

Kit para Pruebas Bioquímicas

USO

Medio MIO es utilizado para diferenciar enterobacterias con base a su movilidad y en su capacidad para descarboxilar la ornitina y la producción de indol.

Agar Hierro y Lisina (LIA) es utilizado para la diferenciación de microorganismos entéricos especialmente *Salmonella* con base a la descarboxilación o desaminación de lisina y producir sulfuro de hidrógeno.

Agar Urea de Christensen es utilizado para identificar Enterobacterias en base a la producción de ureasa.

Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI) es un medio utilizado para diferenciar Enterobacterias con base a la fermentación de lactosa, glucosa, sacarosa y a la producción de H₂S.

Agar Citrato de Simmons (ACS) es un medio utilizado para el crecimiento y diferenciación bioquímica de enterobacterias que tienen la capacidad de utilizar el citrato como fuente de carbono.

EXPLICACIÓN

Medio MIO, es un medio de cultivo semisólido altamente nutritivo, también es conocido como Medio para Movilidad Indol y Ornitina. Ederer, Clark, Oberhofer y Hajkowski formularon este medio con el propósito de diferenciar Enterobacterias, basándose en la Movilidad, la producción de Indol y descarboxilación de la Ornitina. La Peptona de gelatina y caseína proveen nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales necesaria para el desarrollo de los microorganismos. Las peptonas también proveen triptófano necesario para la producción de indol. El extracto de levadura es fuente de vitaminas del complejo B para estimular el crecimiento bacteriano. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que provee carbono y energía. La ornitina es el sustrato para la detención de la enzima ornitina descarboxilasa, como indicador de pH se adiciona púrpura de bromocresol. El indol se produce a partir del triptófano por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa, después de agregar 2 a 3 gotas de reactivo de Kovacs, un color rojo indica un resultado positivo. El agar es adicionado para demostrar la movilidad que puede observarse por un enturbiamiento del medio o por un crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación.

Agar Hierro y Lisina es utilizado para la identificación de *Salmonella* spp. debido a que la mayoría son sulfuro de hidrogeno positiva y lisina descarboxilasa positivas. De la misma manera este medio permite detectar especies de *Proteus* spp. y *Providencia* spp. que desaminan los aminoácidos y su crecimiento se aprecia de color rojo en el medio. Edwards y Fife encontraron que este medio diferencia a los bacilos entéricos en base a su capacidad para descarboxilar o desaminar la lisina y producir H₂S. En el medio de cultivo los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano son aportados por la peptona y el extracto de levadura, la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. El citrato de hierro y amonio junto con el tiosulfato de sodio son los indicadores de la producción de H₂S. La L-lisina es adicionada para detectar la presencia de enzimas descarboxilasa y desaminasa. El púrpura de bromocresol es el indicador de pH. El agar es adicionado como agente solidificante.

Agar Urea de Christensen es utilizado para detectar la actividad de ureasa, permite diferenciar entre producción rápida de ureasa-positiva por *Proteus* y otros organismos ureasa-positiva de la familia Enterobacteriaceae. Las especies de Enterobacter pueden utilizar la urea como única fuente de nitrógeno. El medio de Christensen elimina la necesidad del microorganismo de utilizar los derivados de la urea (amoníaco) como su única fuente de nitrógeno y permite la detección de la hidrólisis de la urea.

En este medio de cultivo, las peptonas y dextrosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH.

Agar Hierro y Triple azúcar es una fórmula desarrollada por Hajna quien agregó sacarosa al Agar Hierro de Kligler. Agar TSI contiene tres carbohidratos (dextrosa, lactosa y sacarosa). La fermentación de carbohidratos es detectada por la presencia de gas y un cambio de color de rojo a amarillo de pH del indicador rojo fenol. La formación de ácido en la base del tubo se debe a que la lactosa y la sacarosa se encuentran presentes en concentraciones mucho más elevadas que la dextrosa. Mientras que la formación de ácido a partir de la dextrosa es suprimida por la rápida oxidación de una pequeña cantidad de ácido en el área inclinada del tubo, lo que genera una reacción de pH neutro o alcalino (color rojo) cuando se fermenta sólo dextrosa. La sacarosa añadida permite diferenciar determinados organismos coliformes y las especies *Proteus* que pueden fermentar la sacarosa, pero no la lactosa. Con un pH neutro o alcalino, el ácido sulfhídrico (producido por el tiosulfato sódico) reacciona con la sal de amonio ferroso, lo que produce un precipitado de color negro. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio y el agar bacteriológico es el agente solidificante.

Agar Citrato de Simmons Koser desarrollo un medio que permite la diferenciación de coliformes fecales. Los coliformes fecales no fueron capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono ni a las sales de amonio como fuente de nitrógeno. Los coliformes no-fecales pueden utilizar el citrato en este medio dando una reacción alcalina. Simmons modifico la fórmula adicionando agar y azul de bromotimol como indicador de pH, en el medio el citrato sirve como fuente de carbono, las sales de amonio como fuente de nitrógeno, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar bacteriológico sirve como agente solidificante y el sulfato de magnesio sirve como cofactor de reacciones metabólicas.

Los microorganismos que no pueden utilizar el citrato no presentan cambios en el medio.

FÓRMULA POR LITRO

Medio MIO

Peptona de gelatina	10.0 g	Dextrosa	1.0 g
Peptona de caseína	10.0 g	Purpura de bromocresol	0.02 g
Extracto de levadura	3.0 g	Agar bacteriológico	2.0 g
L-Ornitina	5.0 g		

pH 6.5 ± 0.2 a 25°C

Agar Hierro y Lisina

Peptona de Gelatina	5.0 g	Tiosulfato de sodio	0.04 g
Extracto de Levadura	3.0 g	Citrato de hierro y amonio	0.50 g
Dextrosa	1.0 g	Purpura de Bromocresol	0.02 g
L-Lisina	10.0 g	Agar Bacteriológico	13.5 g

pH 6.7 ± 0.2 a 25°C

Agar Urea de Christensen

Peptona de gelatina	1.0 g	Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato Monopotásico	2.0 g	Rojo de fenol	0.012 g
Dextrosa	1.0 g	Urea	20.0 g

pH 6.8 ± 0.2 a 25°C

Agar Hierro y Triple Azúcar

Peptona de Caseína	10.0 g	Sacarosa	10.0 g
Peptona de carne	10.0 g	Citrato de Hierro y Amonio	0.3 g
Extracto de Carne	3.0 g	Cloruro de Sodio	5.0 g
Extracto de Levadura	3.0 g	Tiosulfato de Sodio	0.3 g
Dextrosa	1.0 g	Rojo de Fenol	0.025 g
Lactosa	10.0 g	Agar Bacteriológico	12.0 g

pH 7.4 ± 0.2 a 25°C

Agar Citrato de Simmons

Fosfato dibásico de amonio	1.0 g	Sulfato de magnesio	0.2 g
Fosfato dipotásico	1.0 g	Azul de bromotimol	0.08 g
Cloruro de sodio	5.0 g	Agar bacteriológico	15.0 g
Citrato de sodio	2.0 g		

PREPARACIÓN

MEDIO MIO

Método

Suspender 31.1 gramos del medio en un litro de agua. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para su completa disolución. Dispensar en tubos, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar en posición vertical.

Procedimiento

1. Inocular cada tubo por picadura en el centro hasta las 2/3 partes, de acuerdo a los procedimientos establecidos.
2. Incubar en condiciones aeróbicas con las tapas flojas a 35± 2°C.
3. Examinar los tubos de 18 a 24 h para crecimiento, movilidad y cambio de color.

Interpretación de resultados

- Cambio de color en el medio de cultivo de púrpura a amarillo, indica descarboxilación de la ornitina negativa.
- Sin cambio de color en el medio o color púrpura intenso indica descarboxilación de la ornitina positiva.
- La movilidad positiva se muestra con turbidez en el medio.
- Movilidad negativa solo hay crecimiento en la picadura.
- La producción de indol positiva se observa por la formación de un anillo color rosa a rojo que aparece al adicionar de 3 a 4 gotas de reactivo de Kovacs, sin cambio de color es una reacción negativa.
- Sí la reacción de indol es negativa, incubar por 24 h.

Agar Hierro y Lisina (LIA)

Método

Suspender 33 gramos del medio en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para su completa disolución. Dispensar en tubos, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar en posición inclinada.

Procedimiento

1. A partir de una colonia aislada sembrar el medio desde el fondo del tubo y por estría en la superficie
2. Incubar en condiciones aeróbicas a 35 ± 32°C de 18- 48 h.

Agar Urea de Christensen

Método

Suspender 29 gramos del medio en un litro de agua destilada. Esterilizar por filtración. Por separado disolver 15 gramos de Agar y hervir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y adicionar 100mL de base de Agar Urea, mezclar y vaciar en tubos estériles, dejar solidificar en posición inclinada.

Procedimiento

1. A partir de un cultivo puro de 18-24 horas estríar la superficie del pico de la flauta.
2. Incubar en condiciones aeróbicas a 35 – 37 °C durante 24 h. Algunos microorganismos pueden requerir mayor tiempo de incubación.

Agar Hierro y Triple Azúcar

Método

Suspender 65 gramos del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para su completa disolución. NO SOBRECALENTAR. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en tubos de rosca estériles dejar solidificar en posición inclinada.

Procedimiento

1. Inocular cada tubo por estría en la superficie y por picadura en el centro hasta las 2/3 partes el medio de cultivo, de acuerdo a procedimientos internos de laboratorio.
2. Incubar en condiciones aeróbicas con las tapas flojas a 35± 2°C.
3. Examinar los tubos de 18 a 24 h para crecimiento y reacciones.

Agar Citrato de Simmons

Método

Suspender 24.2 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para su completa disolución. NO SOBRECALENTAR. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos vaciar en tubos enfriar en posición inclinada.

Procedimiento

1. Inocular los tubos de acuerdo a los procedimientos internos de laboratorio.
2. Incubar en condiciones aeróbicas los tubos con las tapas flojas a 35 + 2°C de 24 a 48 horas.

CARACTERÍSTICAS

El crecimiento y reacciones se describen en las siguientes tablas:

Medio MIO

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	MOVILIDAD	INDOL	ORNITINA
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	Bueno	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	Bueno	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhi	19430	Bueno	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Bueno	+	-	+

(+) positivo , (-) negativo

Agar Hierro y Lsina

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	SUPERFICIE	FONDO	H ₂ S
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	Bueno	K	A	+
<i>Proteus vulgaris</i>	8427	Bueno	R	A	-
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurim	14028	Bueno	K	K	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13383	Bueno	K	K	-
<i>Serratia marcescens</i>	8100	Bueno	K	K	-
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	K	K o N	-

A= Ácido (Amarillo) K= Alcalino (Púrpura) R= Rojo N= Neutro (Gris azulado)
H₂S (+) = Precipitado negro

Agar Urea de Christensen

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	UREASA
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	-
<i>Salmonella entérica</i> serotipo Typhimurium	14028	Bueno	-
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Bueno	+
<i>Proteus vulgaris</i>	13315	Bueno	+

Prueba positiva: (+) cambio de color del medio de naranja a rosa intenso debido a la producción de ureasa
Prueba negativa: (-) el medio permanece naranja

Agar Hierro y Triple Azúcar

MICROORGANISMOS	ATCC	ATCC	Superficie	REACCIÓN		
				Fondo	H ₂ S	Gas
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Bueno	K	A	+	+ (-)
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	A	A	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	12022	Bueno	K	A	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	13315	Bueno	A	A	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Bueno	K	K	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Bueno	K	A	+	+

A= Acido (Amarillo) K= Alcalino (Rojo) Producción de H₂S= Precipitado negro,
Producción gas= presencia de burbujas o desplazamiento del medio

Agar Citrato de Simmons

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	REACCIÓN
<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición parcial o total	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	Bueno	Alcalina (azul)
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Bueno	Alcalina (azul)
<i>Shigella dysenteriae</i>	13313	Inhibido	-

PRESENTACIÓN Y ALMACENAMIENTO

CAT. No	PRESENTACIÓN	ALMACENAMIENTO
7975	Medio preparado en Tubo (Caja/10 tubos con 5 mL de medio hidratado)	2-8°C



BIBLIOGRAFÍA

1. Ederer, G.M., and M. Clark. 1970. Motility – Indole –Ornitine medium. *Apple Microbiol.* 2:849.
2. Oberhofer, T.T., and T. Hajkowsky. 1970. Evaluation of non-lactose-fermenting members of *Klebsiella* –*Enterobacter*–*Serratia* Division. I. *Biochemical characteristics.* *Am J. Clin. Pathol.* 4:720.
3. Ewing, W.H. 1986. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc, New York, N.Y.
4. Kriek, N.R., and J.G. Holt (ed.). 1984. *Begey's manual of systematic bacteriology*, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
5. Mac Faddin J.F. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* Ed. Médica Panamericana. Págs. 850.
6. Alarcón R. L. 2004. *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos.* Ed. UACJ Págs. 106.
7. Centros Hospitalarios de Alta Resolución de Andalucía. *Temario Específico de Técnico Especialista de Laboratorio Volumen 1.* Ed. MAD-Eduforma. Págs. 558
8. *Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos.* Test. E-book. Ed. MADEduforma. Págs. 250.
9. Hajna, A. A. 1945. Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. *J. Bacteriol.* 49:516-517.
10. Kligler, I. J. 1918. Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery, and allied bacilli. *J. Exp. Med.* 28:319-322.
11. Edwards and Fite *Applied Microbiol.* 9:478, 1961. *Edwards and Ewing. Identification of Enterobacteriaceae.* Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn. 1962.
12. Rouff, Whiey and Beighton. 1999. In Murray, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover (ed.), *Manual Clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Isenberg (ed.), 1992. *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1 American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Koneman, E., Allen, S. 2008. *Koneman diagnostic microbiology: texto y atlas a color.* Ed. Médica panamericana. Págs. 1691.
15. MacFaddin, J.F. 1985. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
16. MacFaddin, J.D., 2000. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* 3a edición Williams & Wilkins Baltimore.
17. Christensen J. *Bact.* 52:641. 1946. Thal and Chen *J. Bact.* 69:10. 1955. *Ewing Enterobacteriaceae.* USPHS, Publication 734.
18. Mac Faddin J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* Ed. Médica Panamericana, 2003.
19. Koneman, E., Allen, S. 2008. *Koneman diagnostic microbiology: texto y atlas a color.* Ed. Médica panamericana. Pág. 210.
20. Mac Faddin J. F. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* Ed. Médica Panamericana. Pág. 95
21. Prats P.G. 2006. *Microbiología Clínica.* Ed. Médica Panamericana. Págs. 42 y 208