

AGAR SANGRE. HEMOLISIS.

Medio de cultivo enriquecido con la adición de sangre. Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes. Se siembra por agotamiento en estría en placas de agar sangre y se incuba. Hemólisis alfa. Hemólisis beta. Hemólisis gamma. La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina); la hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro y la hemólisis gama se refiere a la ausencia de hemólisis. Los estreptococos del grupo A y B son beta hemolíticos, mientras que D es generalmente alfa o gamma. Los *Streptococcus pneumoniae* y *viridans* son alfa-hemolíticos. Por lo tanto la reacción de hemólisis es importante para la clasificación de los estreptococos. La reacción de hemólisis junto con otra de las características fisiológicas es suficiente para una identificación clínica presuntiva. Entre otras bacterias que pueden tener hemolisinas se incluye *Streptococcus salivaris*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

BETA-GALACTOSIDASA (ONPG)

Esta enzima hidroliza la lactosa originando glucosa y galactosa. Para conocer si un microorganismo posee β -galactosidasa se utiliza como sustrato un compuesto orgánico, ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactósido), que presenta el mismo tipo de enlace de la galactosa que en la lactosa, éste, al ser hidrolizado, libera o-nitrofenol que es de color amarillo, mientras que el ONPG es incoloro. Por tanto una reacción positiva originará color amarillo cuando se incuba el microorganismo en presencia de ONPG. La prueba se realiza en medio líquido que contiene ONPG y es cuantitativa. POSITIVOS: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*. NEGATIVOS: *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*.

BILIS SOLUBILIDAD

Algunos microorganismos se lisan en presencia de bilis. Se inocula un caldo nutritivo sin glucosa y con pH alrededor de 7 con el microorganismo durante 24 h y se le añade la solución de bilis al 10% (generalmente desoxicolato de sodio). Se incuba a 35-37°C y si antes de 3 h se produce un aclaramiento en el contenido del tubo se identifica *Streptococcus pneumoniae*.

CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, esta enzima es similar a la estructura de la hemoglobina. La catalasa protege a las células frente al peróxido de hidrógeno producido por los macrófagos a través del metabolismo del oxígeno. Cataliza la formación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. Es muy útil para distinguir *Streptococcus* (negativa) de *Staphylococcus* (positiva) y *Clostridium* (negativa) de *Bacillus* (positiva). La actividad catalasa se detecta añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno (3%) sobre colonias en medio que no sea de agar sangre (da resultados falsos). La producción de burbujas indica la presencia del enzima. Excluyendo al género *Streptococcus*, *clostridium* y algunos otros la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas tienen catalasa. Ej. *E.coli*, *Pseudomonas* spp.

CARBONO: UTILIZACIÓN DE FUENTES

La mayoría, pero no todas las bacterias, pueden crecer en medios simples con una única fuente de carbono. Este método permite ensayar tal habilidad y la capacidad para utilizar sustratos específicos. Las bacterias se inoculan en medios simples conteniendo diferentes sustratos orgánicos como fuentes de carbono y energía.

CITRATO

Usado para diferenciar enterobacterias. Hay microorganismos capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono produciendo alcalinidad. La prueba se realiza en tubos de medio sólido muy inclinados, ya que la utilización se produce sólo en condiciones aerobias, que contienen un indicador de pH que vira de color verde a azul al alcalinizarse el medio.

COAGULASA

La coagulasa es un enzima capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* patógenas (enterotoxigénicas) producen esta enzima. Se añade una suspensión densa de bacterias a un tubo pequeño con plasma y se incuba a 37 °C. Se observa la coagulación entre las 4 y 24 h.

CONTRASTE DE FASES

El microscopio de contraste de fases dispone de un sistema en el que se acentúa la diferencia entre el índice de refracción de las células y del medio incrementando así el contraste de células translúcidas, sin uso de colorantes. Permite distinguir fácilmente a Bacilos y Cocos

DESCARBOXILASAS DE AMINOÁCIDOS

(arginina, lisina, ornitina) Los aminoácidos al perder el grupo carboxilo se convierten en aminas lo que incrementa el pH del medio y el indicador (púrpura del bromocresol) vira a violeta. Las descarboxilasas son útiles en la diferenciación de enterobacterias. Las bacterias se inoculan en medios complejos que contienen lisina, ornitina o arginina al 1% y un indicador de pH (púrpura de bromocresol).

DIGESTIÓN Y COAGULACIÓN DE LECHE (PRUEBA DEL TORNASOL)

El tornasol es un indicador redox y de pH que se añade a la leche para determinar la fermentación de la lactosa, la caseolisis (Digestión o Disolución) y la Coagulación de la caseína. La leche se incuba, una vez inoculada, en aerobiosis o anaerobiosis, según el microorganismo, a 35-37°C. Si aparece color rosa (el indicador es inicialmente púrpura) indica fermentación de la lactosa (acidificación), si no cambia el color no se ha utilizado la lactosa ni los compuestos nitrogenados, un color azul indica reacción alcalina y significa que no se ha utilizado la lactosa y sí los compuestos nitrogenados, la aparición de un coágulo indica coagulación de la leche y la aparición de burbujas, producción de gas. La caseolisis (digestión) provoca disolución de la leche que se aprecia más transparente.

DNASA

Algunas bacterias excretan nucleasas que hidrolizan el DNA. Se hace una estría gruesa en una placa de medio que contenga DNA. Se revela después de incubar con HCL 0,1 N que precipita el DNA no hidrolizado.

ESPORULACION (CALENTAMIENTO)

Las Endosporas son formas de resistencia metabólicamente inactivas, que resisten la alta temperatura, la desecación y la radiación. Las endosporas pueden sobrevivir al calentamiento y originar nuevas formas vegetativas en un medio de cultivo. Se inocula un tubo de caldo con una suspensión sospechosa de contener endosporas. Se calienta a 80 oC durante 10 min. Se enfría y se incuba a temperatura adecuada. Los bacilos Gram positivos esporulados son Clostridium spp, Bacillus antracis, cereus.

FENILALANINA DESAMINASA

Las desaminasas catalizan la pérdida de NH₃ en un aminoácido originando un ácido carboxílico. Las bacterias que desaminan la fenilalanina producen ácido fenilpirúvico que con Fe₃Cl en solución ácida produce un color verdoso (el reactivo es de color amarillo).

FERMENTACIÓN DE AZUCARES

Las bacterias anaerobias o anaeróbicas facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H₂ o CO₂). Estos pueden detectarse incluyendo en el medio un indicador de pH y una campana Durham. Se pueden ensayar diferentes azúcares como sustrato para diferenciar especies, sobre todo de bacterias entéricas. Se inocula la bacteria en un medio conteniendo una pequeña cantidad de peptona, un indicador de pH y una fuente de carbono fermentable al 1-2 % y se coloca dentro de los tubos una campana Durham.

HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN

Los polisacáridos, como el almidón son demasiado largos para ser transportados al interior de la célula. Los microorganismos excretan amilasas que hidrolizan esos polímeros hasta oligosacáridos o monosacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer. La hidrólisis de almidón es analizada en medios conteniendo almidón en placa. Después de incubar se inundan las placas con lugol que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura.

HIDRÓLISIS DE ESCULINA

La esculina contiene un carbohidrato unido a un compuesto aromático. Este test se usa a menudo para distinguir especies de Streptococcus. Hay microorganismos que hidrolizan la esculina en esculetina y glucosa, la primera reacciona con sales de hierro originando un compuesto de color negro. Se realiza en tubos inclinados incubados durante 48 h. Se crecen las bacterias en un medio complejo que contiene 0,01 % de esculina y un 0,05 de citrato férrico.

HIDRÓLISIS DE GELATINA

La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para ser transportados dentro de las células. Las bacterias excretan enzimas extracelulares que hidrolizan esos polímeros transportando al interior de la célula en monómeros que les sirven para crecer. La producción de proteasas es evaluada por incorporación de una proteína (gelatina o caseína) en un medio sólido en placa. La placa se inunda con ácido que precipita la proteína no hidrolizada.

HIDRÓLISIS DE HIPURATO

El hipurato es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando benzoato (que se pone de manifiesto al añadir ninhidrina o Fe₃Cl) y glicina. Este test se usa a menudo para diferenciar especies de Campylobacter y de Streptococcus. Una suspensión de bacterias se añade a una solución de hipurato y se incuba 2 horas. En ese momento se añade la ninhidrina.

HIDRÓLISIS DE LÍPIDOS

(Lipasas) Algunas bacterias excretan lipasas extracelulares que pueden hidrolizar lípidos grandes en sustratos de bajo peso molecular que son transportados al interior de la célula para ser utilizados en el crecimiento. Una emulsión de lípidos y un indicador llamado Spirit Blue se incorporan en un medio sólido complejo.

INDOL

Utilizado para diferenciar enterobacterias. Existen bacterias que producen triptofanasa que convierte el triptófano en indol. La bacteria se crece en medios que contienen triptófano (caldo de triptoma). La presencia de indol se detecta añadiendo p-dimetilaminobenzaldehído. Las bacterias que resultan indol positivas al romper el indol del triptófano, incluyen: *Aeromonas hydrophilia*, *Aeromonas punctata*, *Bacillus alvei*, La mayoría de los *Citrobacter spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium spp.*, *Haemophilus influenzae*, La mayoría de los *Proteus spp.* (más no el *P. mirabilis*), *Plesiomonas shigelloides*, *Pasturella multocida*, *Pasturella pneumotropica*, y *Vibrio spp.*

KCN: CIANURO DE POTASIO

El KCN inhibe la cadena de transporte de electrones uniéndose a los citocromos impidiendo el crecimiento microbiano. Sin embargo, algunas bacterias no son inactivadas y pueden nacer. Las bacterias se inoculan en caldo de peptona que contiene cianuro potásico.

KLIGLER

TSI (GLUCOSA, LACTOSA, SACAROSA)

Se utiliza este medio en la diferenciación de enterobacterias. En el mismo medio se pueden determinar la fermentación y utilización de los hidratos de carbono, la producción de sulfhídrico y la producción de gas. El primer medio (Kligler) contiene glucosa y lactosa, el segundo además contiene sacarosa. Se preparan en tubos poco inclinados y con bastante medio, inoculándolos por picadura en el centro del medio y realizando además una estría recta al salir sobre la superficie inclinada del medio. La producción de ácido de glucosa se pone de manifiesto en el fondo del tubo por viraje del indicador a amarillo, la de la lactosa en la superficie inclinada por viraje al mismo color, la producción de gas a partir de glucosa por aparición de burbujas que agrietan el medio y la de sulfhídrico por la aparición de un precipitado negro debido a las sales de hierro presentes.

LECITINASA

Algunos microorganismos producen lecitinasa que actúa sobre la lecitina. Se utiliza el agar yema de huevo, se inocula e incuba a 35-37°C en anaerobiosis durante 48 h. Las colonias productoras de lecitinasa forman una zona opaca a su alrededor.

MACCONKEY

Es un medio diferencial que permite distinguir entre enterobacterias que hidrolizan lactosa y las que no lo hacen. La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo. Las colonias lactosas negativas permanecen incoloras aunque el medio vira a amarillo por la subida de pH que origina la utilización de las proteínas (peptona) del medio. Se inoculan placas de medio y se incuban a 37 °C.

MOVILIDAD

La movilidad de las bacterias es consecuencia de la presencia de flagelos. El movimiento puede observarse en preparación en fresco con el microscopio de contraste de fase. Para ver la movilidad se realiza una preparación en fresco que se observa en contraste de fases. La movilidad debe distinguirse del movimiento Browniano debido a las corrientes en la preparación.

OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN

El medio de Hugh-Leifson es una base sin carbohidratos, a la que se puede añadir después de esterilizarlo cualquier azúcar esterilizado previamente por filtración. Cuando se habla de esta prueba sin especificar nada, hay que suponer que el test se ha hecho con glucosa, así, cuando se dice que un microorganismo es oxidante o fermentador se sobreentiende que lo es con respecto al metabolismo de la glucosa. La prueba se realiza en dos tubos con medio semisólido y recto, que inicialmente son de color verde. Se inoculan por picadura en el centro del tubo y uno de ellos se recubre con parafina líquida estéril (que impide el contacto del medio con el oxígeno atmosférico). El indicador en medio ácido (el metabolismo de los azúcares produce ácidos, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno) es de color amarillo. Si el microorganismo es únicamente oxidante, después de la incubación sólo estará amarillo el medio sin cubrir con parafina, si es oxidante y fermentador, en los dos tubos el color virará a amarillo y si sólo puede utilizar el azúcar cuando no hay oxígeno sería fermentador (tubo con parafina amarillo)

OXIDASA

La presencia de citocromo C oxidasa en la cadena de transporte de e⁻ puede detectarse utilizando un aceptor de e⁻ artificial p-fenilendiamina. Este test se usa para diferenciar Pseudomonas de enterobacterias. Se utiliza como reactivo p-fenilendiamina al 1% en agua, que se coloca en un papel de filtro, posteriormente, con un asa que no sea de hierro (daría falsos s), se coge una colonia de 24 h y se extiende sobre el papel mojado. Es positiva cuando aparece un color azul en la zona de depósito de la bacteria.

REDUCCIÓN DE NITRATO A NITRITO

Algunas bacterias pueden usar nitratos como aceptor final de e- en la respiración. el nitrato puede ser reducido a nitrito . Las enterobacterias y Pseudomonas son usualmente s. Las bacterias se inoculan en medios conteniendo nitrato potásico. El nitrito procedente de la reducción de células puede detectarse añadiendo alfa-naftilamina y ácido sulfanílico produciéndose un color rosa-rojo.

REDUCCIÓN DE NITRATO A NITRÓGENO GASEOSO

Se puede saber si el nitrato puede haberse reducido más que hasta nitrito produciéndose nitrógeno gas. Si al añadir zinc en polvo no aparece color rojo es que no queda nitrato porque se ha reducido a gas (desnitrificación).

SENSIBILIDAD A OPTOQUINA

La optoquina (clorhidrato de etilhidroxicupreína) inhibe a bajas concentraciones el crecimiento de S.pneumoniae, mientras que no afecta al crecimiento de otros estreptococos alfa-hemolíticos. Se realiza igual que la prueba anterior, con discos sobre placas inoculadas. En S.pneumoniae se observan halos de inhibición del crecimiento de más de 15 mm

SULFHIDRICO

Muchas bacterias producen sulfuro de hidrógeno (sulfhídrico) a partir de aminoácidos azufrados (cisteína o metionina) o tiosulfato. La fermentación de sulfhídrico puede ser detectada incluyendo hierro reducido en el medio para formar un precipitado negro de FeS Se inocula un medio de agar nutritivo conteniendo tiosulfato de metionina y sulfato ferroso.

ROJO DE METILO

Para diferenciar bacterias entéricas se utiliza el medio líquido de Clark y Lubs igual que en la prueba de Voges-Proskauer. Se inocula el medio y una vez incubado se le añaden unas gotas de rojo de metilo al 0,5% en etanol al 60%. Una coloración roja indica que la prueba es positiva, es decir, que los microorganismos han fermentado la glucosa para producir ácido pirúvico El rojo de metilo es un indicador que es rojo a pH <4.3.>4.3.

TIOGLICOLATO

Este medio se usa para determinar el efecto del oxígeno sobre el crecimiento microbiano. Aerobio, Anaerobio, Facultativo, Microaerobio. Un tubo con medio semisólido contiene tioglicolato para reducir el potencial redox del medio. Así sólo hay oxígeno en la superficie y no en el resto del tubo. El tubo es inoculado con un asa de punta y se incuba hasta que se produce crecimiento. Si el microorganismo es aerobio estricto crecerá en la parte de arriba del tubo, si es anaerobio estricto no crecerá en la parte más alta del tubo y si es anaerobio facultativo crecerá por todo el medio de cultivo.

UREASA

Este enzima hidroliza la urea ($H_2N-CO-NH_2$) y origina amonio lo que producirá un incremento del pH que puede detectarse con un indicador. Las bacterias se inoculan en un medio con glucosa-peptona y urea al 2%. Como indicador de pH se utiliza rojo fenol

VOGES-PROSKAUER

Uno de los test del IMVIC para enterobacterias es el Voges Proskauer. Las especies que llevan a cabo la fermentación a butanodiol de la glucosa acumulan acetoína en el medio. Las bacterias se inoculan en caldo glucosa-peptona. Las especies que llevan a cabo la fermentación butanodiólica de la glucosa forman acetoína en el medio. Se añade alfa-naftol y creatina en medio alcalino. La acetoína se convierte en diacetilo con la aparición de un color rojo

ZIEHL-NEELEN: BAAR

Reactivos: fucsina básica fenicada - solución de ácido-alcohol (3% de HCl en etanol de 95°) - azul de metileno Método: Extensión - Desecación - Fijación con alcohol metílico y enfriar - Fucsina durante 5 min en caliente - Decolorar hasta desaparición del color con ácido-alcohol - Lavar con agua - Azul de metileno durante 1 min - Lavar con agua - Secar - Observación con objetivo de inmersión. Esta tinción permite diferenciar a los microorganismos que son ácido alcohol resistentes, de color rojo, de los que no lo son, de color azul. Se utiliza en la identificación de micobacterias.