

**Otras reacciones  
metabolicas útiles para la  
identificación bacteriana**

## Prueba de utilización del citrato de Simmons

- **Utilidad de la prueba:** Identificación de especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, otros bacilos gramnegativos relacionados y no fermentadores de carbohidratos

- **Fundamento:** El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto simple que es uno de los metabolitos producidos en el ciclo de Krebs. Algunas bacterias pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento. Generalmente, los medios de cultivo empleados para la prueba de utilización del citrato (Anexo 16) contienen citrato de sodio como única fuente de carbono, y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar el citrato pueden también utilizar el amonio como fuente de nitrógeno, lo que resulta en la producción de amoníaco ( $\text{NH}_3^+$ ) y la alcalinización del medio debido a la conversión del  $\text{NH}_3^+$  en hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), produciéndose un viraje del indicador azul de bromotimol de verde a azul, lo que indica una reacción positiva (Fig. 33a). Si el microorganismo no utiliza el citrato no se produce cambio en el color del medio, es decir, permanece verde (Fig. 33b).

---

### Prueba de citrato de Simmons.

---



## Prueba de la oxidasa

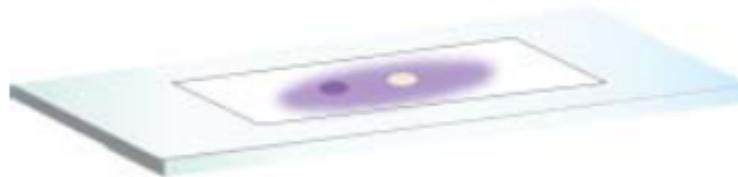
- **Utilidad de la prueba:** es de gran utilidad para diferenciar las enterobacterias, la mayoría, negativas (excepto *Plesiomonas shigelloides*), de otras bacterias de importancia clínica como las pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Vibrio* (oxidasa positiva); también es útil para diferenciar *Neisseria* y *Moraxella* (oxidasa positiva) de *Acinetobacter* (oxidasa negativa).

- **Fundamento:** esta prueba se basa en la producción bacteriana de una enzima citocromo oxidasa intracelular, la cual transfiere electrones al oxígeno, aceptor final en la cadena transportadora de electrones de ciertos microorganismos. El dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% es el colorante utilizado en esta prueba y actúa como sustituto del oxígeno, es decir, como aceptor artificial de electrones. En su estado reducido el reactivo es incoloro, en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico, el reactivo es oxidado a azul de indofenol que es un compuesto coloreado (púrpura) lo cual indica una reacción positiva (Fig. 35).

---

### Prueba de oxidasa

---



---

Izquierda: reacción positiva, derecha: reacción negativa.

## Prueba de catalasa:

- **Utilidad de la prueba:** Se utiliza para diferenciar cocos grampositivos de importancia médica específicamente el género *Staphylococcus* (catalasa positivos) de *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativos) y ayuda a la diferenciación de algunas especies de microorganismos grampositivos y gramnegativos.

- **Fundamento:** El peróxido de hidrógeno constituye unos de los productos finales del metabolismo oxidativo de los carbohidratos, su acumulación en las células bacterianas puede ser letal para las mismas por lo que su descomposición y eliminación es vital para muchos microorganismos, los cuales producen la enzima catalasa (hemoproteína) que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. La liberación del oxígeno se evidencia por la rápida y vigorosa aparición de burbujas lo cual se interpreta como una prueba positiva (Fig. 36). La reacción de descomposición por la enzima catalasa se muestra a continuación:



### **FIGURA 36**

#### **Prueba de catalasa.**

---



## Prueba de coagulasa

- **Utilidad de la prueba:** Se utiliza para diferenciar especies del género *Staphylococcus*, específicamente *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) del resto de las especies (coagulasa negativa).

- **Fundamento:** La coagulasa es una enzima que posee actividad similar a la de la protrombina y es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina lo cual resulta en la formación de un coágulo visible a simple vista. La enzima presente en los microorganismos puede encontrarse de dos maneras diferentes, la forma libre y la ligada, teniendo cada una de ellas propiedades diferentes por lo que su detección requiere de distintos procedimientos.

La coagulasa ligada se detecta por el método del portaobjeto. Esta enzima está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivo. Cuando las células bacterianas son resuspendidas en una porción de plasma, las fibrillas de fibrina que se forman entre las células provocan la aglutinación de las mismas lo que resulta en la aparición de agregados visibles a simple vista.

La coagulasa libre está presente en los filtrados de cultivo y se detecta por el método del tubo de ensayo. Cuando en un tubo de ensayo se mezcla una cierta cantidad de plasma con una suspensión de un cultivo bacteriano productor de coagulasa libre, después de unas horas de incubación se puede observar la formación de un coágulo

## Prueba de coagulasa

---



## Determinación de hemolisinas

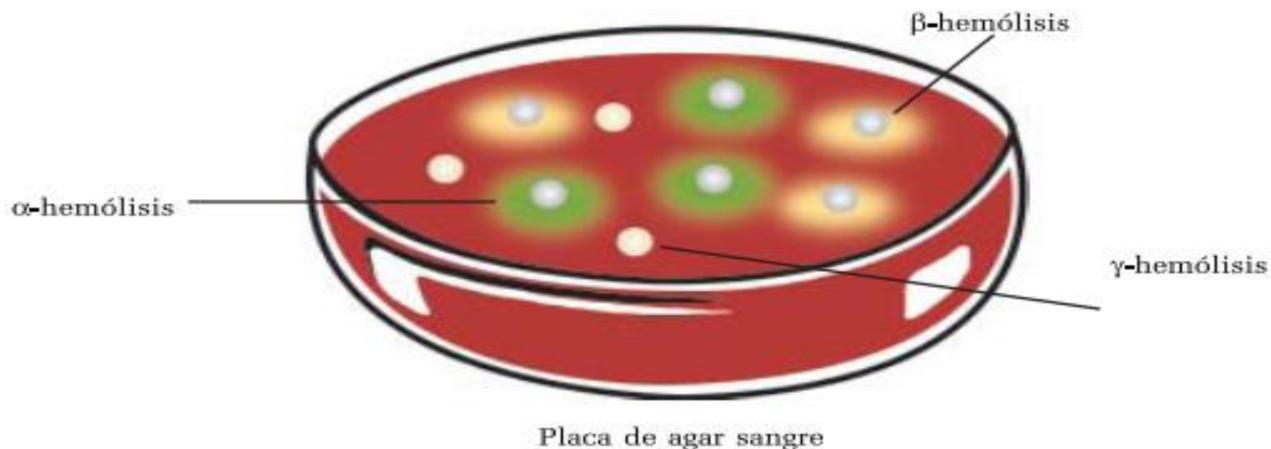
- **Utilidad de la prueba:** Se utiliza para diferenciar especies de distintos géneros como *Streptococcus*, *Enterococcus*, enterobacterias, algunos bacilos gramnegativos no fermentadores, *Staphylococcus*, entre otras.

- **Fundamento:** Las hemolisinas son proteínas citolíticas producidas por algunos microorganismos. Pueden destruir parcial o totalmente a los eritrocitos pero muchas tienen también actividad sobre otras células distintas a los glóbulos rojos. Se clasifican en  $\alpha$ -hemolisinas y  $\beta$ -hemolisinas. Las  $\alpha$ -hemolisinas producen una lisis parcial de los eritrocitos mientras que las  $\beta$ -hemolisinas los lisan totalmente. En placas de agar sangre los microorganismos productores de  $\alpha$ -hemolisinas crecen formando colonias que presentan a su alrededor un halo verdoso y un aclaramiento parcial de la sangre, mientras que los microorganismos con actividad  $\beta$ -hemolítica, desarrollan colonias rodeadas de halos completamente claros. Cuando el microorganismo no produce ningún tipo de hemólisis se le denomina  $\gamma$ -hemolítico (Fig. 38).

---

### Patrones de hemólisis

---



### g) Producción de pigmentos

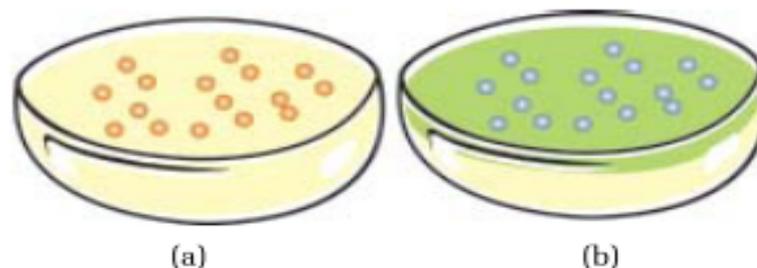
- **Utilidad de la prueba:** Se utiliza para diferenciar microorganismos cromogénicos.

• **Fundamento:** Los pigmentos pueden dividirse en dos tipos básicos: los solubles en agua y los insolubles. Si un pigmento es insoluble en agua, como es el caso de la mayoría de las bacterias cromogénicas, dicho pigmento no difundirá fuera del microorganismo. En consecuencia, las colonias serán pigmentadas pero el agar mantendrá su color original (Fig. 39a). En este caso hablamos de un pigmento no difusible o endopigmento. Si por el contrario, el pigmento es soluble en agua (como en *Pseudomonas aeruginosa*) el mismo difundirá fuera del microorganismo y tanto las colonias como el agar serán pigmentados, en este caso hablamos de exopigmento (Fig. 39b).

---

### Producción de pigmentos.

---



## | Prueba de la bilis-esculina

- **Utilidad de la prueba:** ayuda a la identificación y diferenciación de especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* del grupo D, *Aeromonas*, *Fusobacterium*, *Listeria*, entre otros microorganismos.

- **Fundamento:** Las bacterias en primer lugar deben ser capaces de desarrollarse en presencia de sales biliares y producir la enzima esculinasa que produce la hidrólisis de la esculina dando como resultado la formación de glucosa y un compuesto denominado esculetina, éste a su vez reacciona con los iones férricos (aportados por el citrato férrico, Anexo 18) para

formar un complejo fenólico férrico de color castaño oscuro o negro que se difunde, lo cual se interpreta como una reacción positiva (Fig. 40a). Mientras que si el microorganismo no produce la enzima esculinasa no se produce alteración del medio (Fig. 40b).

---

### Prueba de la bilis-esculina.

---

