

## **PRACTICA 18**

### **AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS:**

#### **COPROCULTIVO**

#### **OBJETIVO:**

Identificar las especies patógenas de las vías gastrointestinales a través del coprocultivo y de sus reacciones bioquímicas

#### **INTRODUCCIÓN**

La porción inferior del intestino tiene una flora bacteriana normal excesivamente amplia. Los microorganismos con mayor prevalencia son los anaerobios ( Bacteroides, bácilos grampositivos, estreptococos), microorganismos entéricos gramnegativos y S. faecalis. Cualquier intento por aislar bacterias patógenas de las heces implica la separación de las especies patógenas, usualmente a través del empleo de medios selectivos diferenciales y de cultivos enriquecidos. Las principales causas de trastornos gastrointestinales agudos incluyen a los virus, las toxinas ( de: estafilococos, vibriones, Escherichia coli tóxigena), bacilos entéricos gramnegativos invasores, los fermentadores lentos de la lactosa, las Shigellas, las Salmonellas y las campilobacterias. La importancia relativa de estos grupos tiene grandes discrepancias en las distintas partes del mundo.

**ESPECIMENES.** Las heces y los raspados rectales son los especímenes de que se dispone con mayor facilidad. Debe anotarse la presencia de sangre, moco o helmintos en la inspección somera inicial. Se suspenden los especímenes en un caldo selectivo como el Caldo de Tetratiónato y se cultivan sobre medios ordinarios así como en medios selectivos diferenciales, por ejemplo Agar EMB, Agar McConkey, Agar S-S, para permitir la separación de los bacilos gramnegativos que no fermentan la lactosa de otras bacterias entericas comunes..

Los frotis teñidos pueden revelar una prevalencia de leucocitos y de ciertos microorganismos anormales como Cándida o estafilococos, pero no pueden utilizarse para diferenciar las bacterias entéricas patógenas de las de la flora normal.

#### **MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO**

\*Muestra de materia fecal en frasco con tapa.

\*Placas estériles de: agar soya tripticaseína, agar EMB, agar endo, agar S-S, agar verde brillante.

\*Tubo de 16 x 150 con 5 ml de caldo tetratiónato.

\*Tubo de 16 x 150 con 5 ml de caldo nutritivo estéril.

\*Mechero, asa, incubadora.

Al día siguiente:

\*Placas con coprocultivo.

\*Equipo de coloración de Gram

\*Serie de tubos de cultivo para pruebas bioquímicas: Agar Kligler, SIM medium, agar citrato de Simmons, agar manitol, caldo urea, caldo dextrosado, caldo V-P, gelatina, leche descremada, etc..

\*Mechero, asa, tina, puente, piseta.

\*Lámpara de alcohol.

## **MÉTODO**

*TOMENSE PRECAUCIONES DE ASEPSIA AL MANIPULAR LOS ESPECIMENES. AL INOCULAR EN LOS TUBOS ES INDISPENSABLE EL USO DE CUBREBOCAS Y GORRA. TRABAJAR SIEMPRE FRENTE A LA FLAMA DEL MECHERO*

### **I) AISLAMIENTO.**

- 1) Sembrar una asada de materia fecal sospechosa en el tubo de caldo de tetracionato. Inocular con asa por emulsión.
- 2) De la misma manera sembrar otra asada de la misma muestra en el tubo de caldo nutritivo.
- 3) Etiquetar con los datos escolares
- 4) Llevar a la incubadora a 37°C durante 24 horas. Colocar los tubos en gradilla de rejilla, de tal manera que se mantengan en posición vertical para evitar que el líquido se derrame.

### **II) RESIEMBRA.**

*AL INOCULAR LAS PLACAS, ES INDISPENSABLE EL USO DE CUBREBOCAS Y GORRA. TRABAJAR FRENTE A LA FLAMA.*

- 1) Retirar los tubos de la incubadora.
- 2) Disponer sobre la mesa una serie de medios selectivos (agar EMB, agar S-S, agar verde brillante y agar soya tripticaseína) para resembrar el cultivo en caldo de tetracionato.
- 3) Disponer sobre la mesa una serie de los mismos medios selectivos para resembrar el cultivo en caldo nutritivo.
- 4) Resembrar en cada una de las placas el inóculo correspondiente por la técnica de estrias cruzadas sectoriales. Usar solo una asada para cada placa.
- 5) Sellar las placas. Etiquetar con los datos escolares
- 6) Llevar las placas a la incubadora. Colocarlas en posición invertida. Mantenerlas durante 24 horas.

Al día siguiente:

- 1) Retirar las placas de la incubadora.
- 2) Efectuar análisis macroscópico de cada una para valoración de la PRUEBA PRESUNTIVA respecto a la

fermentación de la lactosa, de cauerdo a la siguiente:

#### GUIA DE IDENTIFICACION PRESUNTIVA

La prueba presuntiva para diferenciación de los bacilos entéricos gramnegativos se basa en la valoración de la fermentación de la lactosa sobre medios de cultivo adicionados con este carbohidrato, como el agar endo o el agar EMB:

a) Enterobacilos que producen fermentación rápida de la lactosa: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*.

b) Enterobacilos que producen fermentación lenta de la lactosa: *Edwardsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Arizona*, *Providencia*, *Erwinia*.

c) Enterobacilos que no producen fermentación de la lactosa: *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*.

La manera de cómo metabolizan este azúcar en los diferentes medios de cultivo selectivos se manifiestan por cambios en el color del medio con respecto al que originalmente tenía o bien por la coloración de las colonias, la cual es típica en algunos de ellos, al respecto, se sugiere utilizar la siguiente tabla:

| <b>AGAR ENDO O EMB</b>        | <b>AGAR S-S</b>         | <b>VERDE BRILLANTE</b>  |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| COLONIAS CON BRILLO METALICO: | COLONIAS ROJAS:         | COLONIAS VERDES:        |
| <i>Escherichia coli</i>       | <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Otras coliformes              | Otras coliformes        | Otras coliformes        |
| COLONIAS BLANCAS:             | COLONIAS BLANCAS        | COLONIAS ROJAS          |
| <i>Salmonella</i>             | <i>Salmonella</i>       | <i>Salmonella</i>       |
| <i>Shigella</i>               | <i>Shigella</i>         | <i>Shigella</i>         |
| <i>Proteus</i>                | <i>Proteus</i>          | <i>Proteus</i>          |
| <i>Pseudomonas</i>            | <i>Pseudomonas</i>      | <i>Pseudomonas</i>      |

3) Efectuar análisis microscópico por el método de Gram de cada una de las placas para confirmación de la morfología de los bacilos entéricos gramnegativos en los medios selectivos y para búsqueda e identificación de Enterococos en los medios de uso general como el agar soya tripticaseína.

4) Seleccionar en los medios selectivos una variedad de colonias consideradas como sospechosas de pertenecer a algún género patógeno (segundo grupo en la tabla anterior) y resembrarlas en los medios diferenciales para conocer sus REACCIONES BIOQUÍMICAS como se indica a continuación:

### III. REACCIONES BIOQUÍMICAS

1) Disponer a la temperatura ambiente en gradilla una serie doble de tubos de cultivo para reacciones bioquímicas.

2) Resembrar del medio de cultivo que contiene las colonias de bacilos gramnegativos seleccionadas como sospechosas a los medios para bioquímicas dejando uno de uno sin sembrar para emplearlo como control

negativo.

- a) En los medios inclinados sembrar por estrias.
  - b) En los medios verticales sembrar por picadura. asa
  - c) En los medios líquidos sembrar por emulsión.
- 3) Etiquetar con los datos escolares. Llevar a la incubadora por 24 horas.

AL DIA SIGUIENTE:

- 4) Retirar las series de tubos con las reacciones bioquímicas.
- 5) Interpretar las reacciones bioquímicas en cada uno de los tubos, de la siguiente manera.

### 5.1 MEDIO DE KLIGER

El medio contiene sulfato ferroso como indicador de la formación de H<sub>2</sub>S, un indicador de pH, glucosa, lactosa y sacarosa. Se utiliza como medio inclinado y sirve para la valoración de tres parámetros o pruebas bioquímicas:

- a) **Superficie inclinada:** Para la valoración de la fermentación de la lactosa o la sacarosa; lo que origina que el medio tome un color amarillo debido a la formación de ácidos (A).
- b) **Profundidad:** Los bacilos fermentadores de la glucosa forman suficiente ácido para que el medio tome un color amarillo en la profundidad o medio entubado, relativamente anaerobio, pero no en la superficie inclinada. La formación de gases es característica en estas condiciones, lo cual hace que aparezcan burbujas e inclusive desplazamiento del medio hacia la salida del tubo: ( G).
- c) **Sulfuro de hidrógeno ( H<sub>2</sub>S):** Los bacilos productores de este gas hacen que el medio tome un color ennegrecido casi siempre en la profundidad.

### 5.2 AGAR ENDO O AGAR EMB

En estos medios que se usarón para la identificación de la Prueba Presuntiva de fermentación de la lactosa aportan el parámetro para la lactosa (+) o la lactosa (-). Observese en la tabla de reacciones bioquímicas que la lactosa solo es POSITIVA para el primer grupo de Enterobacterias: la E. coli y otras tres especies.

### 5.3 LECHE

La leche descremada constituye un buen medio de cultivo para muchas bacterias, sin otra modificación que añadir un indicador: púrpura de bromocresol o tornasol. Los cambios bioquímicos que puede sufrir son:

- a) **Reacción alcalina:** El cambio de pH a alcalino hará que la leche tome un color púrpura.
- b) Desarrollo de reacción alcalina con precipitación de caseína, como un verdadero requesón, eventualmente con reducción del indicador
- c) Desarrollo de la alcalinidad y precipitación de requesón seguido de peptonización o digestión del mismo. El resultado es el aclaramiento y un color pardusco.

d) Formación de ácido generalmente en 24 horas, con el cambio de color del medio a amarillo; eventualmente con reducción del indicador.

e) Formación de ácido y precipitación de la caseína, generalmente con reducción del indicador.

## 5.4 GELATINA

Se usa para valorar la licuefacción o licuación de la gelatina por acción de las gelatinasas bacterianas producidas por algunas Enterobacterias. La reacción positiva hace que el medio permanezca líquido después de la incubación aún después de dejarse en refrigeración durante media hora. La reacción negativa permite nuevamente la solidificación.

## 5.5 CALDO UREA

Se utiliza para la valoración de la producción de ureasa por algunas enterobacterias. Este medio contiene glucosa, peptona, urea y rojo de fenol. Las bacterias que producen ureasa a partir de la urea dan lugar al carbonato de amonio y el indicador se vuelve rojo púrpura. Obsérvese en la tabla de reacciones bioquímicas que solo el género *Proteus* da esta reacción positiva.

## 5.6 REACCIONES IMViC

Se designan con el término nemotécnico IMViC un grupo de cuatro reacciones bioquímicas que se utilizan para la diferenciación fisiológica de los bacilos coliformes. Si bien hay 16 combinaciones posibles de estas reacciones, el colibacilo clásico *Escherichia coli* es (+), (+), (-), (-) y el grupo *Aerobacter* – *Klebsiella* es (-), (-), (+), (+). Las cuatro reacciones bioquímicas son:

I: Formación de indol a partir de triptófano

M: Prueba del rojo de metilo

V: Prueba de Voges– Proskauer

iC: La utilización del citrato como fuente de carbono

a) **Prueba del Indol (I):** Esta prueba se analiza en el medio de SIM, el cual se utiliza también para investigar la motilidad (M) y la producción de H<sub>2</sub>S (s). Este medio enriquecido con triptófano, aminoácido suministrado por una peptona adecuada que se descompone en indol por acción de algunas bacterias. Para comprobarlo pueden realizarse las pruebas de Erlich o de Kovac's: Se requiere agregar unas gotas de reactivo de Erlich o de Kovac's a la superficie del medio entubado después de que han crecido las colonias. La reacción positiva hará que la solución cristalina adquiera un color rosa fuerte o rojo. De no ocurrir esto la prueba es entonces negativa.

b) **Prueba del rojo de metilo (M):** Los microorganismos se cultivan en caldo peptona glucosa con tapón de fosfato. Después de la incubación se añaden al caldo 4 gotas de indicador rojo de metilo, un color rojo indica una reacción positiva (ácida).

c) **Prueba de Voges. Proskauer (V):** El medio empleado es idéntico al mencionado antes. Después de dos días de incubación se añaden a 5 ml del medio 1 ml de KOH (potasa) al 10 %; se observa de cuando en cuando las 24 horas siguientes. Un color rosa de eosina indica una reacción positiva, debida a la producción de acetilmetilcarbinol (CH<sub>3</sub>– CO– CHOH– CH<sub>3</sub>) a partir de glucosa. Se obtiene una reacción más rápida añadiendo huellas de creatinina al medio incubado y luego 2.5 ml de NaOH al 40%, en este caso el color rosa aparece en pocos minutos.

d) **Prueba del citrato (iC)** Para esta prueba se utiliza el agar de Simmons que contiene citrato de sodio y azul de timol como indicador. La única fuente de carbono en este medio es el citrato. Si la reacción es positiva el indicador se vuelve azul. Los demás microorganismos no crecen y el medio conserva su color verde, indicando una reacción negativa.

## 5.7 MEDIO DE SIM

Este medio se utiliza para tres pruebas bioquímicas como ya se mencionó anteriormente: la del sulfuro de hidrógeno (S) de la misma manera que en el agar Kligler, la del indol (I) y la motilidad (M).

La motilidad (M) a través del medio semisólido se traduce por diseminación de la opacidad bacteriana a partir del trayecto de la picadura de inoculación (reacción positiva). Si la motilidad es negativa, el crecimiento se encuentra restringido al trayecto de la picadura.

## 5.8 MEDIOS CON DESCARBOXILASA:

Se logra una mejor diferenciación entre las **Enterobacteriaceae** estudiando la actividad específica de descarboxilasa sobre una serie de ácidos aminados como lisina, arginina y ornitina. Los medios medios contienen una base nutritiva, además de glucosa, el ácido aminado del caso y el azul de bromotimol como indicador. Si el ácido aminado es descarboxilado, el pH del medio se vuelve alcalino, a pesar de la fermentación de la glucosa, pues los productos de la descarboxilación son siempre alcalinos. Si no existe esta reacción, el medio permanece ácido y conserva su color amarillo.

6) Recopilar en forma horizontal los resultados de todas las pruebas bioquímicas y ubicarlos en la tabla de reacciones bioquímicas anexa a esta práctica para definir exactamente la especie de los bacilos entéricos aislados.

7) Cuando se halla concluido el estudio del coprocultivo, proceder a esterilizar al autoclave las placas y los tubos del cultivo de la manera establecida. lavarlos y secarlos.

## REPORTE

1) Describir el análisis macroscópico del agar endo o EMB. Indicar el resultado de la prueba presuntiva de la lactosa.

2) Describir el análisis macroscópico de los otros medios selectivos empleados.

3) Describir el análisis macroscópico del agar nutritivo

4) Describir el análisis microscópico de cada placa.

5) Representar los resultados de cada una de las reacciones bioquímicas.

6) Localizar en la tabla de reacciones bioquímicas el agente etiológico aislado.

7) Incluir en forma de anexo una tabla de reacciones bioquímicas para Enterobacterias.