crecidas sobre agar nutritivo son opacas, con bordes definidos, circulares, convexas y de 1 a 4 mm de diámetro. El clásico color amarillo oro de las colonias de *S. aureus* es debido a la presencia de carotenoides (*aureus* en latín significa oro). La pigmentación es usualmente aparente luego de 18-24 horas de incubación a 37°C, pero es más pronunciada cuando los cultivos son mantenidos a temperatura ambiente por 24-48 horas adicionales. Los *Staphylococcus* son anaerobios facultativos y usualmente son productores de catalasa. Excepto por *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus*, el crecimiento de los *Staphylococcus* es rápido y abundante bajo condiciones aeróbicas. Estos dos miembros del género *Staphylococcus* no son productores de catalasa y crecen mejor en condiciones anaerobias.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Ácido Clorhídrico 1 N.

Cajas con agar sangre.

Cajas con agar Manitol Sal.

Cajas con agar DNAsa.

Tubos con plasma.

Sensidiscos de Novobiocina.

Tirillas de oxidasa.

Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.



Tapabocas.

V. MUESTRA

Cepas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus coagulasa negativa.

VI. PROCEDIMIENTO

Primer Día:

- 1- Tomar la bacteria e inocularla, mediante siembra por agotamiento, en cajas de agar sangre y agar Manitol Sal. Incubar a 37°C por 24 horas.
- 2- Para el caso del Agar DNAsa, con el inóculo realice una sola línea de siembra de un extremo a otro de la caja.
- 3- Para la diferenciación de estafilococos coagulasa negativa realizar la prueba de Novobiocina. Se siembra una placa de agar sangre con un hisopo embebido en una suspensión de la cepa a estudiar. Luego se aplica el disco de Novobiocina y se incuba a 35° por 18 horas.
- 4- Para la identificación de *Staphylococcus aureus*, se realiza la prueba de la coagulasa en placa o en tubo. La prueba en tubo es considerada la prueba confirmatoria. La prueba en placa es solo una prueba presuntiva.
 - a. **Prueba en tubo:** inocular una colonia de *S. aureus* a un tubo con 0,5 mL de plasma, suspenderla e incubar por 4 a 6 horas en un baño serológico a 37°C. Un resultado positivo se indica con la formación de un coágulo.
 - b. **Prueba en placa:** suspenda una colonia de Estafilococos, tomada del agar sangre, agregue una gota de plasma y mezcle, a los diez segundos se observa la formación de grumos.

Segundo día

- 1- Retirar de la incubadora las cajas sembradas el día anterior, observar el crecimiento de las diferentes cepas de *Staphylococcus* en los respectivos medios de cultivo. Describir la morfología de las colonias y el tipo de hemólisis en agar sangre.



- 2- Realizar tinción de Gram para evidenciar morfología microscópica.
- 3- Medir el halo de inhibición de la Novobiocina en agar sangre. Un halo de inhibición de crecimiento menor o igual a 16mm corresponde a *S. saprophyticus*. Un halo de inhibición mayor de 16mm corresponde a otros estafilococos coagulasa negativos.
- 4- Para el agar DNAsa, adicionar sobre la línea de crecimiento HCl 0,1 N se deja actuar por unos minutos. El DNA se precipita y produce un color lechoso. La formación de un halo transparente alrededor de la colonia indica producción de DNAsa. Para el caso del medio que contiene azul de toluidina o verde de metilo, la presencia de un halo de color rosado alrededor de la colonia indica producción de DNAsa.
- 5- Para realizar la prueba de la Oxidasa, utilizar el reactivo de Oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.
- 6- Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Complete la siguiente tabla:

Reacciones	<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa
Morfología microscópica y tinción de Gram		



Fermentación del Manitol		
Hemólisis		
Actividad de Coagulasa		
Actividad de Catalasa		
Actividad de DNAsa		
Actividad de Oxidasa		
Diámetro de zona de inhibición de la Novobiocina		

2. ¿Qué detectan las pruebas de coagulasa en tubo y en placa?
3. ¿Qué tipo de plasma se recomienda utilizar para la prueba de coagulasa en tubo? ¿Por qué no se recomienda utilizar el plasma humano?
4. ¿Cuál es la reacción química que se da cuando se realiza la prueba de la catalasa?



PRÁCTICA No. 2. IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM-POSITIVOS. Géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*.

I. INTRODUCCIÓN

Las especies del género de estreptococos son importantes patógenos en humanos. Para la identificación bioquímica de estas bacterias se deben estudiar la morfología microscópica y macroscópica, y los requerimientos nutricionales que permiten la diferenciación de especies patógenas.

En el presente laboratorio, el estudiante aprenderá las pruebas bioquímicas para identificación de estos cocos Gram-positivos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Proporcionar al estudiante el conocimiento de las técnicas para la identificación de las principales especies de cocos Gram-positivos que afectan al hombre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Conocer la morfología microscópica y macroscópica de los estreptococos.
- 2- Diferenciar los grupos de estreptococos que existen teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas y fisiológicas.
- 3- Identificar las bacterias del género *Streptococcus* teniendo en cuenta la morfología macroscópica y microscópica de las colonias y sus pruebas bioquímicas fundamentales.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Las bacterias del género *Streptococcus* tienen un metabolismo anaeróbico facultativo, los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* son importantes patógenos para el ser humano y animales. Otros géneros muestran un metabolismo anaeróbico



estricto, de estos sólo *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* producen infecciones en el ser humano. Algunas especies del género hacen parte de la microbiota normal de los tractos respiratorio y genital, piel y mucosas.

Las especies del género son cocos Gram-positivos que miden menos de 2 µm de diámetro, frecuentemente forman pares o cadenas, son inmóviles y no forman esporas, son catalasa negativas. Las especies del género *Streptococcus* son bacterias relativamente fastidiosas con requerimientos nutricionales que varían según la especie. La mayoría de las especies crecen adecuadamente en medios nutritivos enriquecidos con sangre o suero. Algunas cepas requieren de atmósferas elevadas en CO₂ (5-10%), lo cual incrementa el crecimiento y la actividad hemolítica. Las colonias aisladas miden de 0.3 a 2 mm de diámetro, son opacas, blanquecinas, circulares, de bordes definidos y presentan hemólisis variable.

En cuanto a las bacterias que pertenecen al género *Enterococcus*, son muy resistentes, pueden sobrevivir en ambientes muy adversos, lo que les permite encontrarse casi en cualquier parte de la naturaleza, como en suelo, agua, alimentos, animales, aves e insectos. Diferentes especies de *Enterococcus* pueden encontrarse formando parte de la flora normal del tracto gastrointestinal y tracto genitourinario del ser humano y muchos animales.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Cajas con agar sangre.

Tubos con medio Bilis Esculin.

Tubos con caldo Trypticase soya cob NaCl al 6,5%.

Sensidiscos de Bacitracina.

Sensidiscos de Trimetoprim Sulfametoxazol.

Sensidiscos de Optoquina.

Tirillas de oxidasa.



Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.

Tapabocas.

V. MUESTRA

Cepas de *Streptococcus del grupo A y B*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae*.

VI. PROCEDIMIENTO

Primer día

- 1- Tomar los cultivos de la bacteria en agar sangre e inocularla en agar sangre mediante siembra por agotamiento para evaluar el tipo de hemólisis. También se pueden hacer hendiduras en el agar. Incubar a 37°C en atmosfera con 10% de CO₂, por 24 horas.
- 2- Realizar la prueba de CAMP: para esto, inocular una placa de agar sangre mediante una estría con una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de la toxina β (esfingomielinasa). De forma perpendicular, inocular la cepa de *Streptococcus* a evaluar sin tocar la estría de *S. aureus*. Posteriormente, las placas deben ser incubadas a 37°C por 24 horas.
- 3- Realizar la prueba de sensibilidad a Bacitracina: inocular densamente una caja de agar sangre y colocar un sensidisco que contiene bacitracina sobre el inculo. Incubar a 37°C por 24 horas.
- 4- Realizar la prueba de sensibilidad a la Optoquina y Trimetoprim Sulfametoxazol: Inocular densamente una caja de agar sangre y colocar sensidiscos con Optoquina y Trimetoprim Sulfametoxazol sobre el inculo. Incubar a 37°C por 24 horas en atmosfera con 7% de CO₂.
- 5- Inocular tubos con medio Bilis Esculina por estría e incubar a 37°C por 24 horas.



- 6- Inocular un tubo conteniendo caldo tripticasa soya con 6.5% de NaCl e incubar a 37°C por 18-24 horas.

Segundo día

- 1- Retirar de la incubadora las cajas inoculadas, observar el crecimiento de las diferentes cepas de *Streptococcus* en agar sangre, describir morfología macroscópica y el tipo de hemólisis. Realizar tinción de Gram para evidenciar morfología microscópica.
- 2- Realizar la prueba de oxidasa: Utilizar el reactivo de Oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.
- 3- Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.
- 4- Examinar las cajas para sensibilidad a Bacitracina, una zona de inhibición de cualquier tamaño indica la presencia de *Streptococcus* grupo A.
- 5- Para el caso del sensidisco de Optoquina, medir el halo de inhibición un halo mayor o igual a 14 mm alrededor del disco de 6 mm, indica sensibilidad a la optoquina e identifica al microorganismo como un pneumococo.
- 6- Observar la prueba de CAMP: la presencia de hemólisis con forma de cabeza de punta de flecha en la zona en la que se encuentran próximas las dos estrías de crecimiento bacteriano, indica una reacción positiva (figura 2).
- 7- Observar el crecimiento en el medio Bilis Esculina, el ennegrecimiento difuso en más de la mitad del pico de flauta dentro del tubo se considera positivo.
- 8- Observar los tubos con medio Tripticasa soya con NaCl al 6,5%, la presencia de crecimiento en el medio indica tolerancia a NaCl.



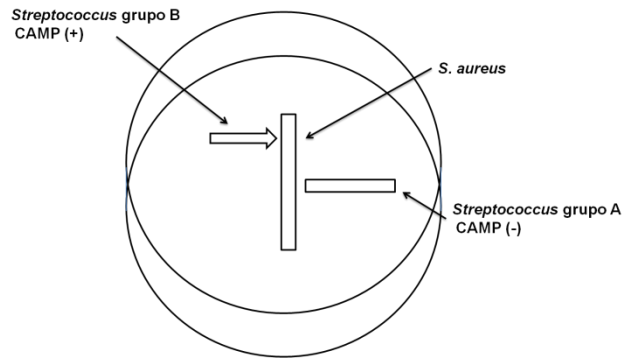
VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Completar el siguiente cuadro:

	Tipo de Hemólisis	Catalasa	Oxidasa	Bacitracina	TMX	Prueba de CAMP	Optoquina	Bilis Esculina	Crecimiento en NaCl 6,5%
<i>Streptococcus pyogenes</i>									
<i>Streptococcus agalactiae</i>									
<i>Enterococcus faecalis</i>									
<i>Streptococcus pneumoniae</i>									

2. Enuncie cuántas clases de hemólisis hay, cual es el fundamento de cada una y cómo se observan en agar sangre.
3. Explique en qué consiste la prueba de aglutinación por latex utilizada para identificar los Estreptococos.

Figura 1. Prueba de CAMP





PRÁCTICA No. 3. ENTEROBACTERIAS. *E. coli* y Género *Klebsiella*.

I. INTRODUCCIÓN

Los bacilos Gram-negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* son los aislamientos bacterianos hallados con más frecuencia en nuestras clínicas en el laboratorio de microbiología.

En el presente laboratorio el estudiante aprenderá las técnicas más importantes para la identificación de esta familia.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* teniendo en cuenta la morfología macroscópica y microscópica de las colonias y sus pruebas bioquímicas fundamentales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Conocer la morfología microscópica y macroscópica de las enterobacterias.
- 2- Diferenciar las especies de la familia que existen teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Los bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, están distribuidos en la naturaleza de forma amplia, se encuentran en el suelo y el agua, sobre las plantas y dentro del tracto intestinal de animales y el hombre.

Las especies de esta familia se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos que no forman esporas, móviles por flagelos peritricos o no móviles, crecen aeróbica o anaeróbicamente, la glucosa es metabolizada de forma fermentativa, producen la enzima catalasa, no tienen actividad de citocromo C oxidasa y reducen los nitratos a nitritos. De modo típico, estos microorganismos producen en agar sangre colonias



relativamente grandes, de color gris opaco, secas. La hemólisis en agar sangre es variable y no es característica de ningún género o grupo en particular. La apariencia mucoide de las colonias sugieren la presencia de una cápsula de polisacáridos extracelulares como en el caso de *Klebsiella pneumoniae*.

Escherichia coli está asociada a un amplio número de cuadros clínicos tales como meningitis, septicemias, infecciones de tracto urinario e intestinal, entre otros. Por otra parte las especies del género *Klebsiella* están asociadas principalmente con cuadros respiratorios.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Cajas con agar sangre.

Cajas con agar Mac Conkey.

Cajas con agar EMB.

Cajas con agar Endo.

Tubos con medio TSI.

Tubos con medio Citrato.

Tubos con medio LIA.

Tubos con medio Ureasa.

Tubos con medio SIM.

Tubos con medio MRVP.

Tirillas de oxidasa.

Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.

Tapabocas.



V. MUESTRA

Cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*

VI. PROCEDIMIENTO

Primer día.

- 1- Tomar las bacterias suministradas e inocular mediante una siembra por agotamiento cajas con agar Mac Conkey, agar EMB, agar Endo. Incubar a 37°C por 24 horas.
- 2- Inocular las cajas con agar sangre mediante una siembra por agotamiento e incubar a 37°C por 24 horas en una atmosfera con 10% de CO₂.
- 3- Inocular las siguientes pruebas bioquímicas: medio TSI, medio Citrato, medio LIA, medio Ureasa, medio SIM y medio MRVP. Incubar a 37°C por 24 horas.

Segundo día.

- 1- Retirar de la incubadora las cajas inoculadas, observar el crecimiento y describir morfología macroscópica. Realizar tinción de Gram para evidenciar morfología microscópica. Para el caso de agar sangre, describir además el tipo de hemólisis.
- 2- Realizar la prueba de oxidasa: Utilizar el reactivo de Oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul- violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.
- 3- Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.



- 4- Interpretar los resultados de las pruebas bioquímicas: TSI, Citrato, LIA y Ureasa. Observar la presencia de Sulfuro y movilidad en el medio SIM, para el caso de la prueba de Indol, adicionar al medio SIM el reactivo de Kovacs y observar la presencia de un anillo sobre la superficie del medio si este es de color rojo cereza indica un resultado positivo. Posteriormente, adicionar el reactivo rojo de metilo al medio MRVP la presencia de un color rojo indica una reacción positiva y la presencia de un color amarillo indica una reacción negativa.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Completar el siguiente cuadro:

	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
Morfología microscópica y tinción de Gram		
Actividad oxidasa		
Actividad catalasa		
Agar EMB		
Agar Mac Conkey		
Agar Endo		
Agar sangre		
Medio TSI		
Medio Citrato		
Medio LIA		
Medio Ureasa		
Medio SIM		
Medio MRVP		

2. Investigar el fundamento de cada uno de los medios de cultivo utilizado.
3. Realiza una síntesis de lo aprendido para establecer cómo se diferencian las bacterias utilizadas en la práctica.



PRÁCTICA No. 4. ENTEROBACTERIAS. Géneros *Salmonella* y *Shigella*.

I. INTRODUCCIÓN

Los bacilos Gram-negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* son los aislamientos bacterianos hallados con más frecuencia en nuestras clínicas en el laboratorio de microbiología.

En el presente laboratorio, el estudiante aprenderá las técnicas más importantes para la identificación de esta familia.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* teniendo en cuenta la morfología macroscópica y microscópica de las colonias y sus pruebas bioquímicas fundamentales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Conocer la morfología microscópica y macroscópica de las enterobacterias.
- 2- Diferenciar las especies de la familia que existen teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Los bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, están distribuidos en la naturaleza de forma amplia, se encuentran en el suelo y el agua, sobre las plantas y dentro del tracto intestinal de animales y el hombre.

Las especies de esta familia se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos que no forman esporas, móviles por flagelos peritricos o no móviles, crecen aeróbica o anaeróbicamente, la glucosa es metabolizada de forma fermentativa, producen la enzima catalasa, no tienen actividad de citocromo C oxidasa y reducen los nitratos a nitritos. De modo típico, estos microorganismos producen, en agar sangre,



colonias relativamente grandes, de color gris opaco, secas. La hemólisis en agar sangre es variable y no es característica de ningún género o grupo en particular.

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentran los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Se trata de bacterias patógenas, responsables de infecciones intestinales como la disentería bacilar, la fiebre tifoidea o la intoxicación alimentaria bacteriana.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Cajas con agar sangre.

Cajas con agar Mac Conkey.

Cajas con agar SS (Salmonella- Shigella).

Cajas con agar XLD.

Tubos con medio TSI.

Tubos con medio Citrato.

Tubos con medio LIA.

Tubos con medio Ureasa.

Tubos con medio SIM.

Tubos con medio MRVP.

Tirillas de oxidasa.

Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.

Tapabocas.

V. MUESTRA

Cepas de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*



VI. PROCEDIMIENTO

Primer día.

- 1- Tomar las bacterias suministradas e inocular, mediante una siembra por agotamiento, cajas con agar Mac Conkey, agar SS y agar XLD. Incubar a 37°C por 24 horas.
- 2- Inocular las cajas con agar sangre mediante una siembra por agotamiento e incubar a 37°C por 24 horas en una atmosfera con 10% de CO₂.
- 3- Inocular las siguientes pruebas bioquímicas: medio TSI, medio Citrato, medio LIA, medio Ureasa, medio SIM y medio MRVP. Incubar a 37°C por 24 horas.

Segundo día.

- 1- Retirar de la incubadora las cajas inoculadas, observar el crecimiento y describir morfología macroscópica. Realizar tinción de Gram para evidenciar morfología microscópica. Para el caso de agar sangre, describir además el tipo de hemólisis.
- 2- Realizar la prueba de oxidasa: utilizar el reactivo de oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.
- 3- Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.
- 4- Interpretar los resultados de las pruebas bioquímicas: TSI, Citrato, LIA y Ureasa. Observar la presencia de sulfuro y movilidad en el medio SIM, para el caso de la prueba de indol, adicionar al medio SIM el reactivo de Kovacs y



observar la presencia de un anillo sobre la superficie del medio si este es de color rojo cereza indica un resultado positivo. Posteriormente, adicionar el reactivo rojo de metilo al medio MRVP la presencia de un color rojo indica una reacción positiva y la presencia de un color amarillo indica una reacción negativa.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Completar el siguiente cuadro:

	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella spp.</i>
Morfología microscópica y tinción de Gram		
Actividad catalasa		
Actividad oxidasa		
Agar Mac Conkey		
Agar SS		
Agar XLD		
Agar sangre		
Medio TSI		
Medio Citrato		
Medio LIA		
Medio Ureasa		
Medio SIM		
Medio MRVP		

2. Investigar el fundamento de cada uno de los medios de cultivo utilizado.
3. Realiza una síntesis de lo aprendido para establecer cómo se diferencian las bacterias utilizadas en la práctica.



PRÁCTICA No. 5. ENTEROBACTERIAS. Géneros *Proteus* y *Providencia*.

I. INTRODUCCIÓN

Los bacilos Gram-negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* son los aislamientos bacterianos hallados con más frecuencia en nuestras clínicas en el laboratorio de microbiología.

En el presente laboratorio el estudiante aprenderá las técnicas más importantes para la identificación de esta familia.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* teniendo en cuenta la morfología macroscópica y microscópica de las colonias y sus pruebas bioquímicas fundamentales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Conocer la morfología microscópica y macroscópica de las enterobacterias.
- 2- Diferenciar las especies de la familia que existen teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Los bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, están distribuidos en la naturaleza de forma amplia, se encuentran en el suelo y el agua, sobre las plantas y dentro del tracto intestinal de animales y el hombre.

Las especies de esta familia se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos que no forman esporas, móviles por flagelos peritricos o no móviles, crecen aeróbica o anaeróbicamente, la glucosa es metabolizada de forma fermentativa, producen la enzima catalasa, no tienen actividad de citocromo C oxidasa y reducen los nitratos



a nitritos. De modo típico, estos microorganismos producen en agar sangre colonias relativamente grandes, de color gris opaco, secas. La hemólisis en agar sangre es variable y no es característica de ningún género o grupo en particular.

Las especies del género *Proteus* se caracterizan por ser muy móviles, debido a esto las colonias aparecen como una película delgada o como ondas (swarming), otra característica importante de estas especies es ser ureasa positivas; fuera del tubo digestivo producen infecciones en vías urinarias, en heridas y en otros tejidos. En cuanto al género *Providencia*, sus características son muy similares al género *Proteus*. Puede estar asociado a infecciones urinarias, sin embargo son infrecuentes o esporádicos.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Cajas con agar sangre.

Cajas con agar Mac Conkey.

Cajas con agar EMB.

Cajas con agar Endo.

Tubos con medio TSI.

Tubos con medio Citrato.

Tubos con medio LIA.

Tubos con medio Ureasa.

Tubos con medio SIM.

Tubos con medio MRVP.

Tirillas de oxidasa.

Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.



Tapabocas.

V. MUESTRA

Cepas de *Proteus spp.* y *Providencia spp.*

VI. PROCEDIMIENTO

Primer día.

- 1- Tomar las bacterias suministradas e inocular, mediante una siembra por agotamiento, cajas con agar Mac Conkey, agar EMB, agar Endo. Incubar a 37°C por 24 horas.
- 2- Inocular las cajas con agar sangre, mediante una siembra por agotamiento, e incubar a 37°C por 24 horas en una atmosfera con 10% de CO₂.
- 3- Inocular las siguientes pruebas bioquímicas: medio TSI, medio Citrato, medio LIA, medio Ureasa, medio SIM y medio MRVP. Incubar a 37°C por 24 horas.

Segundo día.

- 1- Retirar de la incubadora las cajas inoculadas, observar el crecimiento y describir morfología macroscópica. Realizar tinción de Gram para evidenciar morfología microscópica. Para el caso de agar sangre, describir, además, el tipo de hemólisis.
- 2- Realizar la prueba de oxidasa: Utilizar el reactivo de oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.
- 3- Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.



- 4- Interpretar los resultados de las pruebas bioquímicas: TSI, Citrato, LIA y Ureasa. Observar la presencia de sulfuro y movilidad en el medio SIM, para el caso de la prueba de indol, adicionar al medio SIM el reactivo de Kovacs y observar la presencia de un anillo sobre la superficie del medio si este es de color rojo cereza indica un resultado positivo. Posteriormente, adicionar el reactivo rojo de metilo al medio MRVP. La presencia de un color rojo indica una reacción positiva y la presencia de un color amarillo indica una reacción negativa.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Completar el siguiente cuadro:

	<i>Proteus spp.</i>	<i>Providencia spp.</i>
Morfología microscópica y tinción de Gram		
Actividad catalasa		
Actividad oxidasa		
Agar EMB		
Agar Mac Conkey		
Agar Endo		
Agar sangre		
Medio TSI		
Medio Citrato		
Medio LIA		
Medio Ureasa		
Medio SIM		
Medio MRVP		

2. Investigar el fundamento de cada uno de los medios de cultivo utilizado.
3. En qué consiste el fenómeno observado en agar sangre cuando se siembran bacterias del género *Proteus*.



4. Realiza una síntesis de lo aprendido para establecer cómo se diferencian las bacterias utilizadas en la práctica.

PRÁCTICA No. 6. COCOS GRAM-NEGATIVOS. Géneros *Neisseria* y *Moraxella*.

I. INTRODUCCIÓN

Las dos especies patógenas del género *Neisseria* están asociadas con meningitis y gonorrea. Este género es el de mayor importancia clínica en la familia *Neisseriaceae*, por lo que es importante conocer y familiarizarse con los principales procedimientos de identificación.

En el presente laboratorio el estudiante aprenderá las técnicas más importantes para la identificación de esta familia.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias de la familia *Neisseriaceae*, diferenciándolas de las bacterias del género *Moraxella*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar la morfología macroscópica y microscópica de las colonias de estos géneros.
- 2- Reconocer los procedimientos para realizar las pruebas de asimilación de carbohidratos

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El género *Neisseria* incluye bacterias con morfología de diplococcos Gram-negativos, semejantes a granos de café con una reacción positiva a las pruebas de oxidasa y catalasa. Conjuntamente con los géneros *Moraxella* (incluyendo



Branhamella catarrhalis, actualmente *Moraxella catarrhalis*), y *Kingella* conforman la familia *Neisseriaceae*. El género de esta familia con mayor importancia clínica es *Neisseria*, en el cual se incluyen las siguientes especies: *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. cinérea*, *N. subflava*, *N. lactamica*, *N. polysaccharea*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. elongata* y *N. flavescens*

Las especies de *Neisseria* se caracterizan por ser de metabolismo aerobio y el crecimiento de las especies patógenas se ve favorecido mediante incubación en una atmósfera altamente húmeda y enriquecida a 5-8% de CO₂. Tienen requerimientos nutricionales complejos. Algunas especies son capaces de degradar unos pocos carbohidratos, otras son completamente incapaces de hacerlo; mientras que las especies saprófitas se caracterizan porque producen pigmentos carotenoides.

Las especies patógenas primarias para el ser humano son *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Cajas con agar sangre.

Cajas con agar DNAsa.

Cajas con agar Thayer Martin.

Tirillas de oxidasa.

Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.

Tapabocas.

V. MUESTRA



Cepas de *Neisseria spp.* y *Moraxella spp.*

VI. PROCEDIMIENTO

Primer día.

- 1- Tomar las bacterias suministradas e inocular mediante una siembra, por agotamiento, en cajas con agar sangre y agar Thayer Martin. Incubar a 37°C por 24 horas en atmosfera con 5- 8% de CO₂.
- 2- Inocular, mediante una única estría, el agar DNAsa e incubar a 37°C por 24 h.

Segundo día.

1. Describir la morfología macroscópica de las colonias. Realizar tinción de Gram para describir morfología microscópica.
2. Para el agar DNAsa, adicionar sobre la línea de crecimiento HCl 0,1 N se deja actuar por unos minutos. El DNA se precipita y produce un color lechoso. La formación de un halo transparente alrededor de la colonia indica producción de DNAsa. Para el caso del medio que contiene azul de toluidina o verde de metilo, la presencia de un halo de color rosado alrededor de la colonia indica producción de DNAsa.
3. Realizar la prueba de oxidasa: Utilizar el reactivo de oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.
4. Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.



VI. TALLER DE PREGUNTAS

1. Complete el siguiente cuadro:

Característica	<i>Neisseria spp.</i>	<i>Moraxella spp.</i>
Morfología en tinción de Gram		
Actividad oxidasa		
Actividad catalasa		
Crecimiento en agar sangre		
Morfología de las colonias en agar Chocolate		
DNAsa		

2. ¿Cuál es la utilidad de los antibióticos que se añaden a los medios selectivos para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* a partir de muestras genitales?
3. Explique ¿cómo se prepara el agar Chocolate?



PRÁCTICA No. 7. BACILOS GRAM-NEGATIVOS NO FERMENTADORES. ***Género Pseudomonas spp.***

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, su especie más importante *P. aeruginosa* es un importante patógeno que los estudiantes de bacteriología deben conocer y aprender a identificar.

En esta práctica los estudiantes conocerán las pautas para la identificación de este importante patógeno *P. aeruginosa*.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias de la familia *Pseudomonaceae* teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas más importantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Conocer la morfología macroscópica y microscópica de las colonias de *P. aeruginosa*.
- 2- Diferenciar la especie más importante de la familia (*P. aeruginosa*) teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, la cual está formada por bacterias que habitan en el suelo y aguas estancadas, algunas forman parte de la microbiota intestinal de animales y el hombre.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacterias gram-negativas, aerobias, móviles, no fermentadoras.

Pseudomonas aeruginosa es el patógeno más importante del género debido a la gran cantidad de enfermedades que produce en personas inmunocomprometidas o condiciones de base que favorezcan la infección por esta bacteria. Esta bacteria es



un patógeno importante en infecciones nosocomiales, frecuentemente está asociada a resistencia a antibióticos.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Cajas con agar Mac Conkey.

Cajas con agar Cetrimide.

Tubos con medio TSI.

Tubos con agar Trypticase soja con NaCl al 6,5%.

Tubos con medio SIM.

Tubos con caldo Trypticase soja.

Tirillas de oxidasa.

Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.

Tapabocas.

V. MUESTRA

Cepas de *Pseudomonas spp.*

VI. PROCEDIMIENTO

Primer día.

- 1- Tomar las bacterias suministradas e inocularlas en agares sangre, Mac Conkey y Cetrimide, mediante siembra por agotamiento. Incubar a 37°C por 24 horas.
- 2- Inocular tubos con agar Trypticase soja con 6,5% NaCl (estriado en pico de flauta), medio TSI y medio SIM. Incubar a 37 °C por 24 horas.
- 3- Inocular tubos con caldo Trypticase soja e incubar a 42°C por 24 horas.



Segundo día.

- 1- Describir la morfología macroscópica de las colonias en agares sangre y Mac Conkey. Realizar tinción de Gram para describir morfología microscópica.
- 2- Para el caso del agar Cetrimide, examinar si las placas presentan crecimiento y pigmentación verde azulada (piocianina) alrededor del crecimiento. La detección de piocianina puede confirmarse extrayéndola con cloroformo; en un tubo con cloroformo disolver una colonia de la bacteria y observar la coloración. Para la detección de pioverdina, utilizar una lámpara de luz UV (254 nm).
- 3- Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.
- 4- Realizar la prueba de oxidasa: utilizar el reactivo de Oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Complete el siguiente cuadro:

Característica	<i>Pseudomonas spp.</i>
Morfología en tinción de Gram	
Actividad catalasa	
Actividad oxidasa	
Crecimiento en agar sangre/ Morfología de colonias	



Morfología de las colonias en agar Mac Conkey/ Producción de pigmentos	
Crecimiento en Agar Cetrimide/ Producción de pigmentos	
Crecimiento en agar Tripticasa soja al 6,5%	
Crecimiento a 42°C	
Reacción en medio TSI	
Reacción en medio SIM	

2. Investigar la composición y el fundamento de la utilización del agar Cetrimide.
3. ¿Cómo se diferencia *Pseudomonas aeruginosa* de las otras especies del género?



PRÁCTICA No. 8. FAMILIA VIBRIONACEAE. Género *Vibrio*.

I. INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae es la especie más importante del género *Vibrio*, causante de cólera, enfermedad diarreica que si no es tratada puede causar la muerte, por lo que es muy importante el diagnóstico de laboratorio e identificación del microorganismo. En la presente práctica el estudiante conocerá las pautas más importantes para la identificación de este patógeno bacteriano.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias de la familia *Vibrionaceae* teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas más importantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Conocer la morfología macroscópica y microscópica de las colonias de las especies más importantes.
- 2- Diferenciar la especie más importante de la familia teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Las bacterias del género *Vibrio* pertenecen a la familia *Vibrionaceae*. Son bacilos anaerobios facultativos, Gram-negativos y fermentadores. Se caracterizan por dar reacción positiva a la oxidasa y catalasa y por la presencia de flagelos polares. El cloruro de sodio estimula el crecimiento y algunas especies son estrictamente halofílicas. Se encuentran principalmente en el agua y son capaces de producir enfermedad gastrointestinal. Las especies de interés en clínica del género son principalmente patógenos intestinales.



Una de las especies más importantes del género es *Vibrio cholerae*, que se divide en serogrupos basados en el polisacárido O. Los serogrupos O1 y O139 producen una enterotoxina responsable de un cuadro diarreico caracterizado por la presencia de heces acuosas y deshidratación. El serogrupo O1 se divide a su vez en serotipos y biotipos.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos tinción de Gram.

Agua oxigenada.

Cajas con agar sangre.

Cajas con agar Mac Conkey.

Cajas con agar TCBS.

Tubos con medio TSI.

Tubos con caldo Tripticasa soja.

Tubos con caldo Tripticasa soja con NaCl al 3%.

Tubos con medio SIM.

Tubos con caldo MRVP.

Tubos con medio Citrato.

Agua oxigenada.

Reactivo de oxidasa (Tirillas de oxidasa).

Asa metálica en aro y en punta.

Portaobjetos.

Mecheros.

Guantes.

Gorro.

Tapabocas.

V. MUESTRA

Cepas de *Vibrio spp.*



VI. PROCEDIMIENTO

Primer día.

- 1- Sembrar la bacteria en cajas de agar sangre, agar Mac Conkey y agar TCBS. Incubar a 37°C por 24 horas.
- 2- Inocular tubos con caldo Tripticasa Soya, caldo Tripticasa Soya con 3% de NaCl, medio TSI, medio Citrato, Medio SIM y caldo MRVP. Incubar a 37°C por 24 horas.

Segundo día.

- 1- Describir la morfología colonial de la bacteria en los medios suministrados, considerando tamaño, forma, elevación, margen, tipo de superficie, producción de hemólisis y pigmento.
- 2- Realizar tinción de Gram para observar morfología microscópica.
- 3- Realizar la lectura de los tubos inoculados.
- 4- Realizar la prueba de la catalasa, adicionando una gota de agua oxigenada en una placa, suspendiendo una colonia de la bacteria. La formación de burbujas indica una reacción positiva.
- 5- Realizar la prueba de oxidasa: Utilizar el reactivo de Oxidasa (solución de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina al 1% en agua destilada). Poner un trozo de papel de filtro en una tapa de caja de Petri, añadir una gota de reactivo en el papel, depositar una colonia rápidamente (con un asa o un palillo de dientes). La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. También se pueden utilizar, para esta prueba, tirillas disponibles en el comercio.



VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Complete el siguiente cuadro:

Característica	<i>Vibrio spp.</i>
Morfología en tinción de Gram	
Reacción de la Oxidasa	
Reacción de la catalasa	
Crecimiento en agar sangre/ Morfología de colonias	
Morfología de las colonias en agar Mac Conkey	
Crecimiento en agar TCBS/ Producción de pigmentos	
Crecimiento en agar Trypticase soja	
Crecimiento en agar Trypticase soja al 3%	
Reacción en medio TSI	
Reacción en medio Citrato	
Reacción en medio SIM	
Reacción en caldo MRVP	

2. ¿Cómo se diferencian las bacterias de la familia *Vibrionaceae* de la familia *Enterobacteriaceae*?
3. Explique el fundamento del agar TCBS. ¿Por qué se considera selectivo?



BIBLIOGRAFÍA

1. Harley, Prescott. Laboratory Exercises in Microbiology. Fifth edition. Mc Graw Hill- Company. 2002.
2. Rojas N, Chaves E, Garcia F. Bacteriología Diagnostica. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. 2006.
3. Jawetz, Melnick, Adelberg. Medical Microbiology. 24th edition. Mc Graw Hill Company. 2007.
4. Winn, Allen, Janda, Koneman, et al. Diagnóstico Microbiológico. 6^a. Edición. Editorial Medica Panamericana. 2006.
5. Mc Faddin. Pruebas Bioquímicas para Bacterias de Importancia Clínica. 3^a. Edición. Panamericana. 2003.
6. Romero C. Microbiología y Parasitología Humana. 3^a. Edición. Editorial Medica Panamericana. 2007.
7. Rodriguez E, Gamboa M, Hernandez F, Garcia J. Bacteriología General. Principios y Prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 2005.
8. Murray P, Rosenthal K, Pfauer M. Microbiologia médica. 5a. Edicion. Elsevier. 2006.
9. Velasco J, Araque M, Araujo E, Longa A, Nieves B, Ramirez A, et al. Manual Práctico de Bacteriología clínica. Colección Textos Universitarios. Universidad Los Andes. Mérida. Venezuela. 2008.
10. Perilla M, Ajello G, Bopp Ch, Elliott J, Facklam R, Knapp J, et al. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Organización Mundial de la Salud. 2004.



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

