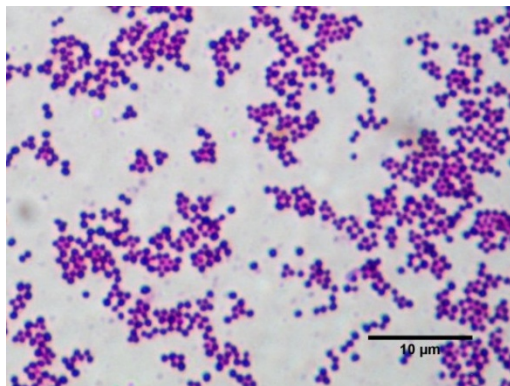
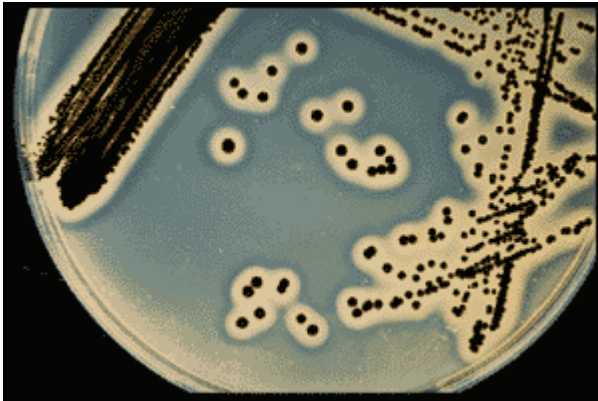


Tema 13.- MÉTODOS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

Observación de colonias y tinciones. Pruebas fisiológicas y bioquímicas de identificación.



Enfoques básicos para la identificación de microorganismos

Identificar el microorganismos presente en la muestra : clasificarlo dentro de un grupo o taxón ya establecido, con el que tenga la mayor semejanza usando **MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN:**

-CONVENCIONALES O CLÁSICOS:

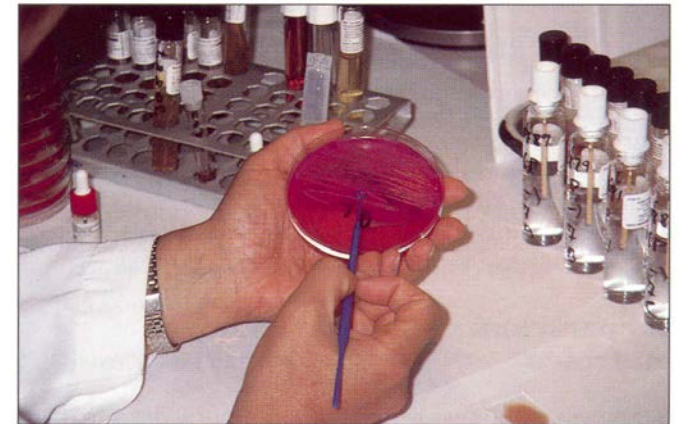
- Se cultiva el microorganismo (medios sólidos o líquidos)
- características morfológicas y fenotípicas: metabólicas, enzimáticas, fisiológicas, etc.

-INMUNOLÓGICOS: reacción antígeno-anticuerpo

-GENÉTICOS: características genotípicas (detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos)

-OTROS: principios de la química, bioquímica y física

Si es preciso se determina el serotipo bacteriano usando antisueros específicos contra los antígenos capsulares (antígeno K), somáticos: lipopolisacárido de la pared en Gram – (antígeno O) y flagelares (antígeno H).



MÉTODOS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

1. Obtención de un cultivo puro del microorganismo a partir de la muestra normalmente mediante cultivo en medio sólido en placa. Objetivos

a) **CONTAR: Aislamiento directo** (ya visto)

Staphylococcus aureus y otras especies **ISO 6888-1:1999**

Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies).

Parte 1: Técnica que utiliza el medio agar de Baird-Parker (**UNE-EN ISO 6888-1:2000**).

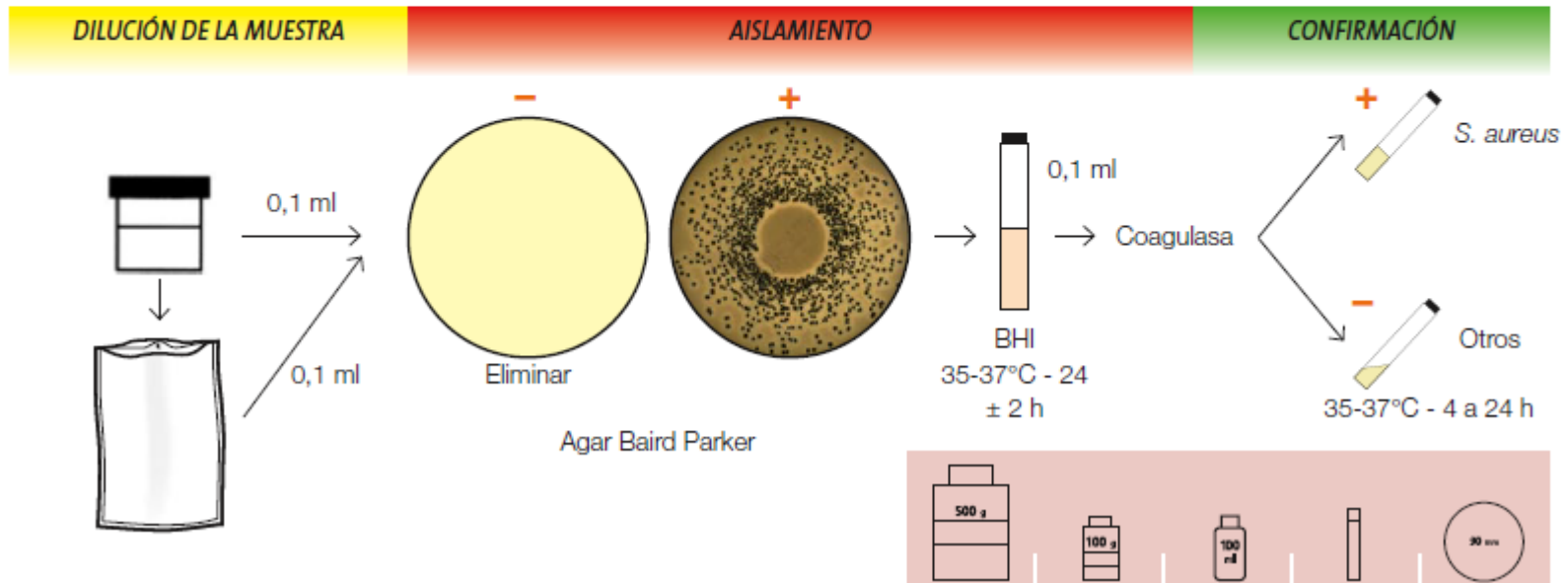
Medio de aislamiento

Sembrar el inóculo en superficie sobre **Agar Baird Parker**

Incubación: 48 h a 35-37°C

Confirmación

Coagulasa



b) **DETECTAR. Enriquecimiento previo** (se selecciona al microorganismo de interés frente al resto de la población) y **aislamiento posterior**.

■ Enriquecimiento primario o preenriquecimiento. En medio líquido no selectivo para recuperar al microorganismo que pudiera estar dañado por congelación, deshidratación, tratamiento térmico.

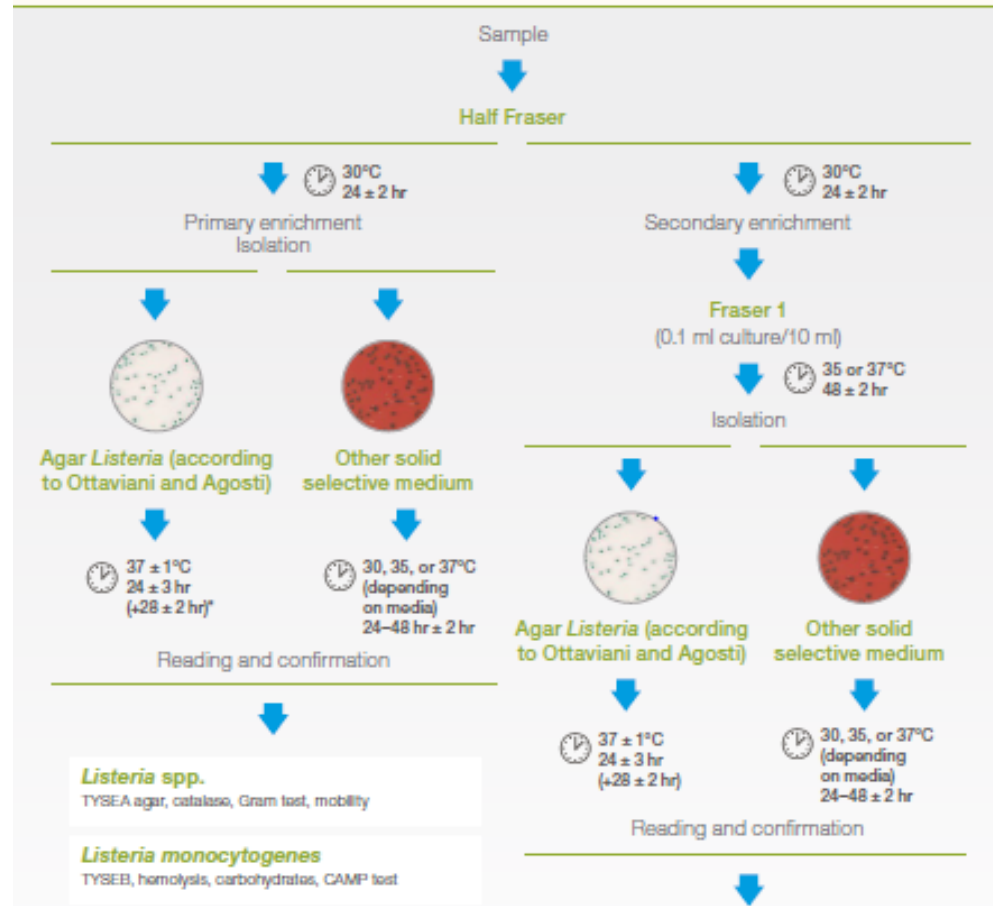
■ Enriquecimiento secundario o enriquecimiento selectivo en medio líquido donde se selecciona el microorganismo con tasa de crecimiento más alta utilizando la composición química, temperatura, pH, fuerza iónica, aireación, fuente de carbono

EN ISO 11290-1/A1:2005

Horizontal method for the detection and enumeration of *L. monocytogenes*

Microbiology of food and animal feeding stuffs

Part 1: Detection method

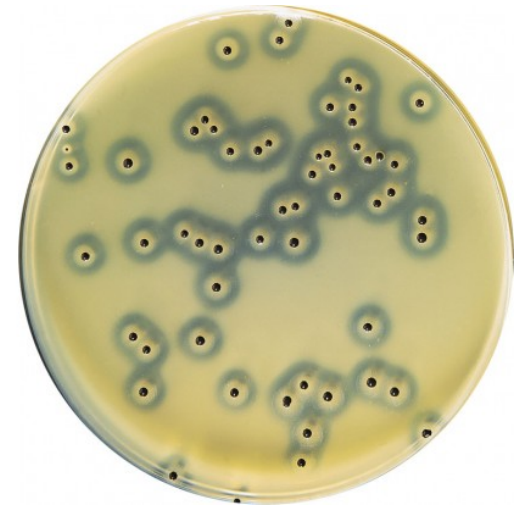
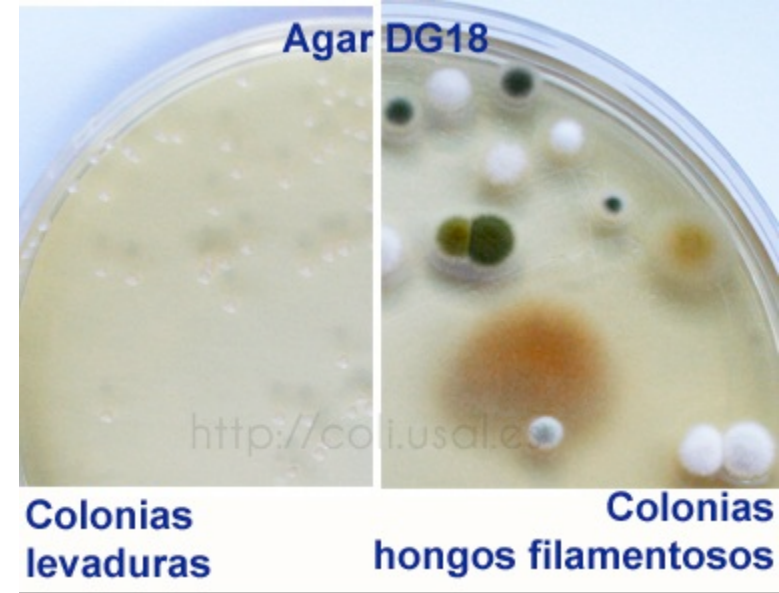
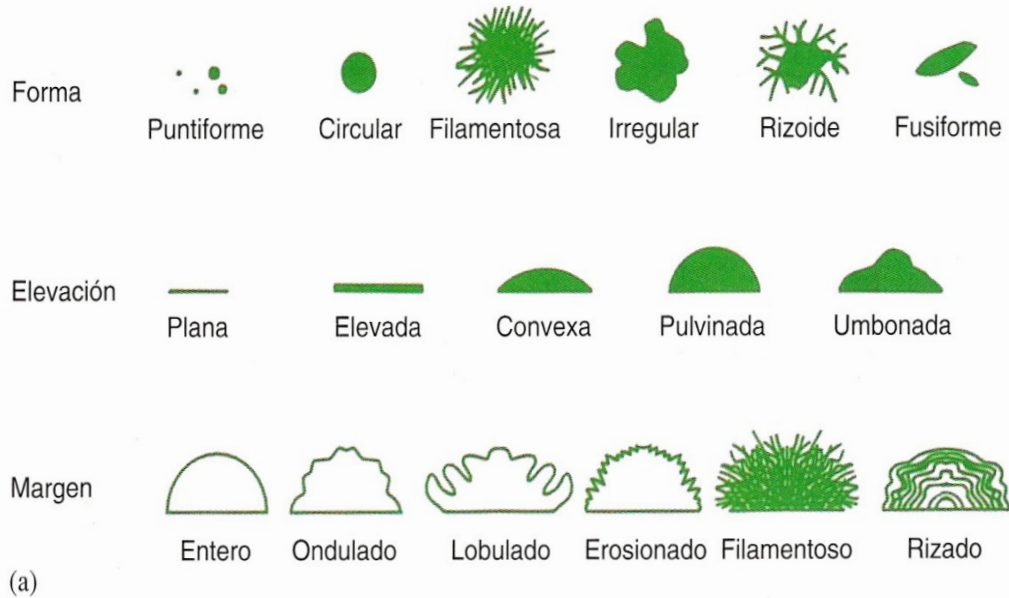


Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos

METODOS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

2. Identificación preliminar de las colonias desarrolladas en los medios sólidos

(tamaño, color, forma, elevación, margen)

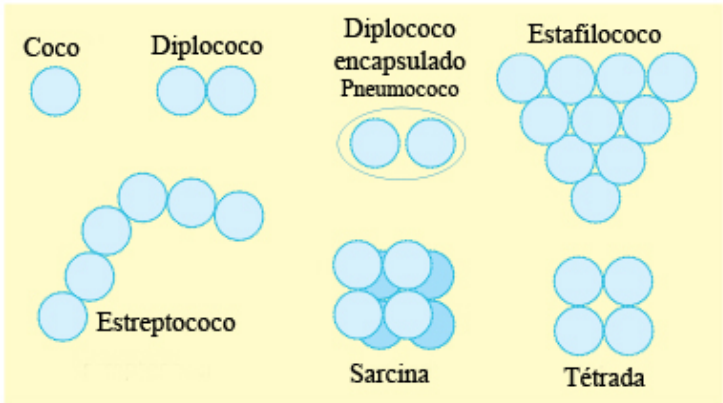


Colonias típicas de *Staphylococcus aureus* en Baird Parker

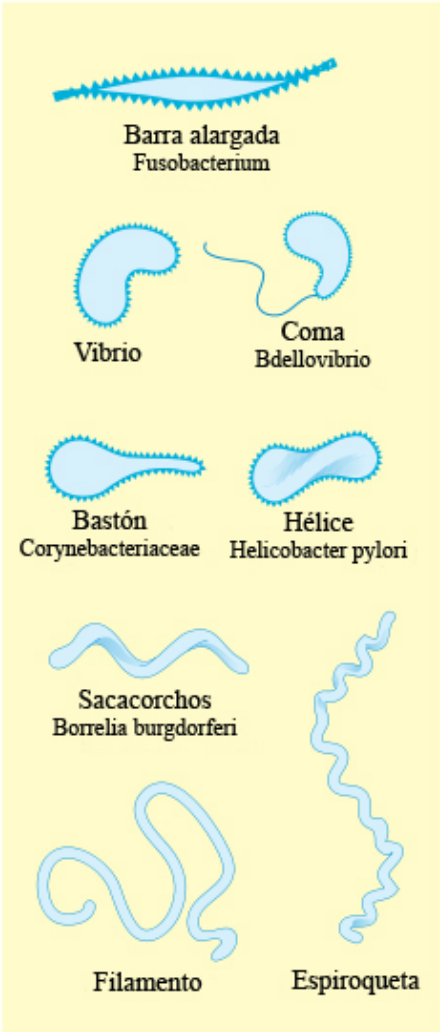
3. Observación de la morfología mediante la tinción de Gram

(morfología, agrupación y reacción de Gram)

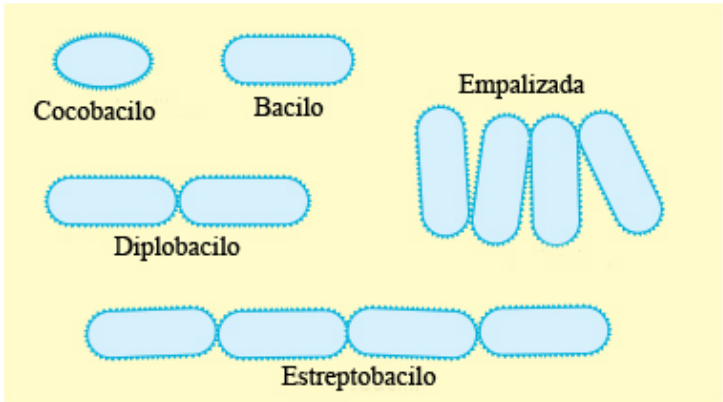
Cocos



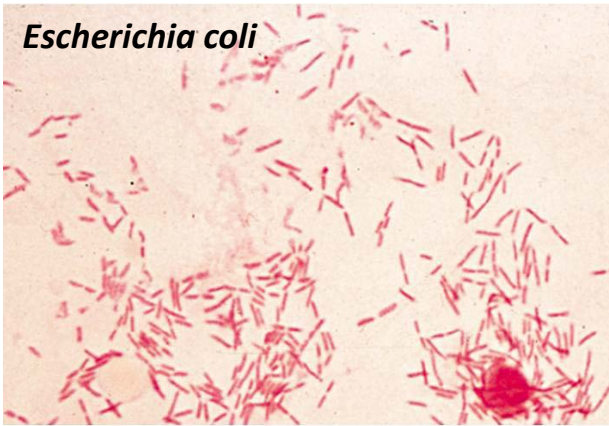
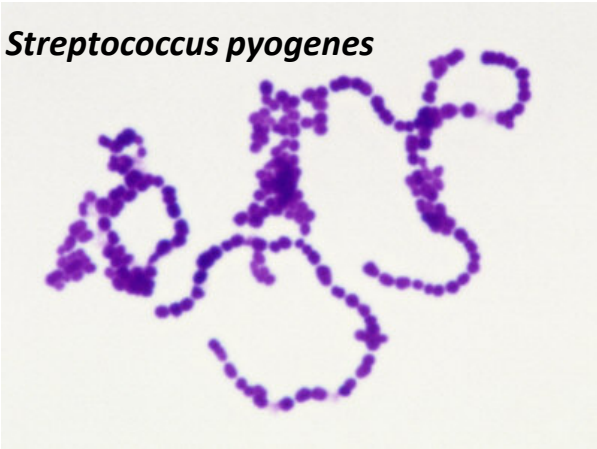
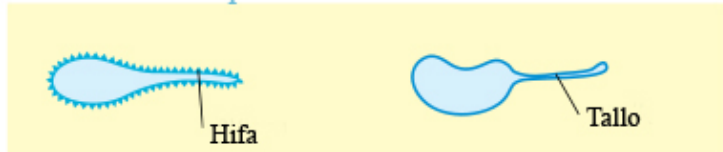
Otros



Bacilos

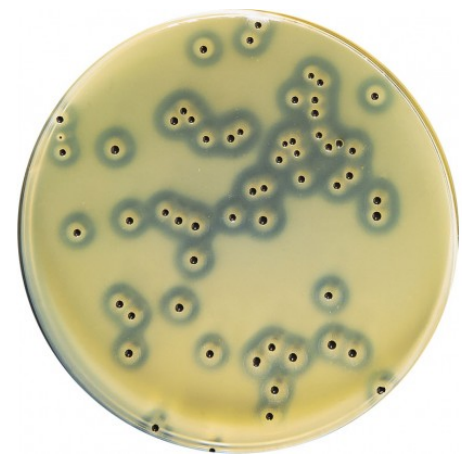


Apéndices bacterianos



4. Pruebas de identificación La taxonomía bacteriana convencional permite la identificación mediante la aplicación de diversos criterios (fisiológicos, metabólicos y bioquímicos) que se suelen llevar a cabo en forma de cascada decisoria, con un algoritmo de identificación consensuado o estandarizado (Fig. 1). Siempre se parte de una identificación preliminar (basada en la tinción de Gram, morfología colonial, etc.) que permite simplificar la batería a un mínimo de pruebas necesarias y apropiadas.

- Pruebas primarias: determinan la familia o incluso el género
 - Catalasa
 - Oxidasa
 - Pruebas oxidación-fermentación
 - Esporas
 - Relación con el oxígeno
 - Movilidad
- Pruebas secundarias y terciarias: se utilizan después de las primarias y sirven para determinar las especie
 - Pruebas bioquímicas
 - Pruebas enzimáticas



Colonias típicas de *Staphylococcus aureus* en Baird Parker

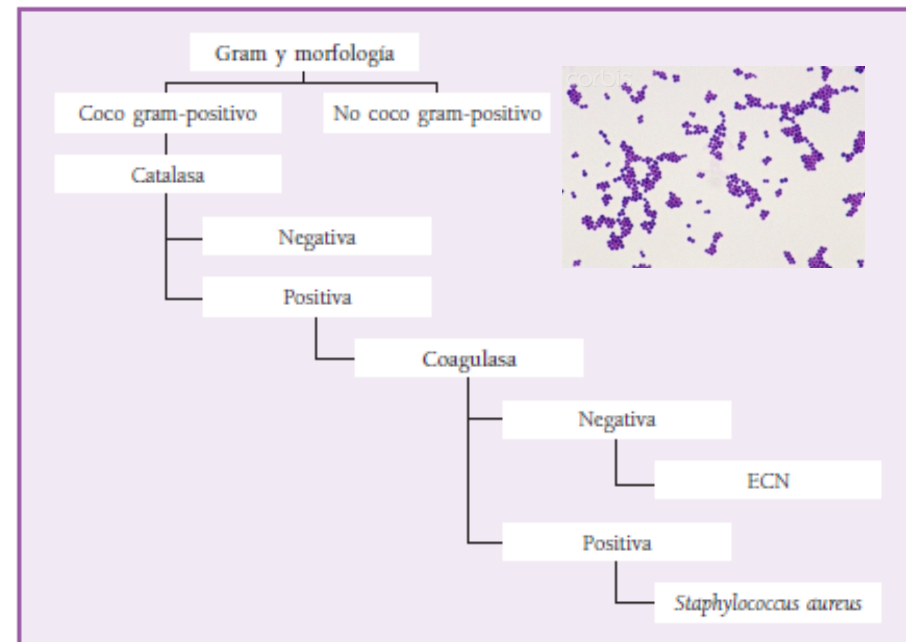


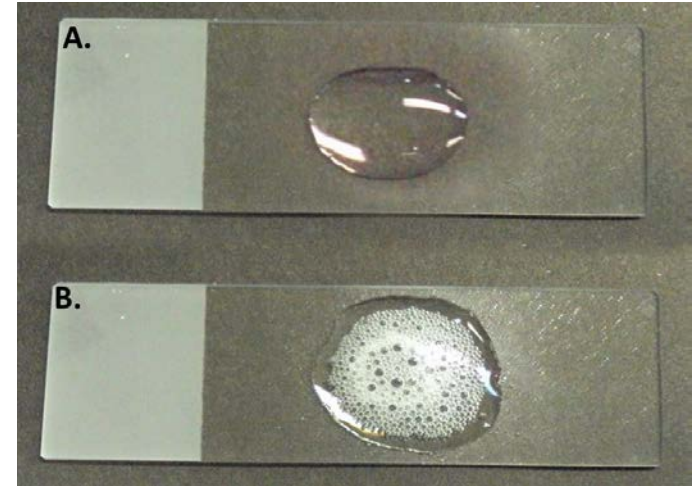
Figura 1. Ejemplo de identificación por algoritmo en cascada. ECN: estafilococos negativos para la coagulasa.

Pruebas bioquímicas y enzimáticas rápidas para hacer con las colonias desarrolladas en los medios de aislamiento

1. **Prueba de la catalasa:** detecta la enzima catalasa por aparición de burbujeo tras adición de H_2O_2

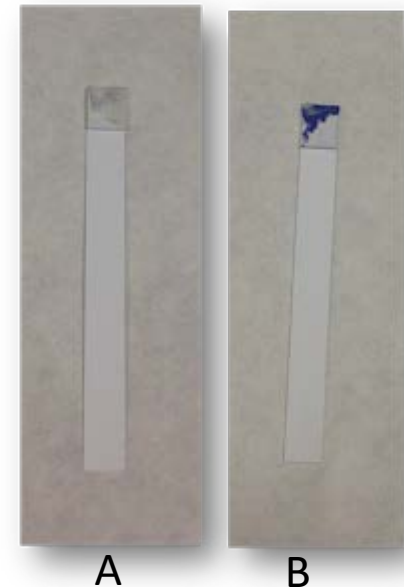


- A. Catalasa negativo: *Streptococcus*
B. Catalasa positivo: *Staphylococcus*



2. **Prueba de la oxidasa:** detecta el citocromo c oxidasa por medio de reacción con el reactivo tetrametil-para-fenilendiamina que en estado reducido es incoloro y cuando se oxida por el citocromo c oxidasa pasa a púrpura

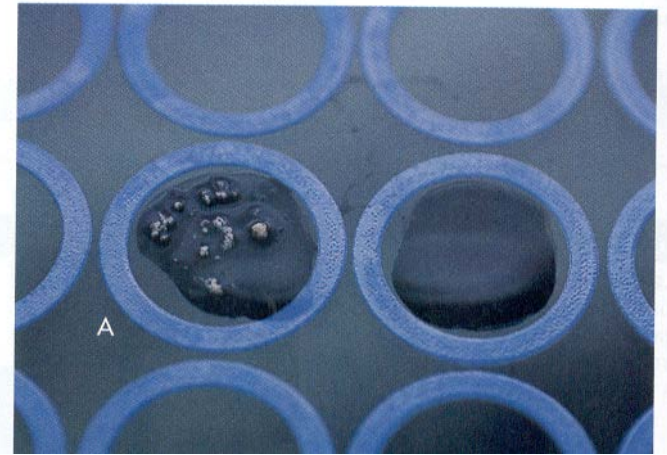
- A. Oxidasa negativo: *Enterobacterias*
B. Oxidasa positivo: *Pseudomonas*



3. **Prueba de la coagulasa:** detecta la enzima coagulasa que se une al fibrinógeno del plasma y lo reduce a fibrina (coagulación)

Coagulasa positivo: *Staphylococcus aureus*

Coagulasa negativo: El resto de *Staphylococcus*



Prueba de la coagulasa +

Pruebas fisiológicas y bioquímicas convencionales que requieren cultivo del microorganismo

PRUEBAS FISIOLÓGICAS

1. Relación de las bacterias con el oxígeno
 2. Movilidad
 3. Crecimiento en diferentes condiciones ambientales (pH, temperatura y concentración de NaCl)
- } Inoculación por picadura en agar blando

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

1.Pruebas de producción de ácido y de gas a partir de carbohidratos. El ácido se detecta por cambio de color en el indicador de pH y la producción de gas por la aparición de burbujas en el interior de la campana Durham

- Los coliformes (un grupo de enterobacterias) fermentan lactosa con producción de ácido y gas cuando se cultivan en caldo lactosado. Incluye a *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*



(A): caldo lactosado con púrpura de bromocresol (indicador pH) y campana Durham sin inocular

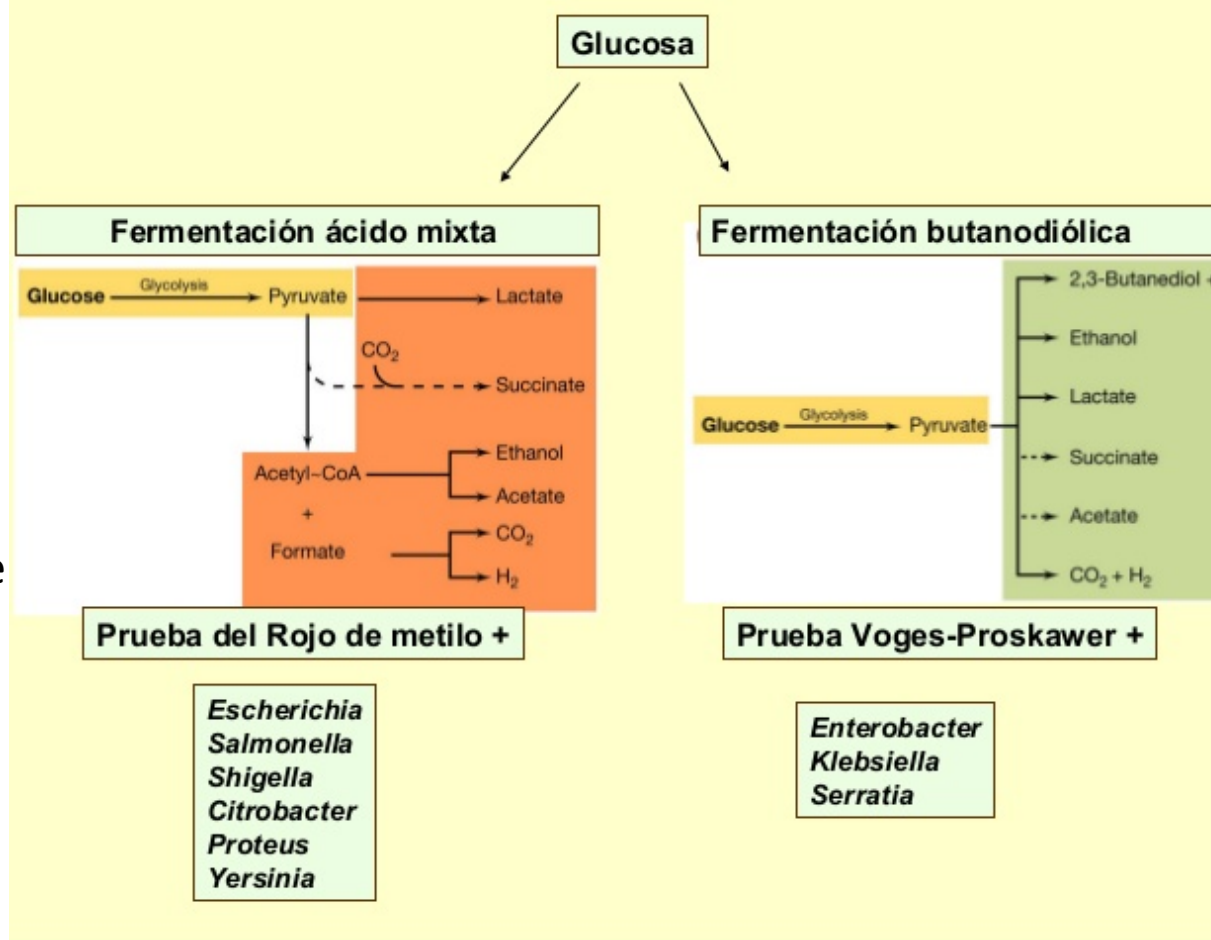
(B): caldo lactosado donde han crecido coliformes

2. Prueba del Rojo de Metilo y de Voges Proskauer: Determina la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa por la vía ácido mixta o por la butanodiólica.

Rojo de metilo.

El rojo de metilo es un indicador de pH variando desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía ácidomixta.

Voges-Proskauer. Permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Si es así, se forma un producto intermedio (acetoína) que forma un complejo de color rojizo con el α -naftol.



MR – VP broth
Tube on left is positive (*E. coli*);
tube on right is negative.



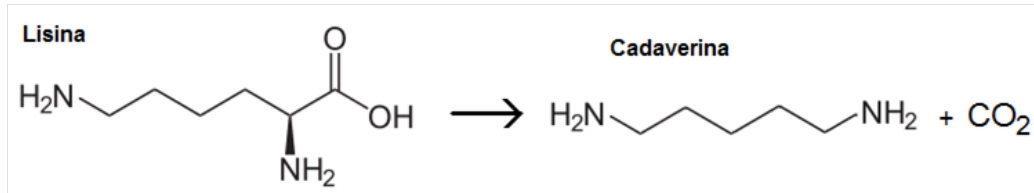
Negative (*E. coli*)

B: Positive (*Enterobacter aerogenes*)

Se utiliza como parte de la identificación a nivel de especie de enterobacterias

3. Pruebas de descarboxilación de aminoácidos

- La lisina descarboxilasa (LDC) a partir del aminoácido lisina en anaerobiosis produce una diamina + CO₂ que suben el pH del medio y se detecta con un indicador de pH. Ej. *Salmonella* es LDC (+)



4. Utilización de citrato como fuente de carbono

- Medio citrato citrato (fuente de carbono) y sales de amonio (fuente de nitrógeno). Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio liberando carbonatos, bicarbonatos y NH₃ lo que produce una fuerte alcalinización del medio y un cambio de color del indicador de pH (azul de bromotimol).

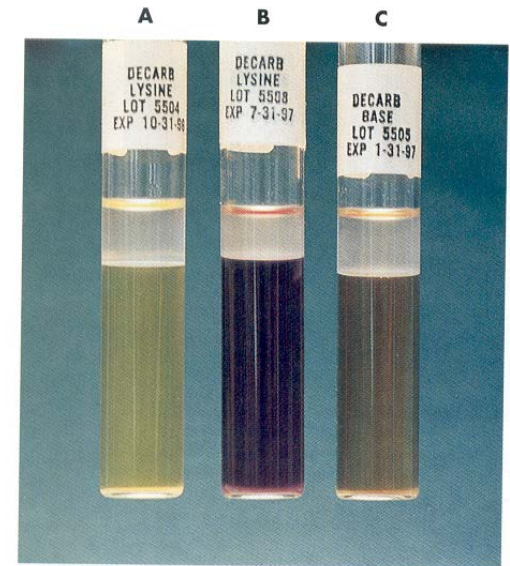
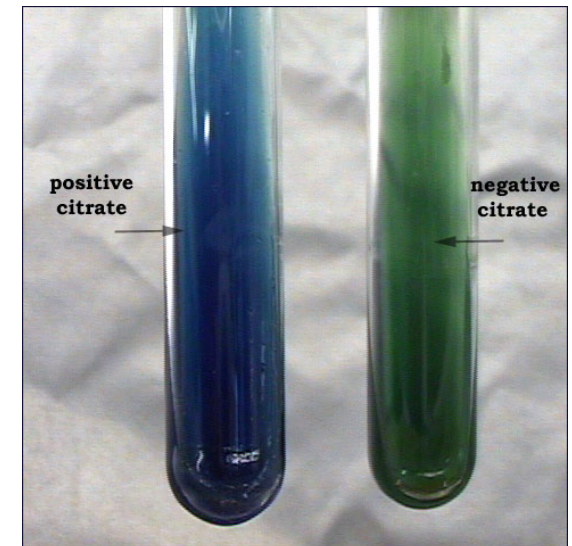
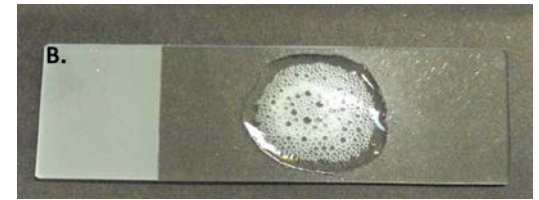
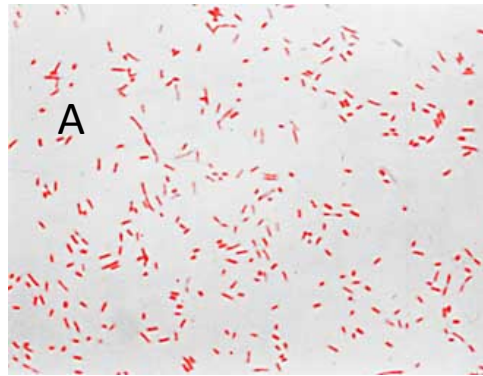


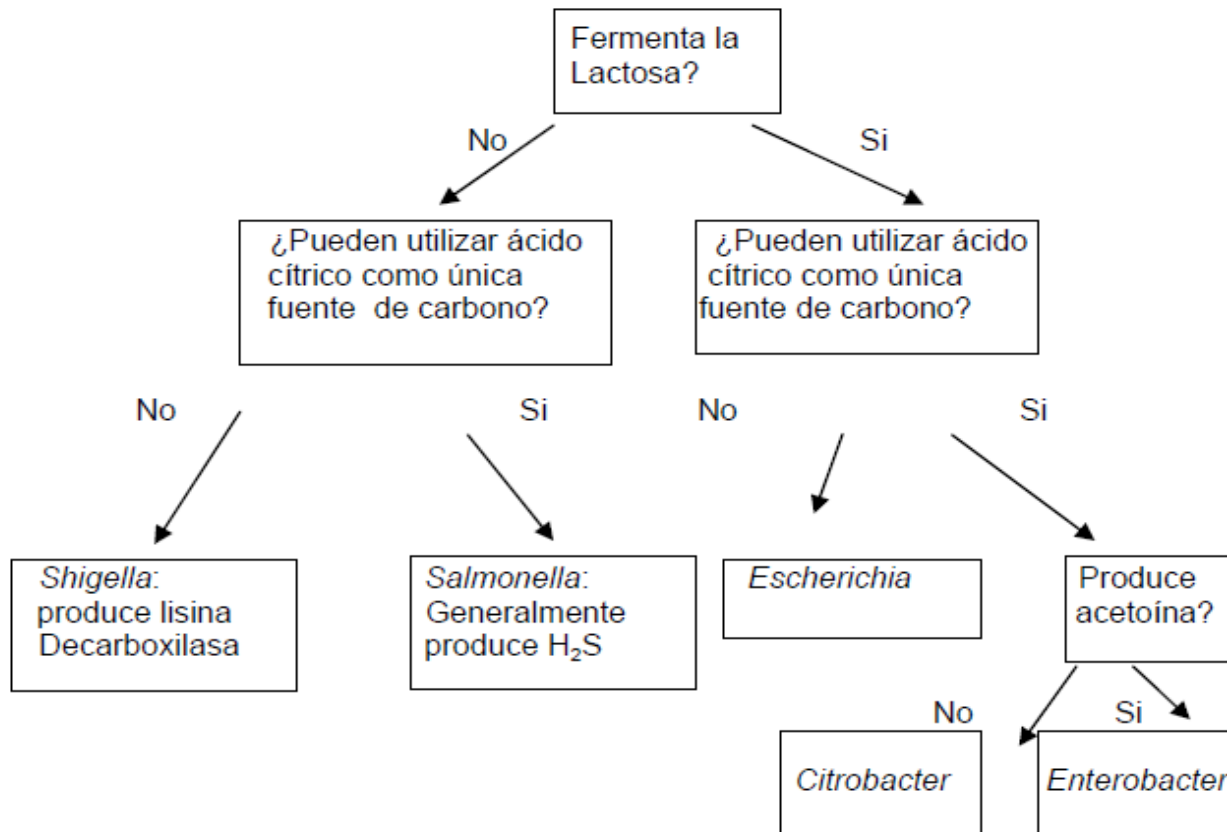
FIGURE 11-11 With the use of bromocresol purple as the pH indicator, a negative lysine decarboxylase test is indicated by development of a yellow color (A); a positive test is indicated by the purple color (B). A control tube not containing lysine is included for color comparisons (C).



Identificación de Enterobacterias por método convencional



Colonias típicas de enterobacterias en VRBGA Tinción de Gram (A), prueba de la catalasa (B) y oxidasa (C) de colonia típica



Modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales: Sistemas Multiprueba

- Consiste en una batería de pruebas simultáneas que:
 - facilita la inoculación del medio
 - disminuye el tiempo de incubación
 - sistematiza la determinación de la especie según las reacciones obtenidas

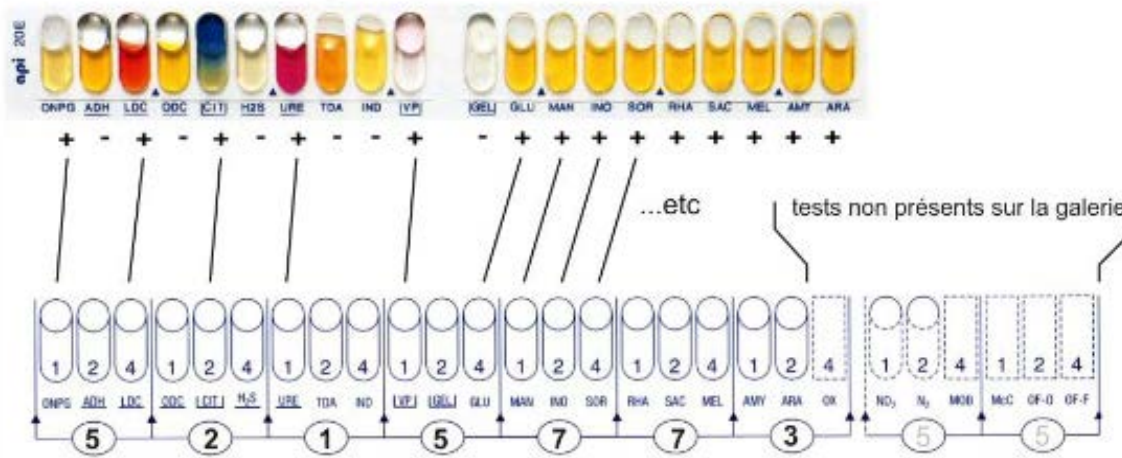
SISTEMAS MULTIPRUEBA MANUALES

API (BioMeriux) Reactivos desecados en cavidades plásticas para todo tipo de microorganismo Ej. **API 20E para enterobacterias**

- Se inocula una suspensión del microorganismo
- Se incuba y se lee cambio de color



Lecture de la galerie API 20E



Code de la souche: 5215773

Ident. *Klebsiella pneumoniae*
ou *Serratia liquefaciens*

Salmonella spp. ISO 6579:2002

Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (UNE-EN ISO 6579:2003).

Medio de Preenriquecimiento

Agua de Peptona Tamponada

Incubación: 37°C durante 18 ± 2 h

Medios de Enriquecimiento

Caldo Rappaport Vassiliadis Soja (RVS)

Incubación: 41,5°C durante 24 ± 3 h

Medio de Aislamiento

Aislamiento en Agar Xilosa Lisina

Desoxicolato (XLD)

y otro agar secundario

escogido por el laboratorio

Incubación: 37°C durante 24 ± 3 h

Confirmación

Confirmación Bioquímica

Agar Tres Azúcares Hierro (TSI)

Agar Urea

Descarboxilación de la Lisina

β-galactosidasa

Voges-Proskauer

Indol

Incubación: 37°C durante 24 ± 3 h

Confirmación Serológica

Confirmación de los antígenos O,

H y Vi

Caldo Tetrionato Muller-Kauffmann
con Novobiocina (MKTn)

Incubación: 37°C durante 24 ± 3 h

Aislamiento en Agar Xilosa Lisina
Desoxicolato (XLD)

y otro agar secundario

escogido por el laboratorio

Incubación: 37°C durante 24 ± 3 h

