



**INEI**  
Instituto Nacional de  
Enfermedades Infecciosas  
"Dr. Carlos G. Malbrán"



**ANLIS  
MALBRÁN**  
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS  
E INSTITUTOS DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRÁN"

# Manual de procedimientos Identificación fenotípica de cocos gram positivos catalasa negativa.

Edición 2022

**Prieto Mónica**

**Rocca MF**

**Cipolla L**

**Armitano R**

**INEI, Servicio Bacteriología Especial**

Bs. As, junio 2022

CITA RECOMENDADA:

Prieto, Mónica A; Rocca, María Florencia; Cipolla, Lucía; Armitano, Rita. Manual de procedimientos: Identificación fenotípica de cocos gram positivos catalasa negativa. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: ANLIS Dr.C.G.Malbrán, 2022.

Disponible en: <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/2432>

**“Este recurso es el resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley Nº 26.899 y la política de gestión del conocimiento de la ANLIS”.**



[Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

# **Manual de procedimientos**

## **Identificación fenotípica de cocos gram positivos catalasa negativa**

**Bs. As. Argentina, Junio 2022.**

## TABLA DE CONTENIDO O ÍNDICE

<b>TABLA DE CONTENIDO O ÍNDICE</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5-7</b>
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES</b>	<b>7-10</b>
<b>PRINCIPIOS DE LA IDENTIFICACIÓN</b>	<b>10-12</b>
<b>ALGORITMOS Y TABLAS DE IDENTIFICACIÓN</b>	
<b>ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLÍTICOS</b>	<b>13-14</b>
<b>GENEROS <math>\alpha</math> O NO HEMOLÍTICOS SENSIBLES A VANCOMICINA</b>	<b>14-16</b>
<b>GENEROS <math>\alpha</math> O NO HEMOLÍTICOS RESISTENTES A VANCOMICINA</b>	<b>17-18</b>
<b>ESTREPTOCOCOS <math>\alpha</math> O NO HEMOLÍTICOS</b>	<b>17, 19-20</b>
<b>MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>30-34</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>34-35</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El nombre del género *Enterococcus*, anteriormente llamado *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium*, fue descrito en 1984 cuando otras bacterias fueron transferidas al género. Ahora hay más de 50 especies reconocidas del género *Enterococcus*. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son los enterococos más frecuentemente aislados de infecciones humanas.

El género *Streptococcus* comprende un gran número de especies comensales y patógenas. Con el rápido desarrollo de métodos moleculares para identificación, el género *Streptococcus* ha sido objeto de una importante expansión y revisión. Ahora hay más de 100 especies reconocidas de *Streptococcus*, muchos de los cuales son patógenos o comensales en humanos y animales. ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net))

Otros géneros de cocos gram positivos catalasa negativa han sido asociados a infecciones en humanos. ***Abiotrofia*** y ***Granulicatella***, (anteriormente denominados estreptococos variantes nutricionales) son cocos gram positivos que crecen como colonias "satélite" alrededor de otros organismos. Son catalasa y oxidasa negativos, facultativamente anaeróbicos e inmóviles. Forman parte de la microbiota de los tractos urogenital e intestinal humanos y han aislado de muestras de sangre, abscesos, úlceras orales y uretra. El reconocimiento de estas especies es importante para las infecciones invasivas (en particular, la endocarditis) para garantizar la terapia antimicrobiana más adecuada. A menudo se asocian con hemocultivos negativos.

Hay 7 especies de ***Aerococcus***, de las cuales 5 son patógenas y causan infecciones tanto del tracto urinario como invasivas (incluida la endocarditis infecciosa) en humanos. Estos son *A. christensenii*, *A. sanguinicola*, *A. urinae*, *A. urinaehominis* y *A. viridans*. Algunas cepas pueden dar una reacción débil de catalasa o pseudocatalasa. Las colonias son pequeñas (1 mm o menos), no pigmentadas (ocasionalmente producción de pigmento amarillo por cepas de *A. viridans*) y muestran  $\alpha$ -hemólisis. Todos los organismos pueden crecer bien en NaCl al 6,5%. *Aerococcus* spp puede ser identificado erróneamente debido a las similitudes entre los estafilococos (disposición microscópica, pseudocatalasa), los estreptococos viridans ( $\alpha$  hemólisis y morfología de colonia) y los enterococos (desarrollo en NaCl 6.5%).

***Facklamia***: Hay 7 especies de las cuales 4 son patógenas para los humanos: *F. hominis*, *F. languida*, *F. sourekii* y *F. ignava*. La especie patógena humana más común es *Facklamia hominis*. Las especies de *Facklamia* se asemejan a los estreptococos "viridans" en cultivo. Son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos, oxidasa negativos, LAP positivos, inmóviles que se presentan en pares, grupos o cadenas. Las especies de *Facklamia* a menudo se identifican

erróneamente como estreptococos viridans, la diferencia clave entre ambos organismos es que las especies de *Facklamia* son positivas para PYR.

**Gemella:** Actualmente hay 9 especies de *Gemella*. Son de crecimiento lento, catalasa negativas, inmóviles, anaerobias facultativas, cocos Gram variables, dispuestas en pares, tétradas, grupos y, a veces, cadenas cortas. Algunas cepas se decoloran fácilmente con la tinción de Gram y aparecen como Gram negativas. Además, algunas cepas pueden requerir condiciones estrictamente anaeróbicas para el aislamiento primario y volverse aerotolerantes después de transferirlas a medios de laboratorio. Las colonias son similares a la de los de estreptococos viridans. Crecen mejor a 35 y 37°C pero no crecen a 10 o 45°C. Suelen ser PYR y LAP positivos. En algunos sistemas comerciales de identificación, los estreptococos viridans pueden identificarse erróneamente como especies de *Gemella*.

**Globicatella:** Hay 2 especies de *Globicatella* pero la especie que está implicada en infecciones humanas es *G. sanguinis*. Las colonias son similares a la de los de estreptococos viridans. Microscópicamente se disponen como cocos que se presentan solos, en pares o en cadenas cortas. El crecimiento ocurre en caldo que contiene 6,5% de NaCl. *Globicatella* se pueden distinguir de los aerococos por su morfología celular. Los aerococos forman pares y tétradas mientras que las especies de *Globicatella* forman cadenas cortas de cocos.

**Helcococcus:** *Helcococcus kunzii* es la especie tipo del género. Microscópicamente se disponen en grupos o pares irregulares, tétradas y racimos y forman pequeñas colonias no hemolíticas puntiformes en agar sangre después de 48 h de incubación a 35 y 37 °C. Son de crecimiento lento y aparecen como estreptococos viridans en placas de agar con sangre y pueden ser difíciles de cultivar en un medio que no sea sangre. Suelen ser no hemolíticos. Esto los diferencia de los aerococos que forman colonias más grandes rodeadas por una gran zona de hemólisis  $\alpha$  después de la incubación. *H. kunzii* produce pequeñas colonias grises no hemolíticas; el crecimiento se estimula mediante la adición de suero o Tween 80 al medio basal.

Las especies de **Lactococcus** son fisiológicamente similares a las especies de *Enterococcus* y se han identificado erróneamente debido a sus características similares tanto a los estreptococos como a los enterococos. Son cocos Gram positivos inmóviles, anaerobios facultativos. Habitan animales y plantas y productos derivados. Rara vez se han aislado de casos humanos del tracto urinario, infecciones de heridas y de pacientes con endocarditis.

**Leuconostoc** son cocos que se presentan en pares y cadenas, son intrínsecamente resistentes a la vancomicina y producen CO<sub>2</sub> a partir de la glucosa. Pueden confundirse con los enterococos porque la mayoría de las especies de *Leuconostoc* son positivas para la bilis esculina y algunas pueden

reaccionar de forma cruzada con los antisueros del grupo D. Son patógenos oportunistas y han sido asociados a meningitis y bacteriemia.

Las especies de *Pediococcus* pueden parecerse a los estreptococos viridans en cultivo, pero microscópicamente son similares a los estafilococos. Son cocos Gram positivos que aparecen en pares, grupos y tétradas y son intrínsecamente resistentes a la vancomicina y moderadamente sensibles a los agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos. Todas las cepas son inmóviles y aparecen como no hemolíticas o  $\alpha$ -hemolíticas en la placa de agar sangre. Pueden confundirse con los enterococos porque son positivos para la bilis esculina y reaccionan de forma cruzada con los antisueros del grupo D.

**Vagococcus:** Las células tienen forma de coco u ovalada y se presentan solas, en pares o en cadenas. La especie tipo es *Vagococcus fluvialis* que, puede reaccionar con los antisueros del grupo N de Lancefield. Además, algunos aislamientos pueden dar una reacción débil con el antisuero del grupo D de Lancefield y pueden confundirse con algunos enterococos. Los vagococos se aíslan de diferentes fuentes, principalmente de animales o productos y hábitats relacionados con animales y muy raramente de muestras clínicas humanas.

Otros géneros mencionados en este manual, como *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Ignavigranum*, *Dolosicoccus*, etc., son realmente infrecuentes.

## 2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los estreptococos son bacterias facultativamente anaeróbicas, pero algunas requieren CO<sub>2</sub> para crecer. El metabolismo de los carbohidratos es fermentativo y el ácido láctico es el principal producto del metabolismo. Los estreptococos producen la enzima leucina aminopeptidasa (LAP), que también se denomina leucina arilamidasa. La temperatura de crecimiento varía entre las especies, pero la temperatura óptima suele ser de aproximadamente 37°C.

El crecimiento de estreptococos en medios sólidos se puede mejorar mediante la adición de sangre, suero o glucosa. En agar sangre, las especies exhiben varios grados de hemólisis, que se puede utilizar como un paso inicial en la identificación de aislados clínicos. Las hemólisis producida por las colonias en agar sangre y la agrupación serológica de Lancefield son marcadores importantes para la identificación presuntiva, sin embargo, hay muchas características superpuestas, por lo tanto, el análisis genético es un método más definitivo para la identificación.

## 2.1. Hemólisis en agar sangre:

- $\alpha$ -hemólisis: lisis incompleta o parcial de los glóbulos rojos alrededor de la colonia causando un color verde o marrón que rodea la colonia
- $\beta$ -hemólisis: lisis completa de los glóbulos rojos que rodean una colonia que causa un halo transparente alrededor de la colonia en agar sangre
- no hemolítico (anteriormente llamado  $\gamma$ -hemólisis) – sin cambio de color ni aclaramiento del medio

La expresión del hemólisis depende de varios factores:

(1) El tipo de sangre con la que se prepara el medio. Si bien se ha utilizado sangre humana, ovina, bovina, equina o de conejo, al registrarse diferencias se adoptó universalmente el uso de la sangre ovina. (2) El medio basal con que se prepara el agar sangre. Debe ser un medio sin carbohidratos como el agar tripteína de soja o agar Columbia. NO deben usarse agar infusión cerebro corazón (contiene glucosa) ni agar Mueller Hinton (contiene almidón). Las bacterias producen metabolitos ácidos al utilizar carbohidratos como fuente de carbono, por lo tanto, se produce un descenso del pH que puede inhibir la actividad de las hemolisinas. 3) La atmósfera de incubación. La hemólisis de mayor intensidad se observa cuando se incuban las placas en anaerobiosis. Sin embargo, los costos son más elevados y algunas especies  $\alpha$ -hemolíticas como *S. pneumoniae* pueden aparecer como  $\beta$ -hemolíticas, sesgando la identificación. Algunos autores sugieren que la microaerobiosis es la atmósfera ideal para la expresión de las hemolisinas, sin embargo, no parecería haber diferencias significativas en incubar las placas en aerobiosis.

## 2.2. Grupos de Lancefield

Los estreptococos  $\beta$ -hemolíticos se caracterizan además mediante el serogrupo de Lancefield, que describe el carbohidrato antigénico específico del grupo que está presente en la pared celular bacteriana. Hay 20 serotipos descritos, denominados grupos de Lancefield A a V (excluyendo I y J). La serotipificación de Lancefield es útil en la identificación de *Streptococcus*; sin embargo, debe usarse junto con otras pruebas para obtener una identificación precisa. La agrupación de Lancefield se puede utilizar para validar los resultados de otros métodos de identificación. Especies como *S. pneumoniae* y los estreptococos del grupo viridans se clasifican como estreptococos no-Lancefield.

<b>Especies</b>	<b>Grupo de Lancefield</b>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B
<i>Streptococcus canis</i>	G
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>	C
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	C, G, A and L
<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	C
<i>Streptococcus equi subsp. equi</i>	C
<i>Streptococcus</i> grupo <i>anginosus</i>	A, C, F and G o no agrupable
<i>Streptococcus</i> grupo <i>bovis</i>	D
<i>Streptococcus suis</i>	R, S and T o no agrupable
<i>Enterococcus</i> spp	D

### 2.3. Microscopía

La disposición de los cocos gram positivos catalasa negativa es un marcador importante para orientar la identificación. Las bacterias pueden disponerse en cadenas largas o cortas, pares, tétradas, acúmulos o racimos. Para la correcta observación microscópica del tipo de disposición es necesario realizar la tinción de Gram a partir de un medio líquido, siendo el caldo tioglicolato el medio de elección.

Las especies de *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus* son células gram positivas, redondas u ovoides que se presentan en pares, cadenas cortas o largas o, a veces, en acúmulos. *S. pneumoniae* son células Gram positivas, lanceoladas que se presentan en pares, a menudo con una cápsula visible. Las especies de los géneros *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Facklamia* y *Helcococcus* son cocos Gram positivos en acúmulos o tétradas. *Gemella*, *Leuconostoc* y *Vagococcus* son cocos Gram positivos que se presentan en pares, acúmulos y cadenas cortas (*Gemella* puede decolorarse fácilmente).

## 2.4. Morfología de las colonias

Microorganismo	Hemólisis	Características macroscópicas en agar sangre
Estreptococo $\beta$ -haemolítico	$\beta$	Diferentes tipos de colonias. Colonia pequeña y colonia grande
Grupo <i>S. anginosus</i>	$\alpha, \beta$ o no hemolítico	Colonias pequeñas ( $\leq 0.5$ mm), la hemólisis puede ser variable. Algunas cepas son fastidiosas y desarrollan mucho mejor en anaerobiosis
Enterococos	$\alpha, \beta$ o no-hemolíticas	Las colonias son más grandes que las de los estreptococos, generalmente 1 a 2mm, con una apariencia "acuosa" o mucosa. La hemólisis es variable.
Grupo <i>S. bovis</i>	$\alpha$ o no hemolítico	Las colonias son pequeñas, 1mm, no pigmentadas.
<i>S. pneumoniae</i>	$\alpha$	Las colonias son de 1 a 2 mm, pequeñas, de color crema, gris o blanco. Después de la incubación anaerobia, las colonias pueden ser más grandes y mucoides.
Estreptococos del grupo viridans	$\alpha$ o no hemolítico	Las colonias son diminutas, no pigmentadas, grises, lisas o mate, 0,5 a 1,0 mm, borde entero.
<i>Abiotrophia</i> and <i>Granulicatella</i>	$\alpha$ o no hemolítico	Las colonias son pequeñas ( $\leq 0.5$ mm), requieren piridoxal o cisteína para crecer.
<i>Aerococcus</i> spp.	$\alpha$	Similar a los estreptococos del grupo viridans
<i>Facklamia</i> spp.	$\alpha$ o no hemolítico	Similar a los estreptococos del grupo viridans
<i>Gemella</i> spp.	$\alpha$ o no hemolítico	Similar a los estreptococos del grupo viridans
<i>Globicatella</i> spp.	$\alpha$	Similar a los estreptococos del grupo viridans
<i>Helcococcus</i> spp.	non	Similar a los estreptococos del grupo viridans
<i>Lactococcus</i> spp.	$\alpha$ o no hemolítico	Similar a los enterococos
<i>Leuconostoc</i> spp.	$\alpha$ o no hemolítico	Similar a los estreptococos del grupo viridans
<i>Pediococcus</i> spp.	$\alpha$ o no hemolítico	Similar a los estreptococos del grupo viridans

## 3. PRINCIPIOS DE LA IDENTIFICACIÓN

Los aislamientos del cultivo primario se identifican por el aspecto de la colonia, la tinción de Gram, la disposición microscópica, el patrón de hemólisis y la producción de catalasa. La identificación a nivel de género puede lograrse con unas pocas pruebas bioquímicas de apertura, principalmente bilis esculina, tolerancia a CINA 6,5%, pirrolidonilamidasasa (PYR), leucinaminopeptidasa (LAP),

observación de cadenas, tetradas o racimos en caldo tioglicolato y determinación de su sensibilidad a vancomicina.

### 3.1. Esquema inicial para la diferenciación de cocos gram positivo, catalasa negativa

	GRAM	VAN	GAS	BE	NaCl	PYR	LAP	ADH	βGUR	10 °C	45 °C	SAT	MOV	HEMO
<i>Abiotrophia defectiva</i>	C	S	-	-	-	+	+	-	-	-	V	+	-	α, δ
<i>Aerococcus christensenii</i>	RA	S	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	α
<i>Aerococcus usurinae</i>	RA, T	S	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	α
<i>Aerococcus urinaehominis</i>	RA, T	NP	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	α
<i>Aerococcus sanguincola</i>	RA, T	NP	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	NP	α
<i>Aerococcus viridans</i>	RA, T	S	-	V	+	+	-	-	NP	-	-	-	-	α
<i>Alloiococcus</i>	RA, T	S	-	-	+	+	+	NP	NP	-	-	-	-	δ
<i>Dolosicoccus</i>	C	S	-	-	-	+	-	NP	NP	-	-	-	-	α
<i>Dolosigranulum</i>	RA, T	S	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	δ
<i>Enterococcus</i>	C	S/R	-	+	+	+	+	V	NP	+	+	-	V	α, δ
<i>Facklamia</i>	RA, C	S	-	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	δ
<i>Facklamia languida</i>	RA, T	S	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	δ
<i>Gemella</i>	RA, T, C	S	-	-	-	+	+	-	NP	-	-	-	-	α, δ
<i>Gemella haemolytans</i>	RA, T	S	-	-	-	+	+	NP	NP	-	-	-	-	α
<i>Globicatella</i>	C	S	-	V	+	V	-	-	NP	-	V	-	-	α
<i>Granulicatella adiacens</i>	C	S	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	α, δ

<i>Granulicatella elegans</i>	C	S	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	α, δ
<i>Helcococcus kunzii</i>	RA, T	S	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	δ
<i>Ignavigranum</i>	RA, C	S	-	-	+	+	+	V	NP	-	-	V	-	δ
<i>Lactococcus</i>	C	S	-	+	V	V	+	+	NP	+	V	-	-	α, δ
<i>Leuconostoc</i>	C	R	+	V	V	-	-	-	NP	+	+	-	-	α, δ
<i>Pediococcus</i>	RA, T	R	-	+	V	-	+	NP	NP	-	+	-	-	α
<i>Streptococcus</i>	C	S	-	V <sup>1</sup>	V	V <sup>2</sup>	+	V	NP	-	V	-	-	α, β, δ
<i>Tetragenococcus</i>	RA, T	S	-	+	+	-	+	NP	NP	-	+	-	-	α
<i>Vagococcus</i>	C	S	-	+	V	+	+	<sup>3</sup> -	NP	+	V	-	+	α, δ
<i>Weissella*</i>	BC	R	+	+	V	V	-	+	NP	V	V	-	-	α, δ

**GRAM:** Coloración de Gram (para observar la distribución de células, es conveniente usar caldo tioglicolato y modificar el método de tinción de Gram fijando con metanol. **VAN R:** vancomicina resistente. **VAN S:** vancomicina sensible. **GAS:** Gas de glucosa en medio MRS. **BE:** Bilis esculina. **NaCl:** desarrollo en cloruro de sodio 6,5%. **PYR:** pirrolidonilaramidasa. **LAP:** leucina aminopeptidasa. **ADH:** arginina dihidrolasa. **BGUR:** Beta-glucoronidasa. **10 °C:** desarrollo a 10 °C. **45 °C:** desarrollo a 45 °C. **SAT:** satelitismo. **MOV:** movilidad. **HEMO:** hemólisis en agar sangre de carnero. **C:** cadenas. **RA:** racimos. **T:** tetradas. **BC:** bacilos cortos. **NP:** No probado. **V:** variable.

\* *W. confusa* es desarrolla en cloruro de sodio 6,5%. Los escasos aislamientos clínicos informados en la literatura son ADH positiva.

<sup>1</sup> Todas las cepas de *S. bovis* y aproximadamente un 10% de estreptococos viridans son bilis esculina positiva.

<sup>2</sup> Todas las cepas de *S. pyogenes* y la mayoría de cepas de *S. porcinus* y *S. iriae* son PYR positivo.

<sup>3</sup> Raras excepciones

### 3.2. Sistemas de identificación

Las pruebas bioquímicas permiten identificar a nivel de género y en muchos casos especie o grupo la mayoría de los aislamientos de cocos gram positivos catalasa negativa de importancia clínica. En este manual se incluyen algoritmos y esquemas basados en pruebas bioquímicas. Si la identificación obtenida mediante métodos fenotípicos convencionales corresponde a un género o especie inusual, el aislado debe ser remitido a un laboratorio de referencia para la confirmación de su identificación.

En caso de utilizar pruebas bioquímicas, es importante realizar los controles de calidad apropiados a cada lote de medio preparado.

Algunos equipos de identificación comerciales pueden dar resultados poco fiables con la identificación de estreptococos α hemolíticos. También existe una escasa discriminación entre *S. pneumoniae* y el grupo *S. mitis*, ya que son genéticamente inseparables, por lo que las especies de *Streptococcus mitis/oralis* pueden identificarse erróneamente como *S. pneumoniae*. Se ha informado que *Streptococcus porcinus*, un patógeno

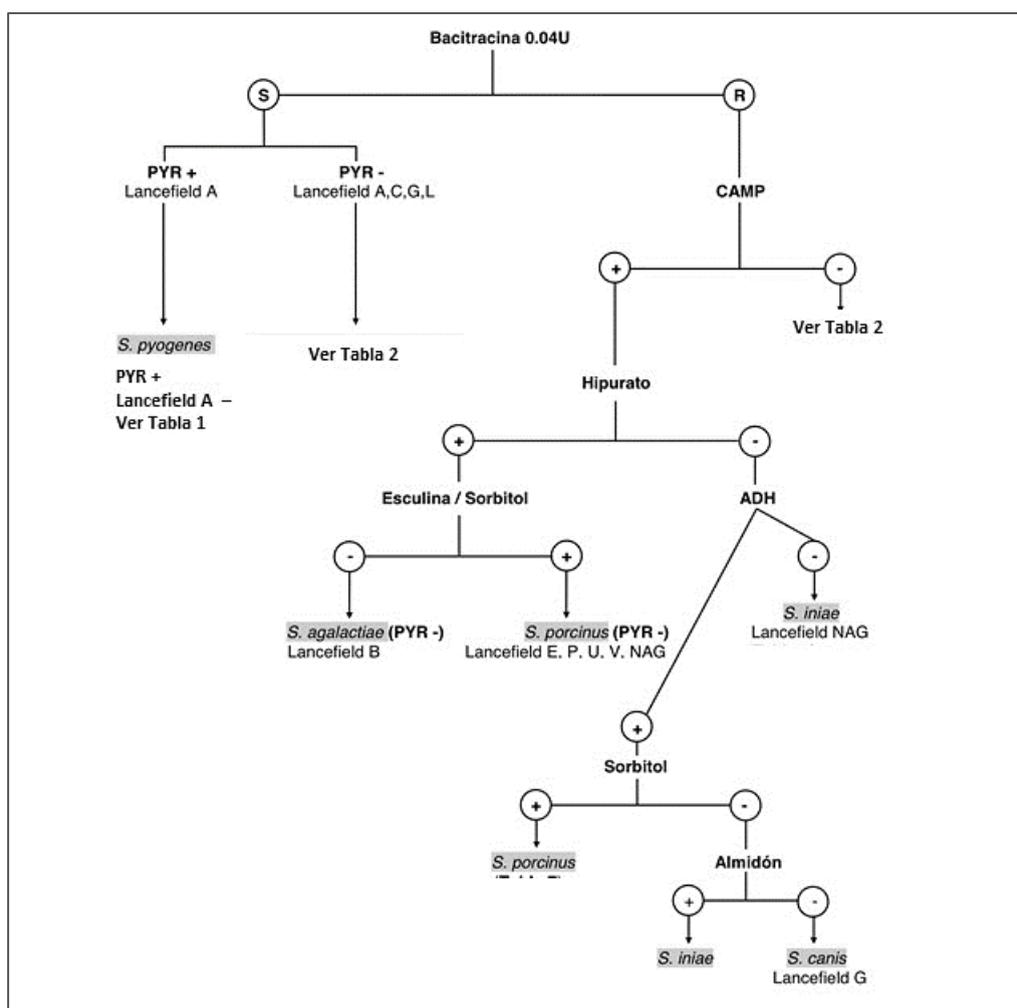
porcino, reacciona de forma cruzada con reactivos comerciales de estreptococos del grupo B cuando se utilizan equipos comerciales.

En algunos sistemas de identificación comercial, *Helcococcus kunzii* puede identificarse erróneamente como *Aerococcus viridans*. *Aerococcus sanguinicola* también puede identificarse erróneamente como *A. viridans*.

Los sistemas de identificación bacteriana basados en MALDI-TOF MS tienen limitaciones con varias especies de estreptococos, incluida la distinción de *S. pneumoniae* de otros miembros del grupo *S. mitis*; sin embargo, la combinación de la prueba de solubilidad en bilis con los resultados del MALDI-TOF puede proporcionar una identificación precisa de *S. pneumoniae*. Para algunos géneros y especies de este grupo taxonómico, los valores de identificación obtenidos son menores a los sugeridos por el fabricante para la identificación precisa de especie. Sin embargo, numerosos estudios han validado la utilización de valores de identificación menores. Si utiliza MALDI-TOF-MS Bruker Daltonics, puede consultar las recomendaciones de la Red Nacional de Espectrometría de Masas aplicada a la Microbiología Clínica (RENAEM) en el enlace: [www.anlis.gov.ar/renaem/](http://www.anlis.gov.ar/renaem/).

## 4. ALGORITMOS Y TABLAS DE IDENTIFICACIÓN

### 4.1. ESTREPTOCOCOS B HEMOLÍTICOS



*S. iniae*: patógenos de peces, en humanos enfermedad ocupacional. *S. canis*: principalmente aislado en perros. Se desconoce incidencia en humanos. *S. porcinus*: principalmente aislado en tracto genitourinario de

mujeres en edad fértil. Puede dar reacción cruzada con antisuero grupo B e identificarse erróneamente como *S. agalactiae*. La hemólisis es un marcador diferencial. En agar sangre *S. agalactiae* produce hemólisis débil, mientras que *S. porcinus* da una hemólisis mucho mayor.

**Tabla 1: Identificación de estreptococos beta hemolíticos, bacitracina resistente, CAMP negativo**

	<i>S. dysgalactiae</i>		<i>S. equi</i>		Grupo
	subespecie <i>dysgalactiae</i> <i>e</i> <sup>a</sup>	subespecie <i>equisimilis</i>	subespecie <i>e equi</i> <sup>b</sup>	subespecie <i>zooepidemicus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i> <sup>c</sup>
Lancefield	C	A, C, G, L	C	C	A, C, G, E, NAG
PYR	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	+
Hidrólisis					
Arginina	+V	+	+V	+V	+
Esculina	-	+	+	+	+
Amilasa		-			-
Sorbitol	V	-	-	+	-
Trealosa	+	+	-	-	+

<sup>a</sup> *S. dysgalactiae* sp. *dysgalactiae* NO ES BETA HEMOLITICO. <sup>b</sup> *S. equi* sp. *equi* no ha sido aislado en humanos;

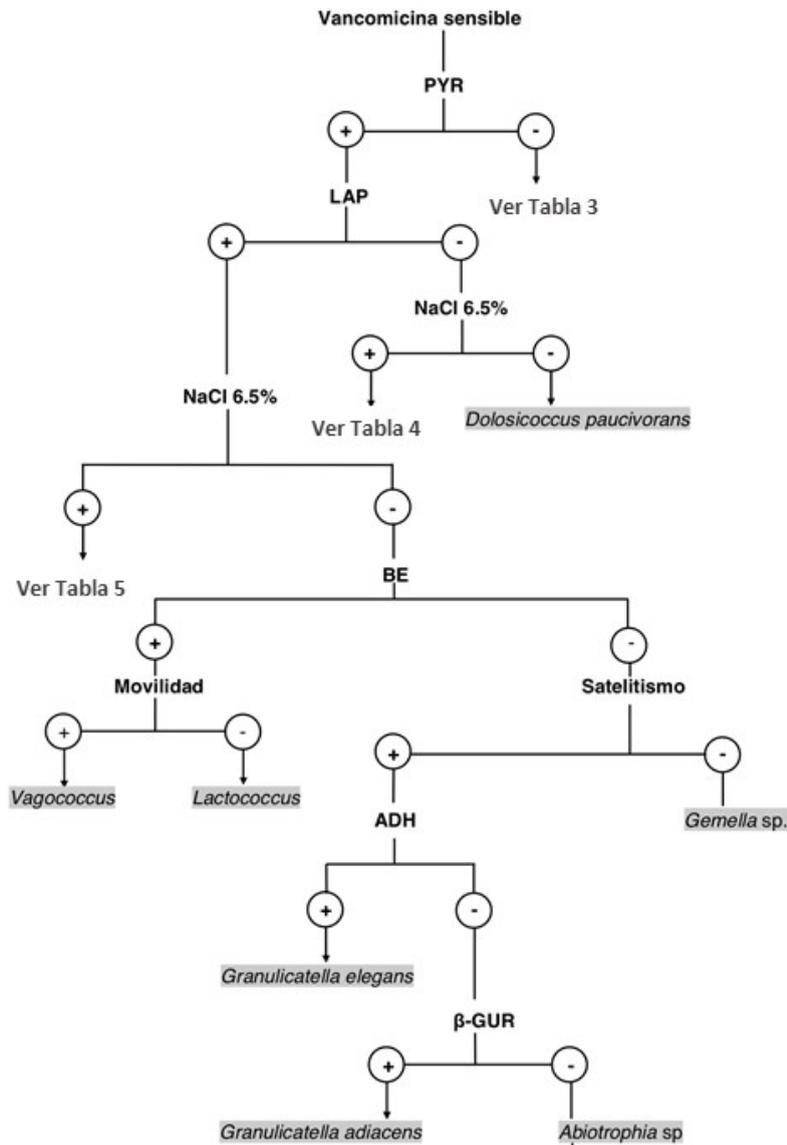
<sup>c</sup> Incluye las especies beta hemolíticas: *S. anginosus*, *S. constellatus* sp. *constellatus*, *S. constellatus* sp. *pharyngis* y *S. intermedius*.

**Tabla 2: Identificación de estreptococos beta hemolíticos, PYR positivo**

	<i>Streptococcus canis</i>	<i>Streptococcus equi</i>	<i>Streptococcus porcinus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Bacitracina	NP	V	R	S
CAMP	+	+	+	-
Reacción de VP	-	-	+	-
Hidrólisis				
Hipurato	-	-	V	-
Esculina	+	+	+	-
Almidón	-	+	-	-

## 4.2. GÉNEROS α HEMOLÍTICOS Y NO HEMOLÍTICOS SENSIBLES A VANCOMICINA

Este un algoritmo básico con fines de orientación en la identificación. Ante la detección de géneros o especies inusuales es importante derivar el aislamiento a un laboratorio de referencia para la confirmación de la identificación por métodos proteómicos y/o genómicos.



**Tabla 3: Identificación de cocos gram positivo, catalasa negativa, vancomicina sensible, PYR negativo**

	GRAM	LAP	Bilis esculina	NaCl 6.5 %	10 °C	45 °C	Hipurato hidrólisis	VP	Hemólisis
<i>Aerococcus christensenii</i>	R, T	+	-	+	-	-	+	+	α
<i>Aerococcus urinae</i>	R, T	+	-	+	-	-	+	-	α
<i>Aerococcus urinaehominis</i>	R, T	-	-	+	-	-	+	NP	α
Enterococos PYR negativos <sup>2</sup>	C	+	+	+	+	+	NP	NP	α, δ
<i>Globicatella sanguinis</i> <sup>1</sup>	C	-	+	+	-	V	+	NP	α
<i>Lactococcus</i>	C	+	+	V	+	V	NP	NP	α, δ
<i>Streptococcus</i>	C	+	V	V	-	V	V	V	α, β, δ
<i>Tetragenococcus</i>	R, T	+	+	+	-	+	-	+	α

<sup>1</sup> *Globicatella* Pyr + (75%), <sup>2</sup> *E. cecorum*, *E. colombae*, *E. pallens*, *E. saccharolyticus* (no descriptos aún en humanos) (Grupo D de Lancefield)

**Tabla 4 : Identificación de cocos gram positivo, catalasa negativa, vancomicina sensible, PYR positivo, LAP negativo**

	<i>Aerococcus viridans</i> <sup>1</sup>	<i>Helcococcus kunzii</i> <sup>1</sup>	<i>Globicatella sanguinis</i>
GRAM	racimos, tetradas	racimos, tetradas	pares, cadenas cortas
PYR	+	+	V
LAP	-	-	-
Bilis esculina	V (79)	-	+
Esculina hidrólisis	+(84)	+(95)	+
Desarrollo a 45 °C	-	-	V
Hipurato hidrólisis	V	-	+
Telurito de potasio	V	NP	V
Manitol acidificación	V	-	+(96)
Sorbitol acidificación	-(14)	-	V
Trealosa acidificación	+	-	+
Sacarosa acidificación	+	-	+
Piruvato	-	NP	-
Inulina acidificación	-(7)	V	+(93)

<sup>1</sup> *Helcococcus kunzii* facultativo, generalmente no hemolítico

*Aerococcus viridans* desarrolla mejor en aerobiosis y es α-hemolítico

**Tabla 5.: Identificación de cocos gram positivo, catalasa negativa, vancomicina sensible, PYR positivo, LAP positivo**

	GRAM	Bilis esculi na	Esculin a	Hipura to	$\beta$ -GUR <sup>3</sup>	$\beta$ -GAL <sup>3</sup>	45 °C	MOV
<i>A. sanguinicola</i>	R, T	+	+	+	+	NP	-	-
<i>Alloiococcus</i>	R, T	-	-	NP	NP	+	-	-
<i>Dolosigranulum</i>	R, T	-	+	NP	-	NP	-	-
<i>Enterococcus</i> <sup>4</sup>	C	+	+	V	NP	NP	+	V
<i>Facklamia</i> <sup>1</sup>	R, C	-	-	+	-	<sup>1</sup> -	-	-
<i>Ignavigranum</i>	R, C	-	-	-	NP	+	-	-
<i>Lactococcus</i>	C	+	+	NP	NP	NP	V	-
<i>S. urinalis</i> <sup>2</sup>	C	+	+	+	-	-	+	-
<i>Vagococcus</i>	C	+	+	NP	NP	V	-	+

<sup>1</sup> *F. hominis* es  $\beta$ -galactosidasa positivo, <sup>2</sup> No desarrolla a 10 °C, no presenta antígenos del grupo D de Lancefield <sup>3</sup> Api ZYM <sup>4</sup> Para identificación de especies ver Cuadro Identificación de enterococos

#### 4.3. GÉNEROS $\alpha$ HEMOLÍTICOS Y NO HEMOLÍTICOS RESISTENTES A VANCOMICINA

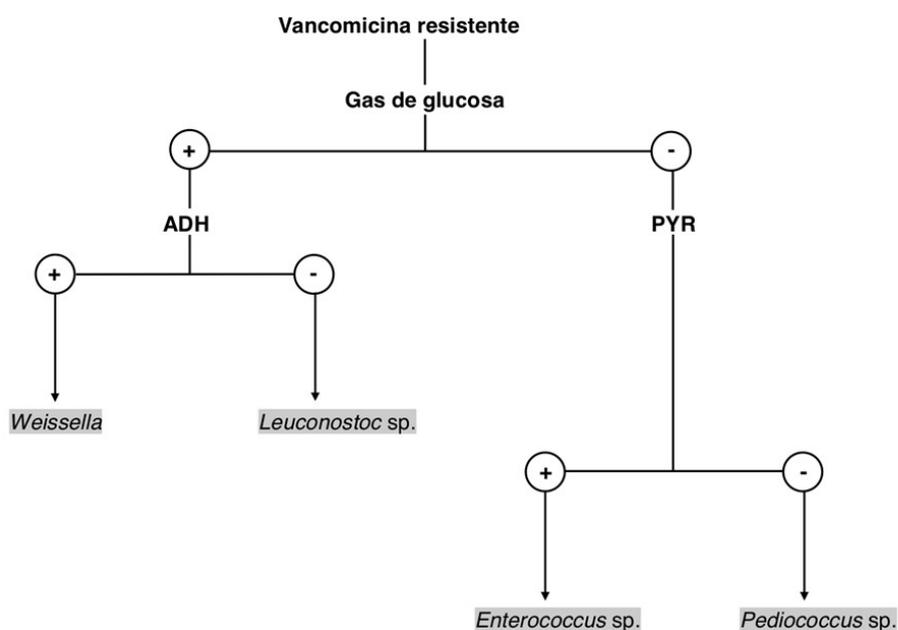


Tabla 6

#### 4.4. ESTREPTOCOCOS α HEMOLÍTICOS O NO HEMOLÍTICOS

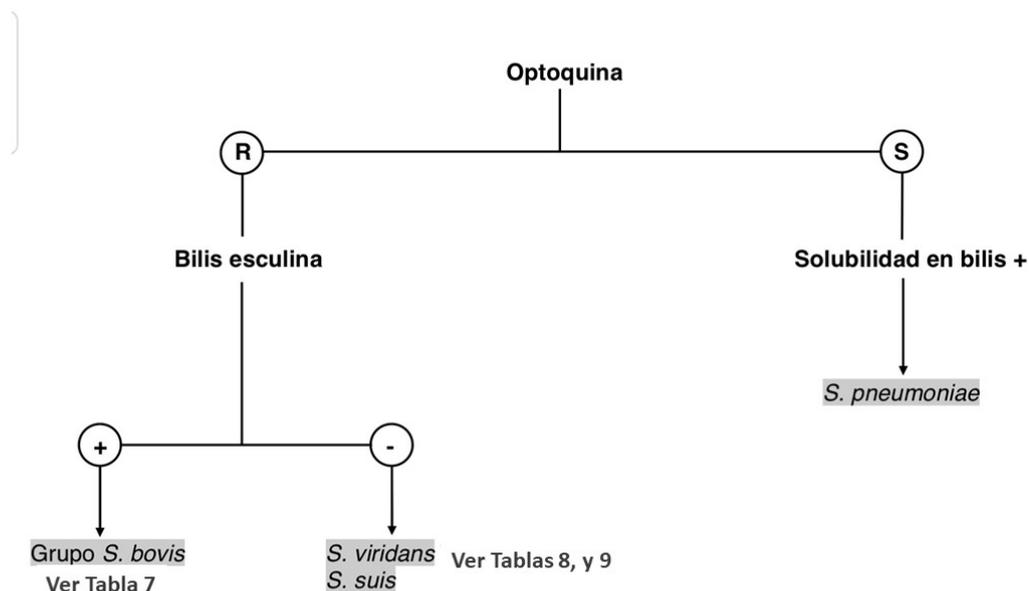


Tabla 6: Esquema para diferenciación de especies del género *Enterococcus*

	MA N	SO R	AD H	AR A	SB L	RA F	TE L	MO T	PIG	SU C	PY U	MG P
<b>Grupo I</b>												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. saccharolyticus</i> <sup>b</sup>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
" <i>E. hawaiiensis</i> "	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>Grupo II</b>												
<i>E. faecium</i>	<sup>c</sup>	-	+	+	V V	V	-	-	-	<sup>c</sup>	- V	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	<sup>c</sup>	+	-	+	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	+	-	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	<sup>c</sup>	+	+	+	-	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	+	-	+

<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	<sup>c</sup> +	-	<sup>c</sup> +	-	+	-	+	-	-	<sup>c</sup> +	+	-
<i>E. haemoperoxidus</i> <sup>b</sup>	<sup>d</sup> +	-	<sup>d</sup> +	-	-	-	-	-	-	<sup>d</sup> +	-	+
" <i>E. sanguinicola</i> "	+	-	+	-	-	-	<sup>e</sup> +	-	-	+	-	-
<i>Lactococcus</i> <i>sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Grupo III</b>												
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo VI</b>												
<i>E. cecorum</i> <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. phoeniculicola</i> <sup>b</sup>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. asini</i> <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. caccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<sup>d</sup> +
<b>Grupo V</b>												
<i>E. canis</i> <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. columbae</i> <sup>b</sup>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. moraviensis</i> <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hermanniensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+
<i>Vagococcus</i> <i>fluvialis</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

**MAN:** manitol; **SOR:** sorbosa; **ADH:** arginina; **ARA:** arabinosa; **SBL:** sorbitol; **RAF:** rafinosa; **TEL:** telurito de potasio 0.04%; **MOT:** movilidad; **PIG:** pigmento; **SUC:** sacarosa; **PYU:** piruvato; **MGP:** α-metilD-glucopiranosido; **(+):** más del 90% de las cepas positivas; **(-):** menos del 10% de las cepas positivas; **V:** variable (entre 11 y 89% de las cepas positivas).

<sup>b</sup> Características fenotípicas basadas en datos de cepas típicas.

<sup>c</sup> Excepciones (<3% de las cepas pueden presentar reacciones aberrantes).

<sup>d</sup> Positivo tardío (3 o más días de incubación).

<sup>e</sup> Reacción débil.

**Tabla 7: Diferenciación de especies de importancia clínica del grupo *S. bovis***

	<i>S. equinus</i>	<i>S. gallolyticus</i>			<i>S. infantarius</i>		<i>S. alactolyticus</i>
		subespecie <i>gallolyticus</i>	subespecie <i>pasteurianus</i>	subespecie <i>macedonicus</i>	subespecie <i>infantarius</i>	subespecie <i>coli</i> ( <i>S. lutetiensis</i> )	
Hidrólisis de esculina	+	+	+	-	V	+	+
Producción de:							
β-glucosidasa	+	+	+	-	V	+	+
β-glucuronidasa	-	-	+	-	-	-	-
α-galactosidasa	-/+	+	V	V	+	+	+
β-galactosidasa (β-GAL)	-	-	+	V	-	-	-
β-manosidasa	-	V	+	-	-	-	-
Acidificación de:							
Almidón	-/+	+	-	+	+	V	-
Glicógeno	-/+	+	-	-	+	-	-
Inulina	-/+	+	-	-	-	-	-
Lactosa	-/+	+	+	+	+	+	-
Manitol	-	+	-	-	-	-	-
Metil-β-D-glucopiranosido	+	+	+	-	-	+	V
Rafinosa	-/+	+	V	-	+	-	-
Trealosa	V	+	+	-	-	-	-

**Tabla 8: Esquema de identificación de cocos gram positivos en cadena, no beta hemolíticos**

Especies o grupos	Lancefie ld	OPT	SB	BE	PYR	ESC	VP	MA N	MEL	SBT	TRE	AL M	Dx
<i>S. pneumoniae</i>	pn	+	+	-	-	V	-	-	+	-	V	-	-
Grupo <i>S. bovis</i>	D(V)	-	-	V	-	V	+	V	V	-	V	V	V
<i>S. suis</i>	Tipo 1-35(R, S, T)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Streptococos viridans	A, C, G, F, ninguno	-	-	-	-	V	V	V	V	V	V	V	V

**pn:** tipificación con antisueros para neumococo u Omni suero; **letras:** antígeno Grupo de Lancefield; **Opt:** optoquina;

**SB:** solubilidad en bilis; **BE:** reacción de bilis esculina; **NaCl:** desarrollo en caldo cloruro de sodio 6,5%; **Pyr:** reacción de pirrolidonicarilamidasa; **Esc:** hidrólisis de esculina; **Vp:** reacción de Voges Proskauer; **Man, Mel, Sbt, Tre:** acidificación de manitol, melibiosa, sorbitol y trealosa; **Alm:** hidrólisis de almidón; **Dx:** producción de polisacárido extracelular.

**Tabla 9: Esquema mínimo de identificación *Streptococcus viridans***

Grupos	Voges Proskauer	Acidificación de		Hidrólisis de		
		manitol	sorbitol	arginina	esculina	urea
Anginosus <sup>1, 3</sup>	+	V	-	+	+	-
Bovis <sup>2</sup>	+	<sup>5</sup> V	-	-	V	-
Mitis ADH +	-	-	V	+	-	-
Mitis ADH -	-	-	-	-	-	-
Mutans	+	+	+	-	+	-
Salivarius	+	-	-	-	V	<sup>4</sup> V
<i>S. suis</i>	-	-	-	+	+	-

1 Las especies del grupo Anginosus pueden presentar beta hemólisis y variables los antígenos de Lancefield. Están asociados a infecciones purulentas. 2 *S. gallolyticus* subespecie *gallolyticus* es manitol positivo, el resto de las especies del grupo bovis son manitol negativo. 3 Grupo bovis es generalmente b-galactosidasa negativa y a-galactosidasa positiva. Grupo Salivarius es b-galactosidasa positiva y a-galactosidasa negativa  
\* *S. pneumoniae* está incluido dentro del grupo Mitis, pero se estudia separadamente debido a su sensibilidad a optoquina

## 5. Medios de cultivo

### 5.1. Actividad enzimática: Para la detección de ambas enzimas se utilizan discos comerciales.

#### Leucina aminopeptidasa

La prueba detecta la presencia de la enzima leucina aminopeptidasa (LAP). El substrato leucina-a-naftilamida es hidrolizado por LAP a leucina y a a-naftilamida que reacciona con el *p*-dimetilaminocinamaldehído y forma un complejo color rojo.

#### Pirrolidonilarilamidasa

La prueba detecta presencia de pirrolidonilarilamidasa, también llamada pirrolidonilaminopeptidasa (PYR). El substrato es pirrolidonil-a-naftilamida y es hidrolizado liberando a-naftilamida que reacciona con el *p*-dimetilaminocinamaldehído y forma un complejo color rojo

#### Realización de la prueba

Cultivar la cepa en agar sangre para obtener un desarrollo denso.

Algunas bacterias necesitan más de 24 horas de incubación (*Gemella*, *Alloicoccus*, *Helcococcus*) y las placas deben ser incubadas por 2 o 3 días.

Los discos se colocan en un área de la placa sangre donde no hay desarrollo bacteriano o el desarrollo es tenue.

Inocular el disco densamente con dos o varias ansadas del cultivo.

Las placas con los discos se dejan a temperatura ambiente por 10 minutos.

#### Lectura

Agregar el reactivo revelador (*p*-dimetilaminocinamaldehído).

Leer después de 3 minutos.

#### Interpretación

**Reacción positiva:** rojo

**Reacción positiva débil:** rosado

**Reacción negativa:** amarillo o incoloro

El desarrollo de color es generalmente inmediato.

El resultado debe leerse dentro de los 10 minutos posteriores al agregado del reactivo.

## 5.2. Agar Sacarosa al 5%: Para la producción de glucanos

### Medio Base - Ingredientes

Agar infusión corazón .....	40 g
Sacarosa .....	50 g
Agua destilada c.s.p .....	1000 ml

### Procedimiento

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos

Enfriar a 55 °C, colocar en placas de Petri de 13x100 mm (aproximadamente 10 ml por placa)

Sembrar con un cultivo de 18 a 24 horas de incubación

Incubar a 35 °C por 48 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub>

### Interpretación

**Reacción positiva:** La producción de glucanos típico de *Streptococcus mutans*, resulta en un desarrollo muy retráctil y adherente ó blanco, adherente y seco en el agar.

La producción de levanos típico de *Streptococcus salivarius* resulta en un desarrollo opaco, gomoso y no adherente.

El desarrollo típico *S. gallolyticus* (*S. bovis* I) y *Leuconostoc mesenteroides* es similar al de *S. salivarius*, pero es menos gomoso y raramente se adhiere al agar

**Reacción negativa:** Colonias grandes o pequeñas que son mucoides y no adherentes son consideradas negativas o no productoras de polisacárido extracelular

## 5.3. Desarrollo a 10 °C y 45 °C

### Medio base - Ingredientes

Caldo infusión corazón .....	22.5 g
Glucosa (dextrosa) .....	10.0 g
Agua destilada .....	900 ml
Indicador púrpura de bromocresol.....	1.6 g
Etanol 95% .....	100 ml

Agregar 1 ml de indicador por cada 1000 ml de medio

pH final 7.2 + 0.2

### Preparación del medio

Mezclar todos los ingredientes, disolver y dispensar en volúmenes de 3 ml en tubos de vidrio 13x100 mm con tapa a rosca

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C

### Inoculación

Sembrar una o dos colonias de un cultivo fresco

Las tapas de los tubos deben ser ajustadas y selladas con parafilm para evitar que la humedad o contaminantes penetren al tubo de reacción

### Incubación

Incubar a las distintas temperaturas durante 7 días como mínimo y hasta 14 días en el caso de bacterias de lento desarrollo

### Interpretación

**Reacción positiva:** viraje del indicador al amarillo o visualización de turbidez sin viraje

### Importante

La glucosa y el indicador se añaden para mejorar la visualización de un resultado positivo, sin embargo, no se requiere de un cambio de color para considerar un resultado positivo

**5.4. Fermentación de carbohidratos:** Para identificación de cocos gram positivos, catalasa negativa. Carbohidratos más frecuentemente ensayados: arabinosa, maltosa, manitol, melibiosa, rafinosa, sorbitol, sorbosa, sacarosa y trealosa

### Medio base - Ingredientes

Caldo infusión corazón .....22.5 g

Agua destilada .....900 ml

Indicador púrpura de bromocresol.....1.6 g

Etanol 95% .....100 ml

Agregar 1 ml de indicador por cada 1000 ml de medio

pH final 7.2 + 0.2

### Preparación del medio base

Mezclar todos los ingredientes, disolver y dispensar en volúmenes de 9 ml en tubos de vidrio de 16X150 mm con tapa a rosca

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C

### Preparación de la solución del carbohidrato

Preparar una solución al 10% de cada carbohidrato utilizando agua destilada y tubo estéril  
Filtrar la solución del azúcar en forma estéril, a través de una membrana filtrante de 0.22  $\mu$   
Realizar un control de esterilidad de la solución filtrada en caldo nutritivo

### Preparación del medio

Agregar a los 9 ml del medio base estéril, 1 ml de la solución del azúcar al 10% estéril  
Mezclar y fraccionar en volúmenes de 3 ml en tubos de vidrio 13x100mm, tapa a rosca

### Inoculación

Inocular con una ansada de un cultivo fresco

Incubar a 35 °C durante 14 días

### Interpretación

**Reacción positiva:** viraje del indicador de púrpura al amarillo

**Reacción negativa:** púrpura

## 5.5. Gas de glucosa

Caldo MRS ( DeMan, Rogosa and Sharpe) - Ingredientes por litro

Peptona.....	10.0 g	
Citrato de amonio .....	2.0 g	
Extracto de carne .....	8.0 g	
Acetato de sodio x 3H <sub>2</sub> O .....	5.0 g	
Extracto de levadura .....	4.0 g	
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O .....	0.1 g	
Glucosa .....	20.0 g	
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O.....	0.05 g	
Tween 80.....	1.0 ml	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2.0 g	pH 6.5 + 0.2

### Preparación

Suspender 55 g en 1000 ml de agua destilada o desionizada y calentar hasta disolución  
Fraccionar en tubos 13x100 mm con tapa a rosca  
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

### Inoculación

Inocular con cultivo puro y sellar con parafina estéril

Incubación a 35 °C durante 7 días

### Interpretación

**Reacción positiva:** La producción de gas se evidencia cuando se levanta el tapón de parafina.

Pequeñas burbujas que puedan acumularse durante la incubación no es una reacción positiva

### Importante

La mayoría de las cepas de Leuconostoc son positivas a las 24 horas, pero algunas cepas pueden requerir un mayor período de incubación

### **5.6. Hidrólisis de almidón:** Almidón soluble (almidón de papa).

Concentración final de almidón en el medio basal: 2%.

#### Medio basal - Ingredientes por litro

Agar 20.0 g

Peptona 5.0 g

Extracto de carne .....

3.0 g

Cloruro de sodio.....

5.0 g

Agua destilada c.s.p..... 1000 ml.....

pH 7.2

Para el medio basal se pueden utilizar como alternativa, medios

comerciales: Agar infusión corazón; Tripteína Soya Agar; Medio Base Sangre

Reactivo Revelador - Solución de Lugol

#### Preparación del medio

Hidratar el medio basal en 500 ml de agua destilada o desionizada

Calentar suavemente hasta disolución

Disolver 20 g de almidón en 250 ml de agua destilada

↳ El almidón es ligeramente soluble en agua

↳ Calentar suavemente hasta ebullición

▷ No hervir en exceso porque el sobrecalentamiento puede hidrolizar el almidón

Combinar (pasos 1 y 3) y mezclar suavemente. Completar a un litro

Ajustar el pH, si es necesario

Fraccionar de 15 a 20 ml en tubos de vidrio de 16 X125mm con tapa a rosca

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

Enfriar a temperatura ambiente, ajustar las tapas y conservar refrigerados de 4-10 °C

Fundir el medio colocando los tubos en un baño de María

Plaques, conservar placas en frío. En las placas de almidón refrigeradas, el medio es opaco

Inoculación

Sembrar en estría con un cultivo fresco de 18 a 24 horas de incubación

Incubar a 35 °C durante 48 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub>

Lectura

Después de la incubación, inundar la placa con 2 a 4 ml del reactivo revelador.

Interpretación

**Reacción positiva:** se evidencia por una zona de decoloración alrededor de la estría o de la colonia, lo cual indica que el almidón ha sido hidrolizado

**Reacción negativa:** se evidencia porque el medio entero es azul, indicando presencia de almidón

## 5.7. Hidrólisis de Arginina

### Medio base decarboxilasa Moeller - Ingredientes por litro

Peptona (pepsina).....5.0 g

Extracto de carne.....5.0 g

Púrpura de bromocresol .....0.01 g

Rojo de cresol.....0.005 g

Piridoxal .....5.0 mg

Glucosa (dextrosa) .....0.5 g

L-aminoácido .....10 g

Agua destilada..... 1000 ml

pH final a 6.0

### Preparación del medio

Pesar la cantidad indicada por el fabricante. Agregar agua destilada o desmineralizada

Calentar suavemente hasta disolución

Dividir el medio en dos mitades. Agregar a la mitad del medio base L-(+) monoclorhidrato de arginina, concentración 1%.

No agregar aminoácido a la otra mitad de medio

Ajustar el pH final a 6.0

Fraccionar de a 3 ml en tubos de vidrio 13x100 mm con tapa a rosca

Autoclavar a 121 °C durante 10 minutos

Dejar enfriar a temperatura ambiente y ajustar las tapas de los tubos

Mantener refrigerados a una temperatura de 4 a 10 °C

### Inoculación

Inocular con un cultivo fresco de 18 – 24 horas de incubación

Sembrar un tubo control sin aminoácido

Sellar los tubos incluyendo el tubo control con vaselina estéril

### Incubación

Incubar a 35 °C

Tiempo de incubación: 4 días, examinar diariamente.

Puede ser necesario una incubación prolongada de 6 a 10 días o más para demostrar reacciones débiles de microorganismos con pobre actividad de dehidrolasa

### Importante

El medio de Moeller tiene una concentración de glucosa de 0.05 % y un pH final de 6.0, lo cual produce un mejor desarrollo del microorganismo y resultados más confiables cuando un indicador de pH se incorpora al medio.

El fosfato de piridoxal es un cofactor enzimático y actúa activando la enzima.

La adición del piridoxal aumenta la actividad de la dehidrolasa y no es necesario para aquellos microorganismos con fuerte actividad enzimática

## Interpretación

**Reacción positiva:** púrpura intenso o púrpura amarillento débil, indicando una reacción alcalina (liberación de NH<sub>3</sub>)

**Reacción negativa:** Amarillo o sin cambio de color

**Tubo control (sin aminoácido):** color amarillo (solamente fermentación de glucosa).

## **5.8. Hidrólisis de esculina**

### Medio líquido para la hidrólisis de esculina -

Peptona.....	1.0 g	
Extracto de carne.....	0.3 g	
NaCl.....	0.5 g	
Esculina.....	0.3 g	
Citrato férrico.....	0.05 g	
Agua destilada c.s.p.....	100.0 ml	pH 7.2-7.4

### Preparación del medio

Mezclar todos los ingredientes, disolver y dispensar en volúmenes de 3 ml en tubos de vidrio 13x100 mm con tapa a rosca

Esterilizar en autoclave durante 10 minutos a 121 °C

### Agar esculina - Ingredientes por litro

Agar infusión.....	40.0 g	
Esculina.....	0.5 g	
Citrato férrico.....	0.5 g	
Agua destilada.....	1000 ml	pH 7.2 ± 0.2

### Preparación del medio

Calentar hasta disolver el agar

Fraccionar en volúmenes de 3 ml en tubos con tapa a rosca

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos

Solidificar en pico de flauta

### Inoculación

Inocular las estrías con cultivos puros

### Incubación

Incubar a 35 °C hasta 7 días

### Interpretación

**Reacción positiva:** precipitado negro alrededor del cultivo

**Reacción negativa:** No se produce precipitado

## 5.9. Hidrólisis de hipurato

Caldo hipurato de sodio - Ingredientes por litro

Caldo infusión corazón .....

25.0 g

Hipurato de sodio .....10.0 g

Agua destilada c.s.p.....1000 m l

pH 7.4

**Sustrato:** Hipurato de sodio, 1% de concentración

### Preparación

Mezclar bien y disolver en agua destilada o desmineralizada

Disolver el hipurato de sodio en el caldo, en una concentración final del 1%

Calentar suavemente hasta disolución

Fracccionar de a 3 ml en tubos 13 x100 mm con tapa a rosca

Esterilizar con autoclave, durante 15 minutos a 121 °C

Enfriar y ajustar las tapas de los tubos

Conservar entre 4 a 10 °C

### Reactivo revelador: Cloruro férrico 12% - Ingredientes

FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O 12.0 g

Ácido clorhídrico concentrado.....2.5 ml

Agua destilada c.s.p.....100.0 ml

### Preparación

Agregar 75 ml de agua destilada o desmineralizada a un erlenmeyer de 100 ml

Agregar 2.5 ml de HCl por las paredes del recipiente

Agregar 12.0 g de cloruro férrico

Disolver agitando suavemente, llevar a 100 ml con agua destilada estéril

La solución tiene color naranja

### Inoculación

Sembrar cultivo de 18-24 horas de incubación (1-2 colonias ó de caldo denso, 1-2 gotas)

Debe sembrarse un tubo control negativo con un *Streptococcus* grupo A ó un tubo sin inocular

Sembrar un tubo control positivo, con una cepa conocida de *Streptococcus agalactiae*

### Incubación

Incubar a 37 °C por 48 hs

Incubar los controles a la misma temperatura

### Lectura

Antes de agregar el reactivo, si es necesario, llevar a volumen el caldo hasta la marca con agua destilada estéril. La concentración del hipurato de sodio debe ser 1%

Si el cultivo es densamente turbio, centrifugar el sedimento y usar el sobrenadante limpio

Asépticamente, transferir una alícuota del cultivo o del sobrenadante a tubos de Kahn

Volumen a transferir 0.8 ml

Agregar 0.2 ml de cloruro férrico. Inmediatamente agitar suavemente

Esperar 10 a 15 minutos antes de interpretar los resultados, con ocasional agitación

### Interpretación

La aparición de un precipitado que permanece luego de 10 minutos de leída la reacción, indica resultado positivo

Si el precipitado se forma, pero se redisuelve y no se mantiene luego de 10 minutos, la reacción debe ser considerada negativa

Una alternativa metodológica más rápida consiste en realizar una suspensión bacteriana densa en 0,4 ml de una solución acuosa al 1% de hipurato de sodio e incubar a 35 °C por 2 horas. La glicina es el producto final de la hidrólisis del hipurato y se detecta agregando 5 gotas del reactivo ninhidrina (ninhidrina 3.5 g, acetona 50 ml, 1-butanol 50 ml), incubar nuevamente 10 minutos

**Reacción positiva:** desarrollo de color púrpura

### 5.10. Prueba de la catalasa

Con un palillo de madera o plástico tomar material del centro de una colonia del microorganismo a ensayar y colocarlo sobre un portaobjetos limpio.

Colocar una gota de Hsolución de peróxido de hidrógeno al 3% sobre estos microorganismos depositados en el portaobjetos.

Observar el burbujeo (prueba positiva) producido por la liberación de gas o no (prueba negativa)

Precauciones: No utilizar ansa de metal porque da falsos positivos, evitar utilizar cultivos en medios con sangre o hacerlo comparando con las burbujas que se desprenden al colocar trocitos del medio en la gota de peróxido de hidrógeno

### 5.11. Prueba de Voges Proskauer (VP) Método de Coblentz

Medio: caldo MRVP distribuido a razón de 2,5 ml en tubos de ensayo.

Reactivos: A: 5% de  $\alpha$ -naftol en alcohol etílico al 95 %.

B: 0,3 % de creatina en KOH al 40 %.

#### Inoculación

Se siembra el caldo MRVP con gotas del inóculo (de un caldo tripteína de soja (TSB) o infusión cerebro corazón (BHI) incubado a 35°C durante 18-24 h).

Se agrega 0,6 ml del reactivo A y luego 0,2 ml del B.

Se agita vigorosamente durante 5 segundos y se deja en reposo

No tocar hasta el momento de la lectura.

La mayoría de las reacciones positivas (producción de acetoína), aparecen dentro de los primeros 15 minutos, pero la lectura final debe hacerse al cabo de una hora.

**Reacción positiva:** color rosa o rojo en la superficie o en todo el caldo.

**Reacción positiva débil:** color rosa pálido en los bordes del caldo.

*Control positivo y/o positivo débil:* *S. aureus* ATCC 25923

*Control negativo:* *Escherichia coli* ATCC 25922

### 5.12. Prueba de la bacitracina (estreptococos)

Esta prueba es importante para la identificación de estreptococos  $\beta$  hemolíticos

Los estreptococos del grupo A son sensibles. El resto son resistentes, aunque hay excepciones dentro de los grupos C, F, y G.

Recordar que los enterococos pueden presentar hemólisis en agar sangre humana

pero no en agar sangre ovina. Igualmente, son resistentes a la bacitracina.

Se siembra un agar sangre a partir de un cultivo fresco y se aplica un disco de bacitracina (0,04 U).

Incubar a 37°C, 18 - 24 h

Interpretación: cualquier halo de inhibición es considerado sensible.

### 5.13. Prueba de sensibilidad a la optoquina

Se realiza para cocos  $\alpha$ -hemolíticos.

Se prepara una suspensión de una turbiedad similar a la del tubo N°0,5 de la escala de McFarland.

Se hisopa una placa de agar Mueller Hinton + 5% de sangre y se coloca un disco de optoquina

Incubar 18 - 24 h en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

*Reacción positiva:* presencia de un halo de inhibición mayor o igual a 14 mm (discos de 6 mm).

*Reacción negativa:* halos menores o habitualmente ausencia de halo.

Diámetros de 6 a 14 mm deben ser considerados dudosos.

Algunas cepas de *S. pneumoniae* pueden ser resistentes a la optoquina: si existe sospecha clínica de infección neumocócica, confirmar realizando una prueba de solubilidad en bilis. Algunas cepas de *S. oralis*, *S. mitis* y *S. pseudopneumoniae* pueden ser sensibles a la optoquina: *S. pseudopneumoniae* es resistente a la optoquina cuando se incuba en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>

### 5.14. Solubilidad en bilis o sales biliares

Preparar una suspensión muy densa con la bacteria a ensayar (>1 de la escala de Mc Farland) en 1 ml de solución fisiológica. Se vierte 0,5 ml de esta suspensión en dos tubos. A uno de ellos se le agrega 0,5 ml de solución fisiológica (tubo control) y al otro 0,5 ml de una solución de desoxicolato de sodio al 10% (tubo de prueba). Se ponen a incubar ambos tubos a 35°C.

*Prueba positiva:* se observa que el tubo de prueba se torna transparente antes de las 2 horas de incubación, mientras que el control permanece turbio.

### 5.15. Desarrollo en caldo NaCl 6.5%)

Se prepara una suspensión del microorganismo a ensayar en un caldo o solución fisiológica. Se inoculara una gota de esta suspensión a cada uno de los tubos (tubo con NaCl al 6,5% y tubo control con caldo nutritivo normal). A las 18-24 h se observa la turbiedad.

**Prueba positiva:** ambos tubos turbios.

**Prueba negativa:** turbio sólo el tubo control.

*Prueba inválida:* Ninguno de los tubos presenta turbiedad.

### 5.16. Sensibilidad vancomicina

Se siembra una placa de agar sangre a partir de un cultivo fresco y se coloca un disco de vancomicina de 30 µg. A las 18 - 24 horas se observa la formación o no de un halo de inhibición

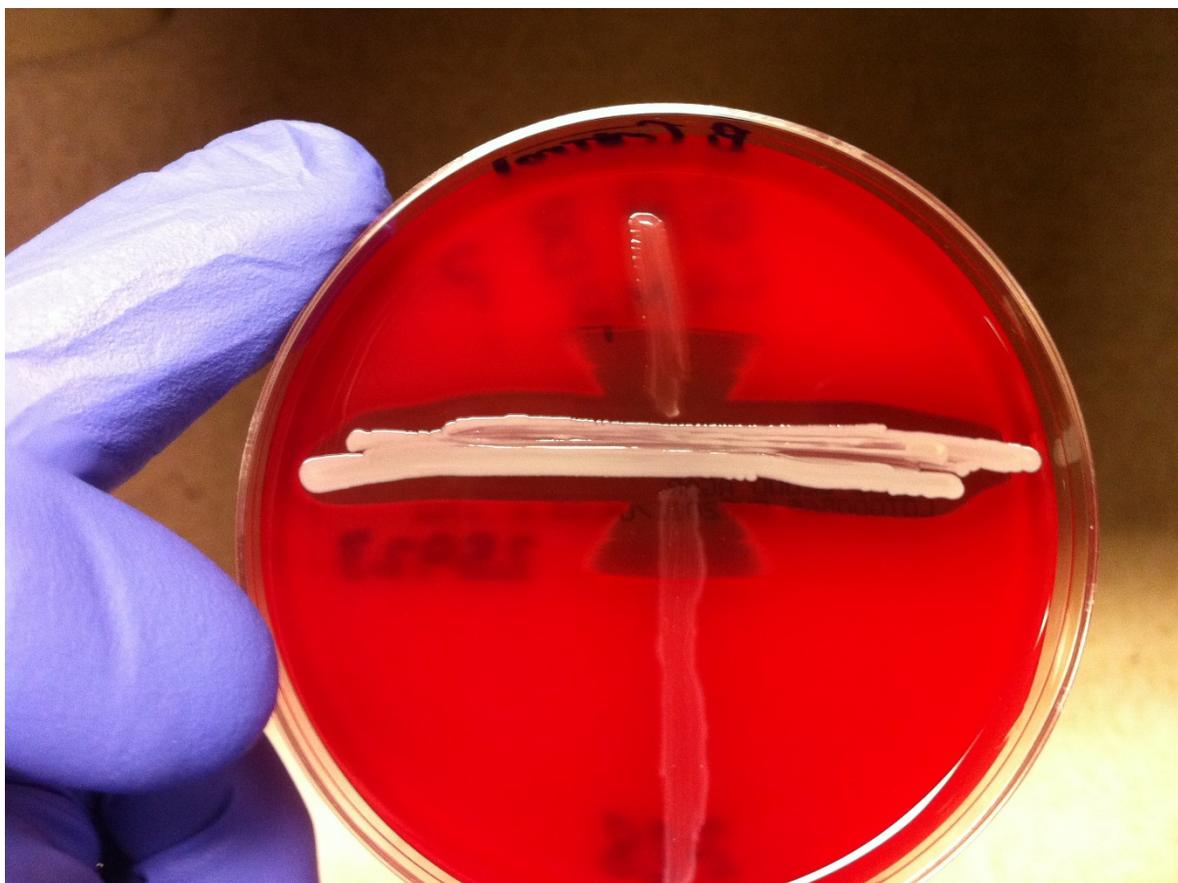
Reacción positiva: Presencia de algún halo de inhibición:

Reacción negativa: Ausencia de halo

### 5.17. Prueba de CAMP

En una placa de agar sangre 5% con sangre ovina, sembrar una estría con una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Realizar otra estría en forma perpendicular a la anterior con el estreptococo B hemolítico . No tocar la estría del estafilococo: llegar a 1 mm de la misma.

*Lectura:* a las 24- 48 h se produce un refuerzo de la hemólisis del estafilococo quedando una zona francamente hemolisada en forma de punta de flecha (prueba positiva).



Prueba de CAMP positiva. *S. agalactiae*

## 5.18. Movilidad

Se utiliza el medio SIM. Se inocula con pinche en línea recta. Incubar a 37°C 18-24 hs.

Prueba positiva: se observa crecimiento bacteriano por fuera de la punción, el medio se observa turbio

## 6. Bibliografía

Sparo M, Sutich E, Lopardo H. Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos. En: Lopardo H, Predari SC, Vay C. (editores). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Volumen I. Bacterias de importancia clínica. Parte II.a.2. Cocos gram positivos catalasa negativos. Publicación on-line. [www.aam.org.ar](http://www.aam.org.ar), p. 12-81, 2016.

Lopardo H. Estreptococos del grupo viridans. En: Lopardo H, Predari SC, Vay C. (editores). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Volumen I. Bacterias de importancia clínica. Parte II.a.2. Cocos gram positivos catalasa negativos. Publicación on-line. [www.aam.org.ar](http://www.aam.org.ar), p. 132-174, 2016.

Carroll KC, Pfaller MA Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2019

Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PAD, Bouvet A. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2003;53:631-45. 10.1099/ijs.0.02361-0

Keith ER, Podmore RG, Anderson TP, Murdoch DR. Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. J Clin Microbiol 2006;44:923-7. 44/3/923 [pii];10.1128/JCM.44.3.923-927.2006

Téllez A, Ambrosioni J, Llopis J, Pericàs JM, Falces C, Almela M et al. Epidemiology, Clinical Features, and Outcome of Infective Endocarditis due to Abiotrophia Species and Granulicatella Species: Report of 76 Cases, 2000-2015. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2018;66:104-11.110.1093/cid/cix752

Rasmussen M. Aerococcus: an increasingly acknowledged human pathogen. Clinical Microbiology and Infection 2016;22:22-7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.026>

Facklam R, Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin Microbiol Rev 1995;8:479- 95

UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Streptococcus* species, *Enterococcus* species and morphologically similar organisms. PHE, NHS, 2021, ID 4 | Issue number: 4.

<https://www.gov.uk/government/publications/smi-id-4-identification-of-streptococcus-species-enterococcus-species-and-morphologically-similar-organisms>