



# UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Utilización del CHROMagar Orientation en el proceso de identificación de enterobacterias ambientales y otras especies de importancia médica

## **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

## **AUTOR**

Tito García, Angel Julian

(ORCID: 0009-0006-0474-3743)

## **ASESOR**

Guerra Santa Cruz, Alcides

(ORCID: 0000-0002-5130-8190)

Lima, Perú

2024

## **Metadatos Complementarios**

### **Datos de Autor**

**Autor:** Tito García, Angel Julian

**Tipo de documento de identidad:** DNI

**Número de documento de identidad:** 73043501

### **Datos del Asesor**

**Autor:** Guerra Santa Cruz, Alcides

**Tipo de documento de identidad:** DNI

**Número de documento de identidad:** 28260663

### **Datos de los Miembros del Jurado**

**JURADO:** Foy Valencia, Enzo Carol

**DNI:** 07006149

**Código ORCID:** 0000-0001-7591-813X

**JURADO:** Dávila Robles, Miguel Germán

**DNI:** 07261702

**Código ORCID:** 0000-0002-7429-4836

**JURADO:** Fernández Tuesta, Daniel

**DNI:** 09839931

**ORCID:** 0000-0001-6653-0109

### **Datos de la investigación**

Campo del conocimiento OCDE:1.06.01

Código del programa: 51120

## DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, **ANGEL JULIAN TITO GARCÍA**, con código de estudiante N° **201212106**, con (DNI o Carné de Extranjería<sup>1</sup>) N° **73043501**, con domicilio en **MZ. D LT. 24 GR.5 AH. NUEVO PROGRESO**, distrito **VILLA MARIA DEL TRIUNFO**, provincia y departamento de **LIMA**.

En mi condición de bachiller en **BIOLOGIA** de la Facultad de Ciencias Biológicas, declaro bajo juramento que:

(El/la) presente (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) titulado: "**Utilización del CHROMagar Orientation en el proceso de identificación de enterobacterias ambientales y otras especies de importancia médica.**" es de mi única autoría, bajo el asesoramiento del docente **Alcides Guerra Santa Cruz**, y no existe plagio y/o copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica o de investigación, universidad, etc; (el/la) cual ha sido sometido (a) al antiplagio Turnitin y tiene el 7% de similitud final.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación), el contenido de estas corresponde a las opiniones de ellos, y por las cuales no asumo responsabilidad, ya sean de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de internet.

Asimismo, ratifico plenamente que el contenido íntegro del(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) es de mi conocimiento y autoría. Por tal motivo, asumo toda la responsabilidad de cualquier error u omisión en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) y soy consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.


En caso de falsa declaración, me someto a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y a los dispositivos legales nacionales vigentes.

Surco, 11 de abril del 2024



ANGEL JULIAN TITO GARCÍA

(N° DNI)73043501



Mg. Mario Martín Pauta Gálvez  
Jefe Unidad Grados y Títulos  
FCB

<sup>1</sup> Se debe colocar la opción que corresponda, realizar lo mismo en todo el texto del documento.

# Utilización del CHROMagar Orientation en el proceso de identificación de enterobacterias ambientales y otras especies de importancia médica

## INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>7</b> %	<b>7</b> %	<b>2</b> %	<b>4</b> %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>Submitted to Universidad Ricardo Palma</b> Trabajo del estudiante	<b>2</b> %
<b>2</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>silو.tips</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>4</b>	<b>prezi.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>5</b>	<b>jidc.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>6</b>	<b>m.moam.info</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>repositorio.urp.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>8</b>	<b>uvadoc.uva.es</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %

9

[www.cp2.g12.br](http://www.cp2.g12.br)

Fuente de Internet

<1%

---

10

[www.passeidireto.com](http://www.passeidireto.com)

Fuente de Internet

<1%

---

11

Submitted to UC, Irvine

Trabajo del estudiante

<1%

---

12

[es.slideshare.net](http://es.slideshare.net)

Fuente de Internet

<1%

---

13

[repositorioinstitucional.buap.mx](http://repositorioinstitucional.buap.mx)

Fuente de Internet

<1%

---

14

[repositorium.sdum.uminho.pt](http://repositorium.sdum.uminho.pt)

Fuente de Internet

<1%

---

15

[www.csidiomas.ua.es](http://www.csidiomas.ua.es)

Fuente de Internet

<1%

---

16

"Erratum", FEMS Microbiology Letters,  
11/1991

Publicación

<1%

---

17

C. Scarparo, P. Piccoli, P. Ricordi, M. Scagnelli.  
"Evaluation of the DipStreak, a New Device  
with an Original Streaking Mechanism for  
Detection, Counting, and Presumptive  
Identification of Urinary Tract Pathogens",  
Journal of Clinical Microbiology, 2002

Publicación

<1%

---

18

[debuyermandoline.blogspot.com](http://debuyermandoline.blogspot.com)

Fuente de Internet

<1 %

19

[www.laprensahn.com](http://www.laprensahn.com)

Fuente de Internet

<1 %

20

David Montes-Iturrizaga, Héctor Aponte, Sonia Valle-Rubio. "Un nuevo humedal artificial en la costa central de Perú: primera caracterización de su avifauna", Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2023

Publicación

<1 %

21

[fac.umc.edu.dz](http://fac.umc.edu.dz)

Fuente de Internet

<1 %

22

[repositorio.ulima.edu.pe](http://repositorio.ulima.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

23

[www.ajol.info](http://www.ajol.info)

Fuente de Internet

<1 %

24

"Advances in Information and Communication", Springer Science and Business Media LLC, 2021

Publicación

<1 %

25

[epdf.tips](http://epdf.tips)

Fuente de Internet

<1 %

26

[fr.wikipedia.org](http://fr.wikipedia.org)

Fuente de Internet

<1 %

---

Excluir citas            Activo

Excluir bibliografía    Activo

## **DEDICATORIA**

*Dedicado a Bertha García y Renato Tito mis padres por todo el amor y apoyo incondicional gracias a ustedes sé que todo es posible.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al profesor Tomas Agurto por sus consejos en la elaboración de esta tesis.

En segundo lugar, al Lic. Alcides Guerra Santa Cruz, mi asesor de tesis quien ha sido un soporte importante para la culminación de mi tesis.

Agradezco también a Profesor Jorge Mariazza por su ayuda y apoyo.

Sin duda a mis amigos de la universidad Areliss, Carlitos y Fernando personas con las que estoy muy agradecida, compañeros del trabajo y familiares.

# INDICE

## Contenido

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	10
<b>III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	12
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>4.1. Objetivo general</b> .....	12
<b>4.2. Objetivo específico</b> .....	13
<b>4.2.1.</b> Obtener mayores conocimientos respecto de cómo se comporta el medio CHROMagar Orientation frente a aislamientos bacterianos de procedencia no clínica, caracterizando el aspecto y cromogenicidad de cada cepa en estudio. ....	13
<b>4.2.2.</b> Caracterizar en particular, la cromogenicidad de <i>Vibrio cholerae</i> .....	13
<b>4.2.3.</b> Promover el uso y aplicación del medio de cultivo CHROMagar Orientation en el estudio de bacterias procedentes del medioambiente. ....	13
<b>V. MARCO TEÓRICO</b> .....	13
<b>5.1. CHROMagar Orientation</b> .....	13
<b>5.2. Fundamentos del CHROMagar Orientation</b> .....	13
<b>5.3. Galactósidos, Glucósidos y Cromogenia</b> .....	15
<b>5.3.1. Concepto de galactósido</b> .....	15
<b>5.3.2. Concepto de glucósido</b> .....	15
<b>5.3.3. Compuesto cromóforo</b> .....	15
<b>VI. ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>VII. HIPOTESIS</b> .....	18
<b>VIII. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	19
<b>7.1. Lugar de ejecución</b> .....	19
<b>7.2. Diseño y método</b> .....	19
<b>7.3. Operacionalización de variables</b> .....	19
<b>7.4. Cepas utilizadas</b> .....	19
<b>7.5. Siembra</b> .....	20
<b>7.6. Incubación</b> .....	20
<b>7.7. Obtención de datos y caracterización</b> .....	20
<b>7.8. Comparación</b> .....	21
<b>IX. RESULTADOS</b> .....	21

<b>X. DISCUSION.....</b>	<b>26</b>
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>32</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>34</b>
<b>XIII. ANEXOS .....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Comparación en la identificación final de enterobacterias ambientales entre ABIS Online y CHROMagar Orientation. \_\_\_\_\_22

**Tabla 2.** Cuadro de colores para identificación de cepas ambientales en CHROMagar Orientation. \_\_\_\_\_24

**Tabla 3.** Cuadro de colores para identificación de cepas control en CHROMagar Orientation. \_\_\_\_\_24

**Tabla 4.** Resultados bioquímicos para la identificación de la primera remesa de cepas del stock (Excretas de *Leucophaeus pipixcan* (“gaviota de Franklin”). \_\_\_\_\_36

**Tabla 5.** Resultados bioquímicos para la identificación de la primera remesa excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”). \_\_\_\_\_36

**Tabla 6.** Resultados bioquímicos para la identificación de la primera remesa Excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”) (HCPA), 24-02-2022 (excepto la cepa SA-1.4 procedente de heces de *Egretta caerulea* (“garza azul”). \_\_\_\_\_37

**Tabla 7** Resultados bioquímicos para identificación de la segunda remesa Excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”). \_\_\_\_\_38

**Tabla 8** Resultados bioquímicos para identificación de la tercera remesa excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”). \_\_\_\_\_39

**Tabla 9.** Resultados bioquímicos en la Identificación de las cepas control. \_\_\_\_\_40

# ÍNDICE DE FIGURAS, FLUJOGRAMAS Y GRAFICAS

<b>Grafica N° 1.</b> Gráfica circular de porcentajes para la identificación de las 39 bacterias ambientales en el CHROMagar Orientation_____	<b>23</b>
<b>Figura N° 1.</b> Coloración de <i>Escherichia coli</i> en CHROMagar Orientation.____	<b>25</b>
<b>Figura N° 2.</b> Prueba de la Ureasa en Agar Urea resultado negativa_____	<b>26</b>
<b>Figura N° 3.</b> Coloración de azul metálica de <i>Salmonella enterica diarizonae</i> en CHROMagar Orientation_____	<b>27</b>
<b>Figura N° 4.</b> Coloración de pigmento rojo prodigiosina en <i>Serratia marcescens</i> en CHROMagar Orientation_____	<b>28</b>
<b>Figura N° 5.</b> Coloración de lila de <i>Vibrio cholerae</i> en CHROMagar Orientation_____	<b>29</b>
<b>Figura N° 6.</b> Coloración de lila de <i>Shewanella algae</i> en CHROMagar Orientation_____	<b>30</b>
<b>Figura N° 7.</b> Coloración de lila de <i>Shewanella putrefaciens</i> en CHROMagar Orientation:_____	<b>31</b>
<b>Figura N° 8.</b> Registros fotográficos_____	<b>41</b>
<b>Flujograma 1 .</b> Utilización del CHROMagar Orientation en muestras ambientales_____	<b>35</b>

## RESUMEN

Como es conocido, la utilización del CHROMagar Orientation está destinada para el aislamiento de cepas bacterianas en el ámbito clínico (urocultivos) debido a su efectividad y rapidez en la obtención de los resultados. En este proyecto se compararon 39 cepas de origen ambiental (excretas de las aves acuáticas *Phalacrocorax brasilianus*, *Leucophaeus pipixcan* y *Egretta caerulea*) previamente identificadas mediante métodos tradicionales (en agares MacConkey, TBCS, LIA, TSI, MIO y citrato de Simmons, contando además con la base de datos del software ABIS Online). El stock de cepas se refrescó y viabilizó en caldo para ser sembrado en biplacas de CHROMagar Orientation (Valtek). El matiz de las colonias se registró tomando como pauta las diferentes coloraciones establecidas para dicho medio. Para 39 cepas que conformaron el stock proporcionado, seis fueron erróneamente identificadas como *Yersinia massiliensis* (03), *Klebsiella oxytoca* (02) y *Morganella morganii* subespecie *sibonii* (01). Después de la resiembra de dichos aislamientos en CHROMagar Orientation y los resultados de las pruebas a los que fueron sometidos, se concluyó que estas cepas correspondieron a *Escherichia coli* (de coloración rosa-violáceo o malva en CHROMagar). De las 33 cepas restantes, 06, registran su color específico por primera vez en el CHROMagar Orientation: *Serratia marcescens* (01), *Shewanella algae* (03), *S. putrefaciens* (01) y *Vibrio cholerae* (01), este último, contrastado con una cepa de control clínico del INS. Se destaca la presencia de una cepa mutante de *Salmonella* (T4-7.2), haciendo hincapié en que el excedente de cepas probadas se clasificó adecuadamente.

De acuerdo a lo observado se puede concluir que el uso del CHROMagar Orientation es perfectamente aplicable en microbiología ambiental debido a la rápida obtención de los resultados y su confiabilidad y estabilidad en la cromogenicidad de las cepas, superando en gran medida al agar MacConkey.

**Palabras clave:** CHROMagar Orientation, coloración, cromógeno

## ABSTRACT

As is known, the use of CHROMagar Orientation is intended for the isolation of bacterial strains in the clinical setting (urine cultures) due to its effectiveness and speed in obtaining results. In this project, 39 strains of environmental origin were compared (excreta from the aquatic birds *Phalacrocorax brasilianus*, *Leucophaeus pipixcan* and *Egretta caerulea*) previously identified by traditional methods (in MacConkey, TBCS, LIA, TSI, MIO and Simmons citrate agars, also counting on ABIS Online software database). The stock of strains was refreshed and made viable in broth to be seeded on CHROMagar Orientation biplates (Valtek). The shade of the colonies was recorded taking as a guideline the different colorations established for said medium. Of the 39 strains that made up the stock provided, six were improperly identified as *Yersinia massiliensis* (03), *Klebsiella oxytoca* (02) and *Morganella morganii* subspecies *sibonii* (01). After the replanting of these isolates in CHROMagar Orientation and the results of the tests to which they were subjected, it was concluded that these strains corresponded to *Escherichia coli* (pink-violet or mauve in color in CHROMagar). Of the 33 remaining strains, six register their specific color for the first time in the CHROMagar Orientation: *Serratia marcescens* (01), *Shewanella algae* (03), *S. putrefaciens* (01) and *Vibrio cholerae* (01), the latter, contrasted with an INS clinical control strain. The presence of a mutant strain of *Salmonella* (T4-7.2) is highlighted, emphasizing that the surplus of tested strains was properly classified.

According to what has been observed, it can be concluded that the use of CHROMagar Orientation is perfectly applicable in environmental microbiology due to the rapid obtaining of results and its reliability and stability in the chromogenicity of the strains, greatly surpassing MacConkey agar.

Keywords: CHROMagar Orientation, coloration, chromogen.

## I. INTRODUCCIÓN

En 1960 Phillip Edwards y William Ewing publicaron el artículo: “The principal divisions and groups of Enterobacteriaceae and their differentiation” (International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy; 10: 1-12). La familia se agrupaba en cuatro "Divisiones", cada una de las cuales contenía dos o más de los "Grupos" reconocidos por el Subcomité de Enterobacteriaceae del Comité Internacional de Nomenclatura. En 1985, J. J. Farmer III y colaboradores divulgaron el artículo clásico: “Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens” (Journal of Clinical Microbiology; 21: 46-76), que marcaría un hito en la clasificación de este grupo de bacterias, pasando (en aquella época, [1972]), de 11 géneros y 26 especies, a 22 géneros, 69 especies y 29 grupos entéricos, gracias a DNA-pruebas; no obstante, este numeroso grupo de expertos manifestó lo siguiente: “Hacemos hincapié en que del 80 al 95% de todos los aislamientos vistos en el entorno del hospital general, las cepas que se detecten corresponderán a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* o *Proteus mirabilis*. Más del 99% de todos los aislamientos clínicos pertenecerán a sólo 23 especies, y 74 organismos restantes comprenderán menos del 1% de las Enterobacteriaceae encontradas en las muestras clínicas. Se insta al lector a mantener esta distribución en mente y no sentirse abrumado con el gran número de nuevas especies. Esto se ejemplifica mejor con el siguiente consejo: “Cuando escuche cascos, piense en caballos, no en cebras”. Han pasado casi 40 años desde aquel entonces, y el incremento de especies y variedades ha continuado aumentando abrumadoramente, en virtud de la taxonomía molecular (que asimismo ha generado inevitables remociones y propuesto nuevos géneros y especies de diverso origen), obligando a muchos laboratorios en el mundo a recurrir a



métodos analíticos a la vez que sofisticados, costosos, pero eficientes, considerando sobremanera las restricciones que impone el diagnóstico fenotípico.

El mejor ejemplo de lo manifestado lo constituye la enorme cuantía de especies que a la fecha han aparecido, lo cual ha suscitado que el orden Enterobacteriales (con una única familia: Enterobacteriaceae [(Rahn, 1937, Adeolu et al. 2016)], posea hoy en día, siete familias adicionales: Erwiniaceae (Adeolu et al. 2016), Pectobacteriaceae (Adeolu et al., 2016), Yersiniaceae (Adeolu et al., 2016), Hafniaceae (Adeolu et al., 2016), Morganellaceae (Adeolu et al., 2016), Budviceaceae (Adeolu et al., 2016) y Thorselliaceae (Kampfer et al., 2015), todas incluidas dentro de un nuevo orden: Enterobacterales (Morales et al., 2019). El agar MacConkey se ha constituido en uno de los pilares fundamentales para el aislamiento de las enterobacterias y otros microorganismos capaces de superar la presencia de sus inhibidores; sin embargo, con el devenir del tiempo han aparecido otros medios, cuya eficiencia puede llegar a ser superior para algunos fines, tal es el caso del CHROMagar Orientation que se aplica en el presente trabajo.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Quienes ofrecen el CHROMagar Orientation en nuestro medio (como por ejemplo la firma comercial Andina médica), lo han recomendado para el uso casi exclusivo del procesamiento de urocultivos (solicitados esencialmente para enterobacterias), citando el siguiente grupo de microorganismos para el cual es útil: *E. coli* (generando colonias rojo oscuro a rojizo), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* (grupo KESC), produciendo colonias azul metálico (+/- halo rojizo), *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* (con halos de color beige-marrón), *P. vulgaris* (colonia azul con halo marrón), dentro del grupo de las enterobacterias, y también, de empleo pertinente para el crecimiento de otros

bacilos gramnegativos no-enterobacterias (p. e. *Pseudomonas*, con colonias con pigmentación fisiológica verde) e incluso, útil para *Enterococcus* (de crecimiento azul turquesa) y *Candida albicans* (con formación de colonias puntiformes de color crema), con sensibilidad/especificidad entre 93,3 a 100%. Los comerciantes sostienen, que una vez que se han reconocido rápidamente las colonias debido a la cromogenia que producen, es necesario el uso de una bioquímica cortísima para la confirmación de *E. coli* (p. e. a través del test de indol), y la prueba TDA, con el test con cloruro férrico, para la determinación de *Proteus spp.*, *Morganella* y *Providencia*. De esta manera, se reduciría el uso de un pool bioquímico más extenso (p. e. TSI-LIA-SIM o MIO-CITRATO-UREA). Ohtaki et al., (2020) recomiendan el empleo del test de indol, lisina y ornitina descarboxilasa (a través del caldo según Moeller) y el test de H<sub>2</sub>S para la confirmación de cepas que se ajusten solamente a cuatro colores: a) rosa-violáceo, b) azul metálico, c) azul agua y d) marrón (todos según el color de las colonias obtenidas en CHROMagar Orientation).

El CHROMagar Orientation no es de ningún modo un agar selectivo exclusivamente para enterobacterias, y es en cierto grado, comparable y hasta mejor que el medio MacConkey (que de común se emplea en estos casos), y podría ser aprovechado para la selección preliminar e incluso significativa de colonias bacterianas procedentes de muestras ambientales, como se propone en el siguiente trabajo, otorgándonos mayor grado de confiabilidad en el aspecto y estabilidad cromogénica en las cepas que desarrollen en este medio , incluso de brindarnos conocimiento sobre las características de enterobacterias que no se aíslan con frecuencia en el laboratorio clínico-microbiológico, razón por la cual será probado en la tesis que a continuación se presenta.

### **III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Esta investigación nos permite adquirir un mayor grado de conocimiento al respecto del CHROMagar Orientation, siendo de gran utilidad para quienes trabajen con este medio de cultivo para su aplicación en muestras ambientales.

Este trabajo posee el beneficio de brindarnos mayor grado de confianza en el diagnóstico, por la mejor estabilidad de las cepas aisladas, sobre todo en lo que a su persistencia cromogénica se refiere. Las cepas desarrolladas en MacConkey agar, si bien producen colores reconocibles para los microorganismos lactosa positivos y lactosa negativos, estos no se mantienen en el tiempo con la misma idoneidad, como ocurre en el caso del CHROMagar Orientation. La estabilidad cromogénica que se logra al utilizar este medio, impide las confusiones o dudas en el momento de la lectura de las colonias; es decir, los matices de los cultivos persisten varias semanas después de su crecimiento en superficie. Muchas veces existe duda en el registro de las colonias lactosa positiva débiles, y ello crea mucha confusión.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Identificar y valorar la cromogenicidad mediante el uso del medio de cultivo CHROMagar Orientation para enterobacterias medioambientales.

## 4.2. Objetivo específico

- 4.2.1. Obtener mayores conocimientos respecto de cómo se comporta el medio CHROMagar Orientation frente a aislamientos bacterianos de procedencia no clínica, caracterizando el aspecto y cromogenicidad de cada cepa en estudio.
- 4.2.2. Caracterizar en particular, la cromogenicidad de *Vibrio cholerae*.
- 4.2.3. Promover el uso y aplicación del medio de cultivo CHROMagar Orientation en el estudio de bacterias procedentes del medioambiente.

## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1. CHROMagar Orientation

El CHROMagar es un medio de cultivo cromogénico no selectivo muy utilizado para la identificación en microbiología clínica para el diagnóstico de bacterias uropatógenas. Posee un alto valor para la detección de *Escherichia coli*, la cual produce colonias de color rosa a rosa oscuro, mientras que *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp, y *Serratia* spp. desarrollan una coloración azul-celeste o azul oscuro. Para el caso de *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* se produce color beige pálido con halos de color marrón (Farfour et al. 2019). Este medio genera colores estables en el tiempo.

### 5.2. Fundamentos del CHROMagar Orientation

**Compuesto cromóforo RED-GAL:**

Existen bacterias, como es el caso de *E. coli*, que poseen la enzima betagalactosidasa, capaz de hidrolizar las moléculas de lactosa (un disacárido compuesto de galactosa y glucosa [galactósido]). En este caso la glucosa de este galactósido, ha sido reemplazada por un cromóforo incoloro (6-cloro-3-indoxil), de manera que en vez de la galactosa/glucosa, se forma el cromógeno 6-cloro-3-indol-beta-D-galactopiranosido, conocido también como red-Gal. Ahora bien, mediante la enzima betagalactosidasa, *E. coli*, rompe o hidroliza el red-Gal, liberando galactosa (energía para la bacteria) y el cromóforo. Esta reacción es repetida por todas las cepas de *E. coli* que forman la colonia sobre el CHROMagar y el producto se precipita y se acumula en ésta, la acumulación de los componentes cromóforos forman dímeros los cuales al entrar en contacto con el oxígeno presente el medio se torna una coloración rojo-rosáceo o malva. Es así que la colonia de *E. coli* se identifica por ese matiz. En realidad, el color depende del cloro del cromóforo y en qué posición se encuentra.

#### **Compuesto cromóforo X-Gluc:**

Otras bacterias, como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* (KESC) poseen las enzimas beta-galactosidasa y beta-glucosidasa, que actúa, una sobre el red-Gal, y la otra, sobre el glucósido 5-bromo-indoxil-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido (o X-Gluc). Como se forma color rojo y color verde-turquesa, la “mezcla” (o la expresión de las dos enzimas) resulta de color azul, que es como identificamos a estas bacterias. En resumen, *E. coli* posee actividad de betagalactosidasa solamente y el grupo KESC, posee las dos enzimas.

#### **Compuesto cromóforo Triptófano:**

Un tercer caso se presenta en el grupo *Proteus-Morganella-Providencia*, que no poseen ninguna de estas enzimas, pero sí tiene triptofanasa y triptófano desaminasa, que

hidroliza el triptófano formando el ácido indol pirúvico el cual al reacción con las moléculas de hierro presentes en el CHROMagar, dando la colonia de color beige-marrón. Otras bacterias pueden formar otros matices, en dependencia de que no posean ninguna de estas enzimas o si producen pigmentos propios.

### **5.3. Galactósidos, Glucósidos y Cromogenia**

#### **5.3.1. Concepto de galactósido**

Se trata de un glucósido que produce galactosa después de un proceso de hidrólisis (DiccionarioMedico.net).

#### **5.3.2. Concepto de glucósido**

Son moléculas compuestas por un glúcido (generalmente un monosacárido) y un compuesto no glucídico (diccionario médico-biológico, histórico y etimológico).

#### **5.3.3. Compuesto cromóforo**

Viene definido como un conjunto de átomos que, al absorber radiaciones luminosas, son capaces de proporcionar color a un compuesto orgánico. Es descrito como una sustancia que es capaz de absorber luz visible o energía, y excitarse para así emitir gran variedad colores, dependiendo de su longitud de onda de la energía emitida por el cambio de nivel energético de sus electrones, de estado excitado a estado base. Ejemplos: clorofila, hemoglobina, hemocianina, malaquita y amatista. Se tiene como fundamento del CHROMagar Orientation la Red-Gal y X-Gluc.

## **VI. ANTECEDENTES**

Pese a la realidad expuesta en la introducción de esta investigación, las especies de enterobacterias que se aíslan frecuentemente en el laboratorio clínico siguen siendo

poquísimas, en comparación con los nuevos organismos aparecidos (en su mayoría, procedentes del medio ambiente).

Odds and Baernaets (1994) fueron pioneros en el empleo de agar cromogénicos para el diagnóstico de levaduras oportunistas, como es el caso del género *Candida*. Evaluaron el CHROMagar *Candida* en 726 muestras aisladas para determinar su capacidad de crecimiento y sus colonias. Tras una incubación de 24 horas a 37°C se observó que *Candida albicans* tiene una coloración blanca a rosa clara, *Geotrichum* spp., coloración gris pálida, *Saccharonuces cerevisiae*, coloración verde con halo oscuro, entre las más importantes.

Merlino et al., 1996 recomiendan el empleo del CHROMagar Orientation para el aislamiento rápido de enterobacterias de origen clínico, debido a su eficiencia y costo, manifestando no obstante, que la utilización de la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), cuyo empleo se está extendiendo en los laboratorios de gran escala, no se encuentra al alcance, ni es práctico para laboratorios de escala menor, citando que el principal escollo son los gastos de instalación. Estos investigadores han demostrado que la utilización del medio CHROMagar Orientation es un método rápido, económico y eficiente (~100%), que se puede utilizar en el trabajo de laboratorio de rutina.

Samra et al., (1998) usaron el medio cromogénico CHROMagar Orientation y lo compararon con los medios tradicionales como el agar MacConkey, Agar Soya Trypticasa con sangre de cordero desfibrilada al 5% en 900 muestras de infección del tracto urinario de pacientes del Centro Médico Rabin, Petah Tiqva, Israel. Para los resultados obtenidos

citan el clásico color rosa-rojo para *E. coli*, para *K. pneumoniae* coloración azul metálico, una coloración beige que toman las colonias de *Providencia* y *Morganella*; asimismo, el color amarillo a verde con bordes dentados para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, al cabo de 24-36 horas. También se logró detectar las levaduras con la coloración azul. El CHROMagar Orientation resulta ser tan eficaz para la identificación como la combinación del agar MacConkey, Agar Soya Tripticasa con sangre de cordero desfibrilada al 5% juntos. Además, el CHROMagar Orientation tiene la capacidad de limitar la propagación de *Proteus* spp.

Ohkusu (2000), también lo ha recomendado para muestras tales como orina, pus, y coprocultivos generados por bacilos gramnegativos, incluso de especies clínicas diferentes a enterobacterias, resaltando su costo, eficacia y rapidez, versus los test bioquímicos.

Ohtaki et al., (2020) recomiendan empleo del medio cromogénico CHROMagar Orientation como una prueba de identificación rápida y económica con respecto a los equipos MALDI-TOF-MS de las siguientes especies: *Escherichia coli* con una coloración rosa violáceo, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes* (*Enterobacter aerogenes*) y *Enterobacter cloacae*, con coloración azul metálico y el uso de pruebas bioquímicas como indol, lisina descarboxilasa (LDC), Ornitina descarboxilasa (ODC) e hidrogeno sulfurado (H<sub>2</sub>S) para su identificación.

Siendo así, y basados en nuestra realidad, el CHROMagar Orientation suele quedar restringido al uso en el diagnóstico de UTI, en su mayoría debida a uropatógenos; sin embargo, no es un medio selectivo exclusivamente para enterobacterias y es en cierta



medida, comparable y hasta mejor que el medio MacConkey: los colores de las colonias son más estables en el tiempo, a diferencia del agar MacConkey, que suele: i- producir colonias lactosa positivo-dudosas (que generan confusión porque oxidan los carbohidratos en vez de fermentarlos, dando la falsa impresión de positividad, ii- halos ácidos de difusión a partir de las colonias aisladas, que pueden confundir al microbiólogo, y iii- menos estabilidad en el matiz natural de las colonias fermentadoras de lactosa; no obstante estas consideraciones, ambos medios (CHROMagar y MacConkey) podrían utilizarse para examinar colonias procedentes del medio ambiente (no-clínico); es decir, agua, alimentos, heces (de otros animales, etc.). El empleo del CHROMagar para muestras urinarias vendría a constituir solo una convención práctica.

En el presente trabajo se pretende examinar la cromogenicidad de cepas que provienen de animales silvestres, en este caso, cepas de enterobacterias desarrolladas generalmente en MacConkey (stock), aisladas a partir de excretas frescas de aves acuáticas residentes y migratorias, habitantes de un humedal costero de Lima (con perfil bioquímico-fisiológico conocido, obtenido mediante respuestas fenotípicas a partir de pruebas convencionales, y el software ABIS online [Online Advanced Bacterial Identification Software], según Sorescu and Stoica, 2021) cuando se siembran en CHROMagar Orientation, para, en suma, contribuir a tener una visión más amplia del empleo de este medio cuando sea aplicado a muestras ambientales.

## **VII. HIPOTESIS**

El medio de cultivo en placa CHROMagar Orientation es más eficaz y preciso que el agar MacConkey.

## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1. Lugar de ejecución

El trabajo de laboratorio y parte del de oficina se llevó a cabo en el Centro de Capacitación BiLab, sito en Calle Richard Strauss, 270-403C, Condominio Buenavista, Urbanización Los Alamos de Monterrico, Santiago de Surco, con el apoyo de laboratorios ROE, área de Microbiología ROE (Sede Santiago de Surco).

### 7.2. Diseño y método

Investigación de tipo exploratorio, diseño descriptivo

MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	INSTRUMENTOS Y FUENTES DE INFORMACIÓN	CRITERIOS Y RIGUROSIDAD DE LA INVESTIGACIÓN
Exploratorio	Descriptivo	Muestras de carácter ambiental	Observación y recopilación de información científica previa y comparación	Enfoque cualitativo

### 7.3. Operacionalización de variables

Objetivos específicos	VARIABLES	Indicador	Instrumentos	Categorización de las variables
Obtener mayores conocimientos respecto de cómo se comporta el medio CHROMagar Orientation frente al aislamiento bacteriano de procedencia no clínica, caracterizando el aspecto y cromogenicidad de cada cepa en estudio.	Cepas ambientales	Matices obtenidos luego de la siembra del stock escogido de cepas ambientales	Medio cromogénico CHROMagar Orientation Escala de matices	Cualitativa

### 7.4. Cepas utilizadas

### **Variables fijas (bióticas): cepas bacterianas.**

Se contó con un cepario (stock BiLab) de 39 microorganismos (en su mayoría del orden Enterobacterales) obtenidos principalmente a partir de excretas frescas de aves acuáticas del Humedal Poza de la Arenilla, La Punta, Callao, *Leucophaeus pipixcan* (“gaviota de Franklin”), *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”) y *Egretta caerulea* (“garceta azul”), aisladas en su gran mayoría en agar MacConkey (de perfil conocido en dicho medio), con características culturales establecidas y fenotipo determinado sobre la base de pruebas bioquímicas convencionales, con apoyo del Online Advanced Bacterial Identification Software, ABIS online (Sorescu and Stoica, 2021). El stock de cepas utilizadas se encuentra en detalle en ANEXOS.

#### **7.5. Siembra**

Las 39 cepas del stock designadas y las 2 cepas control para el estudio ya aisladas fueron sembradas con asas estériles descartables por el método de agotamiento de muestras por estriación en la superficie de biplacas del medio CHROMagar Orientation (Valtek), previa consignación de las características de las cepas en estudio, producto fundamentalmente del desarrollo en agar MacConkey y pruebas bioquímicas convencionales (~pool de 12-14 pruebas). Ver flujograma N° 1 (anexos).

#### **7.6. Incubación**

Las placas se incubaron a 37°C por espacio de 24 a 48 horas (según instrucciones del fabricante) hasta obtener el desarrollo colonial, para observar la cromogenicidad característica en dicho agar.

#### **7.7. Obtención de datos y caracterización**

Se observó y se tomó nota del color desarrollado, además de la textura, aspecto y posible desarrollo de halos y pigmentación, principalmente.

### **7.8. Comparación**

Se procedió a realizar la comparación respectiva contra la coloración y aspecto de las colonias desarrolladas en agar MacConkey, de donde han procedido los aislamientos originales.

Se registraron las semejanzas y diferencias para establecer la cualidad del medio en estudio.

## **IX. RESULTADOS**

Se evaluaron 39 microorganismos ambientales ya aislados e identificados por métodos tradicionales, obtenidos de BiLab.

Las colonias que se sembraron en biplacas del medio CHROMagar Orientation (Valtek), presentaron distintas coloraciones.

De las 39 cepas probadas que conformaron el stock proporcionado, seis fueron identificadas indebidamente como *Yersinia massiliensis* (03), *Klebsiella oxytoca* (02) y *Morganella morganii* subespecie *sibonii* (01). Después de la resiembra de dichos aislamientos en CHROMagar Orientation y los resultados de las pruebas a los que fueron sometidos, se concluyó que estas cepas correspondieron a *Escherichia coli* (de coloración rosa-violáceo o malva en CHROMagar). De las 33 cepas restantes, seis, registran su color específico por primera vez en el CHROMagar Orientation: *Serratia marcescens* (01), *Shewanella algae* (03), *S. putrefaciens* (01) y *Vibrio cholerae* (01), este último,

contrastado con una cepa de control clínico del INS (cepa non-01 147-2022). Se destaca la presencia de una cepa mutante de *Salmonella* (T4-7.2), haciendo hincapié en que el excedente de cepas probadas se clasificó adecuadamente.

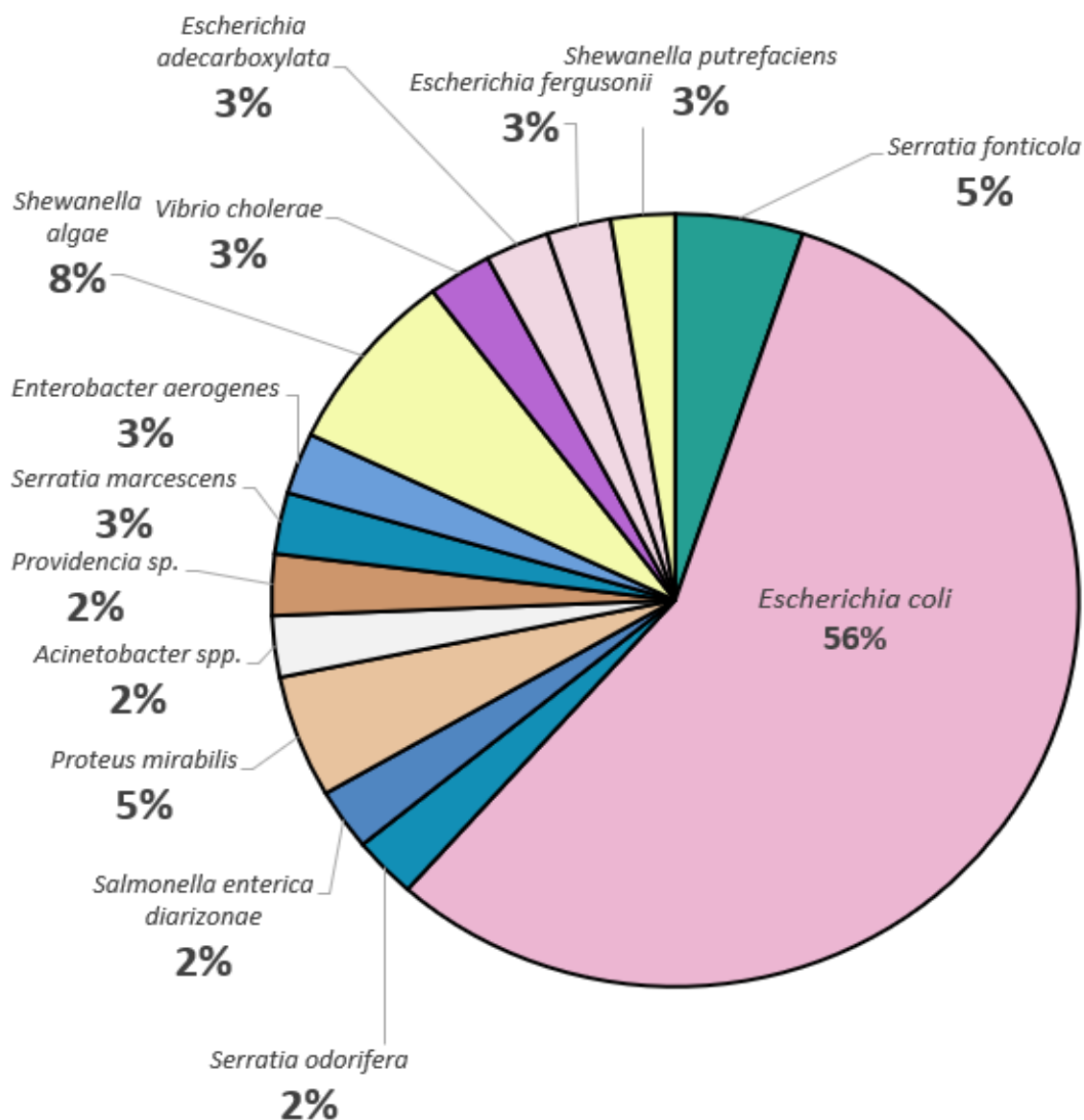
Del total de cepas sembradas en CHROMagar Orientation, 15 fueron motivo tanto de aporte como de discrepancia, lo cual se muestra en la discusión.

**Tabla N° 1.** Comparación en la identificación final de enterobacterias ambientales entre ABIS Online y CHROMagar Orientation.

NUMERO	CODIGO	ESPECIE INICIAL	CHROMAGAR ORIENTATION
1	B2-7.2	<i>Serratia fonticola</i>	<i>S. fonticola</i>
2	B2-7.3	<i>S. fonticola</i>	<i>S. fonticola</i>
3	B3-7.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
4	B3-7.2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
5	B3-7.3	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
6	B4-7.1	<i>Yersinia massiliensis</i>	<i>Escherichia coli</i>
7	B6-7.1	<i>S. odorifera</i>	<i>S. odorifera</i>
8	B10Co7.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
9	B10Co7.2	<i>Y. massiliensis</i>	<i>E. coli</i>
10	T1-7.1	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
11	T3-7.1	<i>Y. massiliensis</i>	<i>E. coli</i>
12	T4-7.2	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella enterica diarizonae</i>
13	T7-7.2	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>
14	T10-7.1	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.
15	T8-7.1	<i>Providencia</i> sp.	<i>Providencia</i> sp.
16	PB8-7.15	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
17	T1-9.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>
18	1.4	<i>Shewanella algae</i>	<i>S. algae</i>
19	PC1-7.2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
20	PC1-7.3	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
21	PC4-7.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
22	PC4-7.2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

<b>23</b>	PC5-7.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<b>24</b>	PC5-7.2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<b>25</b>	PC9-7.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<b>26</b>	PC9-7.2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<b>27</b>	PC-10.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>E. coli</i>
<b>28</b>	PC-10.2	<i>E. coli</i> inactiva 2	<i>E. coli</i>
<b>29</b>	PC-10.3	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>
<b>30</b>	PC6-9.2	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>
<b>31</b>	PC6-9.3	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>
<b>32</b>	PC6-9.4	<i>S. algae</i>	<i>S. algae</i>
<b>33</b>	AV2-7.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<b>34</b>	AV4-7.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<b>35</b>	AV5-7.1	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>
<b>36</b>	AV5-7.2	<i>E. adecarboxylata</i>	<i>E. adecarboxylata</i>
<b>37</b>	AV7-7.1	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>sibonii</i>	<i>E. coli</i>
<b>38</b>	AV7-7.3	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. fergusonii</i>
<b>39</b>	CX	<i>S. putrefaciens</i>	<i>S. putrefaciens</i>

**Grafica N° 1.** Gráfica circular de porcentajes para la identificación de las 39 bacterias ambientales en el CHROMagar Orientation.



El grafico circular nos muestra que el porcentaje de bacterias ambientales aisladas y sembradas en CHROMagar Orientation es: *Escherichia coli* (56%), *Shewanella algae* (8%), *Serratia fonticola* (5%), *Proteus mirabilis* (5%), *Enterobacter aerogenes* (3%), *Escherichia adecarboxylata* (3%), *Escherichia fergusonii* (3%), *Shewanella putrefaciens* (3%), *Serratia marcescens* (3%), *Vibrio cholerae* (3%), *Salmonella enterica diarizonae* (2%), *Providencia sp.* (2%), *Acinetobacter spp.* (2%), *Serratia odorifera* (2%).

**Tabla N° 2.** Cuadro de colores para identificación de cepas ambientales en CHROMagar Orientation.

<b>CHROMagar Orientation</b>	<b>Color</b>	<b>Matiz</b>
<i>Acinetobacter</i> spp.	blanquecino	
<i>Escherichia coli</i>	rosa-violáceo (malva)	
<i>E. adecarboxylata</i>	rosa-violáceo menos intenso	
<i>E. fergusonii</i>	rosa-violáceo menos intenso	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	azul	
<i>Proteus mirabilis</i>	beige amarronado (con swarming)	
<i>Providencia</i> sp.	beige-amarronado	
<i>Salmonella enterica diarizonae</i>	azul metálico	
<i>Serratia fonticola</i>	turquesa	
<i>S. marcescens</i>	azul con pigmento rojo	
<i>S. odorifera</i>	azul	
<i>Shewanella algae/S. putrefaciens</i>	amarillento	
<i>Vibrio cholerae</i>	lila	

**Tabla N° 3.** Cuadro de colores para identificación de cepas control en CHROMagar Orientation.

<b>CHROMagar Orientation</b>	<b>Color</b>	<b>Matiz</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Azul metálico	
<i>Vibrio cholerae</i>	lila	

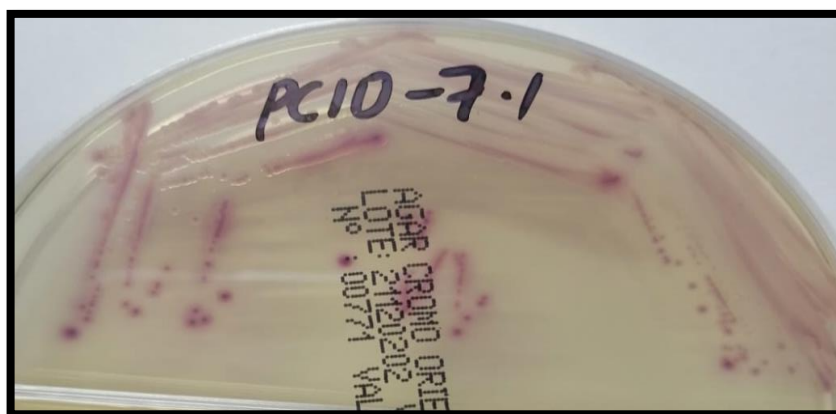


## X. DISCUSION

El empleo del CHROMagar Orientation en el ámbito de la microbiología ambiental es muy poco usado; en esta tesis se comprueba que es viable el uso de medio de cultivo CHROMagar Orientation para la identificación de enterobacterias ambientales y otras especies, como menciona Merlino et al., (1996), quien recomienda su uso debido a su eficiencia en el ámbito costo-beneficio.

### 10.1 Caso *Klebsiella oxytoca* (PC10-7.1, PC10-7.3)

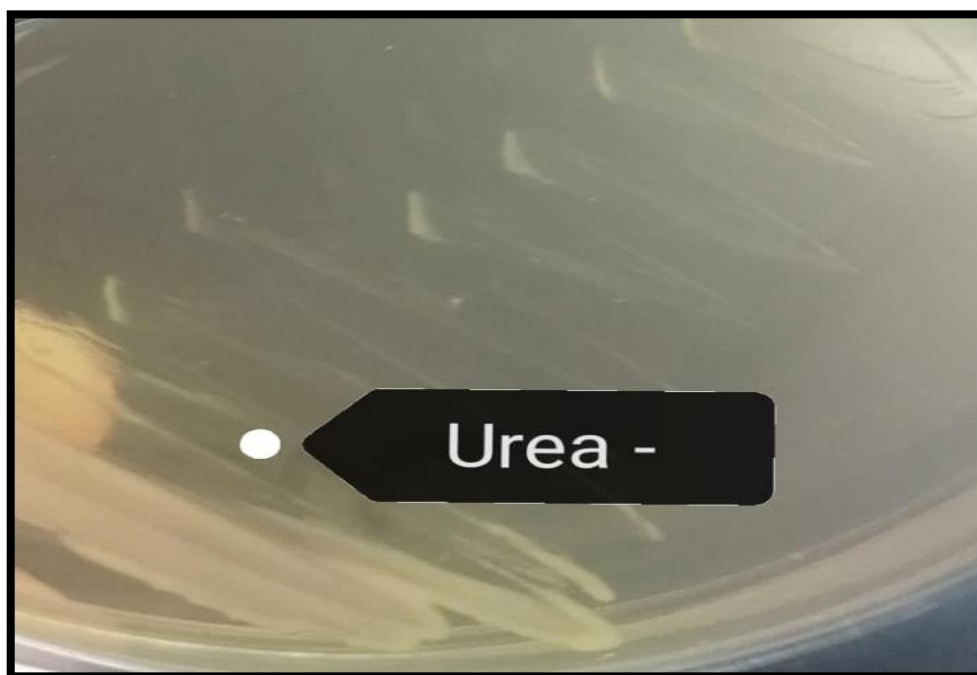
Reacciones: LAC+ (desarrollo de colonia con “velo”) OXIDASA- CATALASA+  
TSI: A/A + - LIA: K/K M-I+O-C-, sin pigmento, ABIS online S = 90,1% p = 29,2%  
reacción esperada citrato positivo. Las cepas PC10-7.1 y PC10-7.3 se identificaron inicialmente como *Klebsiella oxytoca*. También se obtuvo resultado semejante cuando se sometieron al test Online Identification of Bacteria-Microrao (p = 74,08%). Cuando ambas cepas fueron sembradas en CHROMagar Orientation, desarrollaron típicas colonias de color rojo-rosáceo, a diferencia del color azul, como señala la literatura (Ohtaki, 2000; Ohkusu et al., 2020), por tanto, fueron cepas de *Escherichia coli* que no expresaron su motilidad en medio semisólido MIO (*E. coli* inactiva) (Farmer III et al., 1985; Sorescu & Stoica, 2021).



**Figura N° 1.** Coloración de *Escherichia coli* en CHROMagar Orientation.

## 10.2 Caso *Yersinia massiliensis* (B4-7.1, B10Co-7.2, T3-7.1).

Reacciones: LAC+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K M+I+O+C-, sin pigmento, ABIS online S = 87,5% p = 59,3%. Con los resultados diferenciales introducidos en el software ABIS online, se determinaron cepas pertenecientes a *Yersinia massiliensis*. La siembra en CHROMagar Orientation permitió el desarrollo de colonias color rosa-violáceo (típico de *E. coli*). Se decidió realizar la prueba de ureasa, que resultó negativa en los tres casos (Farmer III et al., 1985). Estas cepas tuvieron que reclasificarse como *E. coli*, puesto que *Y. massiliensis* es capaz de utilizar la úrea (Merhej et al., 2008).



**Figura N° 2.** Prueba de la Ureasa en Agar Urea, resultado negativa.

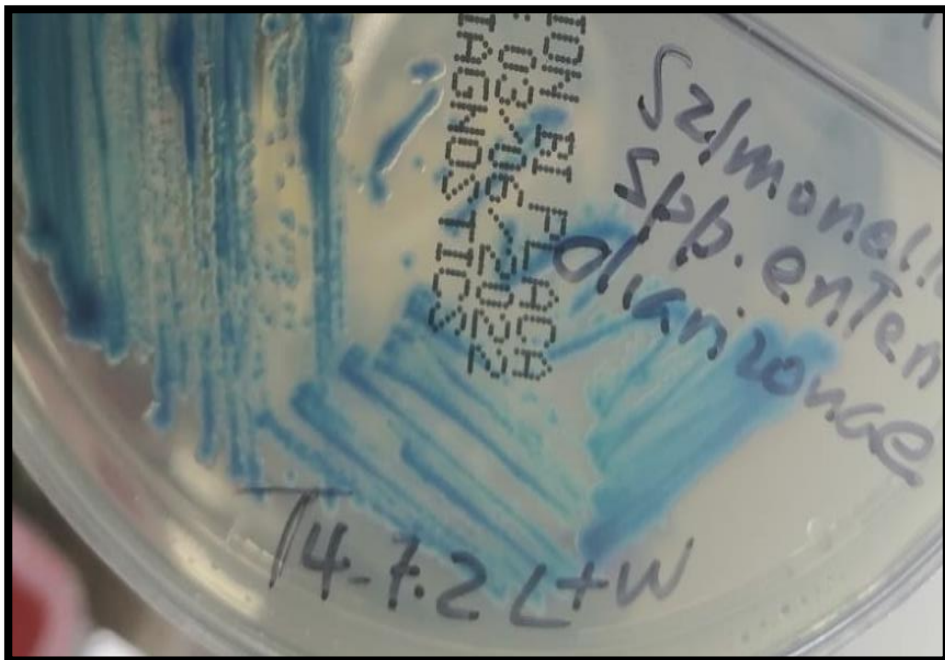
## 10.3 Caso *Salmonella* (T4-7.2).

Reacciones: LAC+<sup>W</sup> OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A +, +++ LIA: K/K M+I-O+C+, sin pigmento, ABIS online S = 98,3% p = 74,8% sin reacciones opuestas. Identificada como *Salmonella* spp. (posibilidad *S. enterica* subsp. *diarizonae*). W, débil. Confirmada con Online Identification of bacteria-Microrao: *Salmonella*

subgroup 3b (*Arizona*): 68.76% (14 pruebas) hoy, *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae* IIIb (Desai et al., 2013).

**Nota 1 para la cepa:** *Salmonella* subgrupo 3b (*S. enterica* subsp. *diarizonae*) es lactosa positiva en 85% (Farmer III et al., 1985), de modo que esta clase de cepas poseen betagalactosidasa y pueden hidrolizar galactósidos.

**Nota 2 para la misma cepa:** Existen cepas mutantes de *Salmonella* que pueden fermentar glucósidos (Schaeffler and Malamy, 1969). Al poseer ambas enzimas desarrollaron coloración azul.

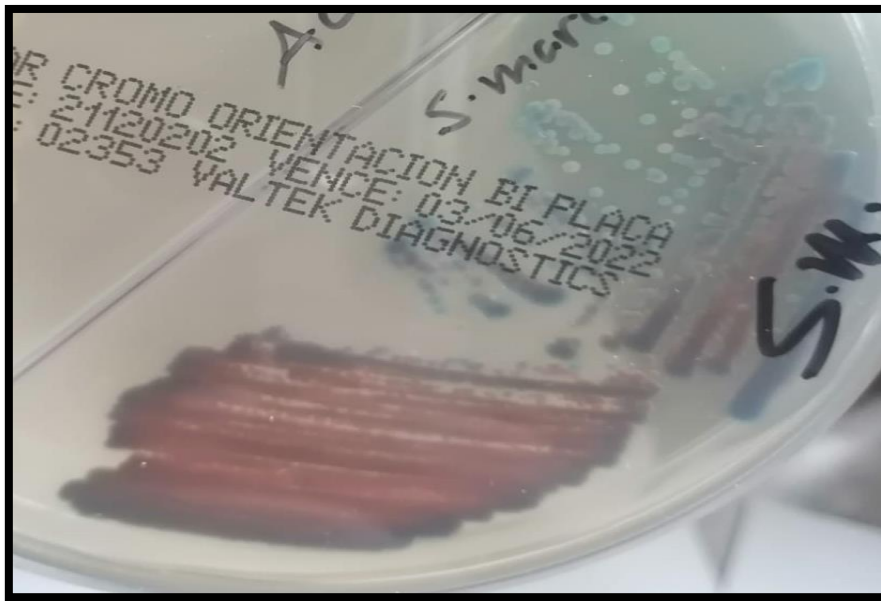


**Figura N° 3.** Coloración de azul metálica de *Salmonella enterica diarizonae* en CHROMagar Orientation.

#### 10.4 Caso *Serratia marcescens* (PB8-7.15).

Reacciones: LAC- OXIDASA (no se efectuó por la interferencia con el pigmento manifestado en la tira Bactident Merck, para la enzima) CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K M+I-O+C+, pigmento rojo (prodigiosina), ABIS online S = 90,8% p = 19,2% sin reacciones opuestas. Esta cepa desarrolló simultáneamente color azul

agua característico en CHROMagar Orientation, pero mezclado con su pigmento fisiológico rojo (prodigiosina). La literatura solo se refiere al color azul y no hace énfasis en el pigmento. Se sabe que la expresión de pigmentos puede hacerse manifiesta al cabo de algunos días cuando las cepas se dejan incubar a temperatura de salón, pero es posible que *Serratia* exprese su pigmento de un día para otro.



**Figura N° 4.** Coloracion de pigmento rojo prodigiosina en *Serratia marcescens* en CHROMagar Orientation.

#### 10.5 Caso *Leclercia* (*Escherichia*) *adecarboxylata* (AV5-7.2) y *Escherichia fergusonii* (AV7-7.3)

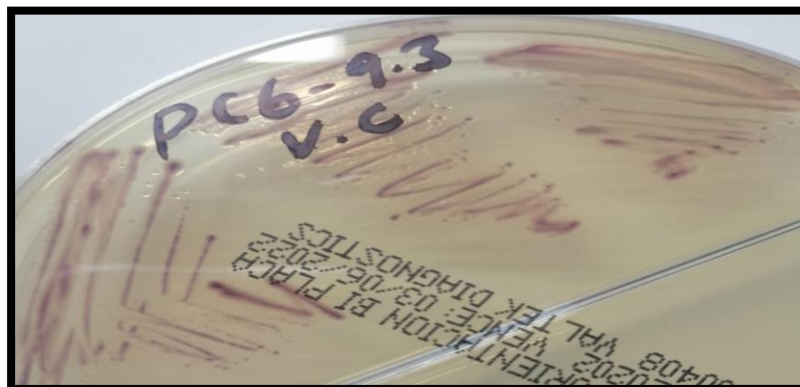
Reacciones: LAC+ OX- CAT+ A/A +++ - K/A M+ O- I+ C- *Leclercia* (*Escherichia*) *adecarboxylata* S = 94,2% p = 28,2% sin reacciones opuestas. LAC- OX- CAT+ A/A ++ - K/K M+ O+ I+ C- *E. fergusonii* S = 98,3% p = 54,7% sin reacciones opuestas. Ambas especies desarrollaron color rosa-violáceo. De aquí se podría inferir que el matiz puede aplicarse al género *Escherichia*, no solo a *E. coli*, sugiriendo realizar la diferenciación entre ambas. *E. coli* (sorbitol+) y *E. fergusonii* (sorbitol -), ambas: lisina +. *Leclercia* es lisina negativa (Tamura et al., 1986).

#### 10.6 Caso *Morganella morganii* subespecie *sibonii* (AV7-7.1).

Reacciones: LAC- OX- CAT+ K/A + - K/K M+ O- I+ C- S = 96,8% p = 61,6% sin reacciones opuestas. Esta cepa desarrolló color rojo-rosáceo suave en CHROMagar Orientation, y no el matiz amarronado para el género (Ohtaki, 2000; Ohkusu et al., 2020), además, cuando se reevaluó con Online Identification of bacteria-Microarray, resultó corresponder a *E. coli*. Se realizó la prueba de la úrea: *Morganella* es ureasa positiva (Farmer III et al., 1985). El cual salió negativa.

#### 10.7 Caso *Vibrio cholerae* (PC6-9.3).

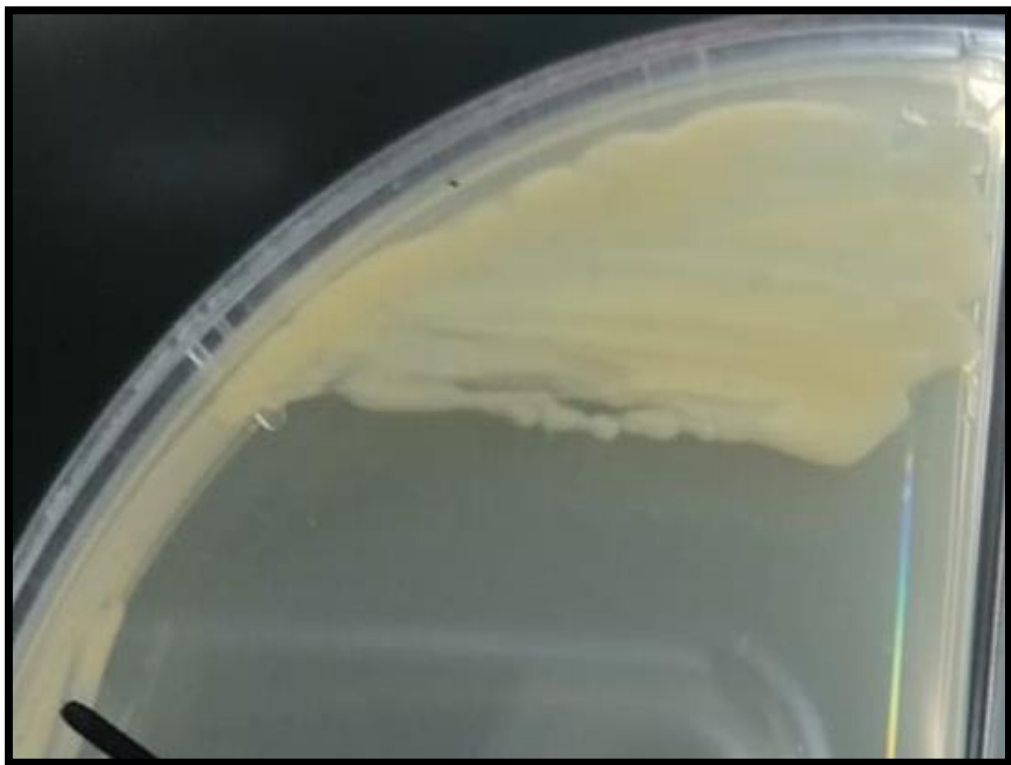
Reacciones: Creció en TCBS, SAC+ OXIDASA+ CATALASA+ TSI: A/A<sup>R</sup> LIA: K/K M+I+O+C+, sin pigmento, ABIS online S = 99% p = 36% sin reacciones opuestas. R = reversión de pico en TSI. Esta cepa desarrolló color lila en CHROMagar Orientation, al igual que la cepa de control perteneciente a *V. cholerae* non-01, proporcionada por el INS (147-2022). Este color se registra por primera vez en este medio de cultivo, pudiendo ser considerado como singular para el caso de *V. cholerae*. No sabemos exactamente el porqué del matiz lila (es decir, qué enzimas estarían actuando sobre los sustratos [¿peptona?], pero todo depende del color que emiten las colonias, de acuerdo a la mezcla de metabolitos que se acumulan en ésta).



**Figura N° 5.** Coloración de lila de *Vibrio cholerae* en CHROMagar Orientation.

#### 10.8 Caso *Shewanella algae* (SA-1.4, PC6-9.2, PC6-9.4).

Reacciones: Creció en MacConkey y TCBS. LAC- SAC- H<sub>2</sub>S+ OXIDASA+ CATALASA+ TSI: K/K - +++++ LIA: negativo M+<sup>W</sup> I-O+C-, mucoide con filancia, pigmento rosa-salmón. W = débil positivo. Para el caso de *S. algae*, es la primera vez que se obtiene el registro de color en CHROMagar Orientation. Las tres cepas estudiadas desarrollaron color amarillento y aspecto brillante.



**Figura N° 6.** Coloración de lila de *Shewanella algae* en CHROMagar Orientation.

#### 10.9 Caso *Shewanella putrefaciens* (CX).

Reacciones: Colonia SAC- en TCBS (3 mm en TSA, circular, cremosa, rosa-salmón), OX+ CAT+ K/K - +++++ (n/n) M- O - I- C-. P = 89,81% (OibM); n/n = sin reacción o negativo. Esta cepa (al igual que *Shewanella algae*) desarrolló color amarillento, lo que significa que el matiz obtenido podría considerarse propio para el género. La prueba de desarrollo de “string test” o filancia puede distinguirlas entre

sí, ya que *S. putrefaciens* es filancia negativa, en tanto *S. algae* forma cordón mucoso al querer cogerla con el asa de siembra (Mariazza y Ríos, 2020). De la misma manera, se puede emplear el SS agar, donde *S. putrefaciens* no crece y *S. algae* sí (Melvold, 2017).



**Figura N° 7.** Coloracion de lila de *Shewanella putrefaciens* en CHROMagar Orientation.

## XI. CONCLUSIONES

De este trabajo se concluye que el medio CHROMagar Orientation (Valtek) es perfectamente aplicable para el diagnóstico de cepas que provienen del ambiente, proporcionando colores que se condicen con los matices indicados en la literatura del medio. Asimismo, brindamos algunos alcances sobre la cromogenicidad peculiar de las cepas que se registraron por primera vez para el agar.

Se logró obtener mayor conocimiento y caracterización de las enterobacterias provenientes de origen ambiental, dando al CHROMagar Orientation (Valtek) una eficiencia de ser un medio con mayor eficiencia con respecto al agar MacConkey.



## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

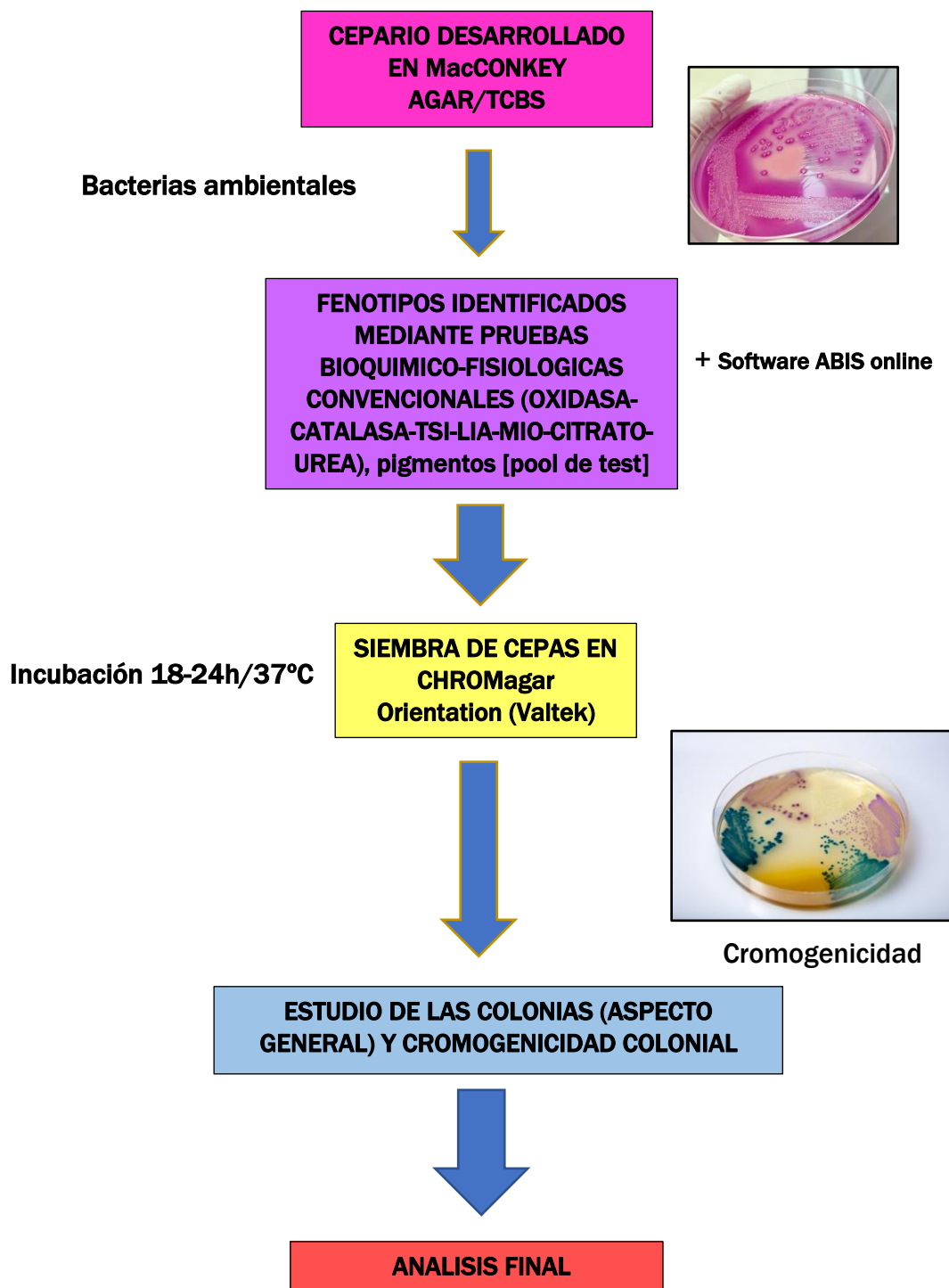
1. Adeolu M., Alnajar, S., Naushad, S. and Gupta., R. S. 2016. Genome based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol **66**: 5575-5599.
2. Edwards, P. and Ewing, W. 1960. The principal divisions and groups of Enterobacteriaceae and their differentiation. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy. **10**: 1-12.
3. Farmer III, J.J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley Carter, G.P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., O'hara., Morris, C. M. G. K., Smith, P. B. and Brenner, D. J. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology. **21**:46-76.
4. Kampfer, P., Glaeser, S. P., Nilsson, L. K. J., Eberhard, T., Håkansson, S., Guy, L., Roos, S., Busse, H. J. and Terenius, O. 2015. Proposal of *Thorsellia kenyensis* sp. nov. and *Thorsellia kandunguensis* sp. nov., isolated from larvae of *Anopheles arabiensis*, as members of the family Thorselliaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol **65**: 444–451.

5. Merlino, J., Siarakas, S., Robertson, G. J., Funnell, G. R., Gottlieb, T. and Bradbury, R. 1996. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**:1788–1793.
6. Morales-López, S., Yepes, J. A., Prada-Herrera., J. C. 2019. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. *J Infect Dev Ctries*. **13**:265-273. doi:10.3855/jidc.11216.
7. Odds, F. C., and R. Bernaerts. 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol*. **32**:1923–1929
8. Ohkusu, K. 2000. Cost-Effective and rapid presumptive identification of gram-negative bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: evaluation of the use of CHROMagar Orientation medium in conjunction with simple biochemical tests. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**:4586–4592.
9. Ohtaki, H., Takahashi, A., Niwa, A., Yonetamari, J., Nakayama, A., Kuchibiro, T., Ohta, Ito, H., Baba, H., Murakami, N. and Ohkusu, K. 2020. Evaluation of presumptive identification of Enterobacterales using CHROMagar Orientation medium and rapid biochemical tests. DOI: 10.1002/jcla.23453.
10. Rahn, O. 1937. New principles for the classification of bacteria. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt Hyg Abt II*. **96**: 273– 286.

11. Samra, Z., Heifetz, M, J. Bain, T. E. and Bahar, J. 1998. Evaluation of use of a new Chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **36**:990-994
  
12. Sorescu, I. and Stoica, C. 2021. Online Advanced Bacterial Identification Software, an original tool for phenotypic bacterial identification. *Rom Biotechnol Lett.* **26**: 3047-3053.

### XIII. ANEXOS

*Flujograma 1* . Utilización del CHROMagar Orientation en muestras ambientales.



**Tabla N° 4.** Resultados bioquímicos para la identificación de la primera remesa de cepas del stock (Excretas de *Leucophaeus pipixcan* (“gaviota de Franklin”).

**ORIGEN:** Excretas de *Leucophaeus pipixcan* (“gaviota de Franklin”) Humedal “Poza de la Arenilla”, La Punta, Callao (HCPA), 05-02-2022

1. **B2-7.2** LACTOSA<sup>W</sup> (borde irregular) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K M+, I-, O+, C+, sin pigmento, ABIS online S = 91,6% p = 2,65% sin reacciones opuestas. Identificada como *Serratia fonticola*
2. **B2-7.3** LACTOSA<sup>W</sup> (borde irregular) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K, M+, I-, O+, C+, sin pigmento, ABIS online S = 91,6% p = 2,65% sin reacciones opuestas. Identificada como *S. fonticola*
3. **B3-7.1** LACTOSA+ (borde irregular) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K M-, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 86% p = 94,25% sin reacciones opuestas. Identificada como *Escherichia coli* 2 (inactiva)
4. **B3-7.2** LACTOSA+ (borde circular, mucoide+++ ) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - -, LIA: K/K, M-, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 86% p = 94,25% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli* 2 (inactiva)
5. **B3-7.3** LACTOSA+ (borde irregular, mucoide++) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K M-, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 86% p = 94,25% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli* 2 (inactiva) MUCOIDE
6. **B4-7.1** LACTOSA<sup>W</sup> (borde irregular) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 87,5% p = 59,27% sin reacciones opuestas. Identificada como *Yersinia massiliensis*
7. **B6-7.1** LACTOSA+ (borde irregular) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - +++ LIA: K/K M+, I+, O-, C+, sin pigmento, ABIS online S = 86% p = 26,4% reacción esperada H<sub>2</sub>S-. Identificada como *Serratia odorifera* (2)

**Tabla N° 5.** Resultados bioquímicos para la identificación de la primera remesa excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”).

**ORIGEN:** excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”) (HCPA), 05-02-2022

8. **B10Co7.1** LACTOSA+ (borde circular) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A ++ - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,09% p = 90,49% sin reacciones opuestas. Identificada como *Escherichia coli*
9. **B10Co7.2** LACTOSA+ (borde circular) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K, M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 87,5% p = 59,27% sin reacciones opuestas. Identificada como *Yersinia massiliensis*

**Tabla N° 6.** Resultados bioquímicos para la identificación de la primera remesa Excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”) (HCPA), 24-02-2022 (excepto la cepa SA-1.4 procedente de heces de *Egretta caerulea* (“garza azul”).

**ORIGEN:** Excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”) (HCPA), 24-02-2022 (excepto la cepa SA-1.4 procedente de heces de *Egretta caerulea* (“garza azul”) playa El Chaco, Paracas (2021)

- 10.T1-7.1.** LACTOSA+ (colonia como “velo” al cogerla con el asa) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A + - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 94,4% sin reacciones opuestas. Identificada como *Escherichia coli*
- 11.T3-7.1.** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K, M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 87,5% p = 59,3% sin reacciones opuestas. Identificada como *Yersinia massiliensis*
- 12.T4-7.2** LACTOSA+<sup>w</sup> OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A + +++ LIA: K/K M+, I-, O+, C+, sin pigmento, ABIS online S = 98,3% p = 74,8% sin reacciones opuestas. Identificada como *Salmonella* spp. (posibilidad *S. enterica* subsp. *diarizonae*)
- 13.T7-7.2** LACTOSA - (desarrollo de “swarming” u “oleaje”) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A - +++ LIA: R/A, M+, I-, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 12,3% sin reacciones opuestas. Identificada como *Proteus mirabilis*
- 14.T10-7.1** LACTOSA- OXIDASA- CATALASA+ TSI: K/N - - LIA: desarrollo sin cambio de color, se considera-) M-, I-, O (sin cambio de color, se considera -), sin pigmento, ABIS online S (promedio) = 96,3% p (promedio) = 26,03% sin reacciones opuestas. Identificada como *Acinetobacter* spp.
- 15.T8-7.1** LACTOSA- OXIDASA- CATALASA+ TSI: K/A - - LIA: R/A M+, I-, O+, C+, sin pigmento, sin bioluminiscencia (TSA). Sin ABIS online. Identificada como *Providencia* sp.
- 16.PB8-7.15** LACTOSA- OXIDASA (no se efectuó por la interferencia con el pigmento) CATALASA+ TSI: A/A - - LIA: K/K M+, I-, O+, C+, pigmento rojo (prodigiosina), ABIS online S = 90,8% p = 19,2% sin reacciones opuestas. Identificada como *Serratia marcescens* con pigmento rojo-granate (color fisiológico debido a la prodigiosina)
- 17.T1-9.1** (Creció en TCBS) SACAROSA +, OXIDASA -, CATALASA+, TSI: A/A - - LIA: K/K (con burbuja de gas) M+, I-, O+, C+, sin pigmento, ABIS online S = 99,0% p = 11,0% sin reacciones opuestas. Identificada como *Enterobacter aerogenes*.
- 18.SA-1.4** (creció en MacConkey y TCBS) LACTOSA- SACAROSA- H<sub>2</sub>S+ OXIDASA+ CATALASA+ TSI: K/N - +++++ LIA (sin cambio de color, se considera-) M+, I-, O+, C-, U+, NaCl 6,5%+, mucoide con filancia, pigmento rosa-salmón. Identificada como *Shewanella algae*.

**Tabla N° 7.** Resultados bioquímicos para identificación de la segunda remesa Excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”).

**ORIGEN:** Excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”) (HCPA), 30-03-2022

- 19.PC1-7.2** LACTOSA+, OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A ++ - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 90,5% sin reacciones opuestas. Identificada como *Escherichia coli*
- 20.PC1-7.3** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A ++ - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 90,5% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli*
- 21.PC4-7.1** LACTOSA+ (colonia con “velo” discreto en TSA al cogerla con el asa) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A +++ - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 90,5% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli*
- 22.PC4-7.2** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A ++ - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 90,5% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli*
- 23.PC5-7.1** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A ++ - LIA: K/K M+, I+, O+, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 90,5% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli*
- 24.PC5-7.2** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A<sup>R</sup> ++ - LIA: K/K M+, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 94,4% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli*
- 25.PC9-7.1** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A +++ - LIA: K/K M+, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,9% p = 94,4% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli*
- 26.PC9-7.2** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A +++ - LIA: K/K M+, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 94,4% p = 94,4% sin reacciones opuestas. Identificada como *E. coli*
- 27.PC10-7.1** LACTOSA+ (desarrollo de colonia con “velo”) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A + - LIA: K/K, M-, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 90,1% p = 29,2% reacción esperada citrato+. Identificada como *Klebsiella oxytoca*
- 28.PC10-7.2** LACTOSA+ (desarrollo de colonia con “velo” <sup>w</sup>) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A -- - LIA: K/K, M-, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 86% p = 94,2% sin reacciones opuestas. Identificada como *Escherichia coli* (inactiva) 2
- 29.PC10-7.3** LACTOSA+ (desarrollo de colonia con “velo” <sup>w</sup>) OXIDASA- CATALASA+ TSI: A/A ++ - LIA: K/K M-, I+, O-, C-, sin pigmento, ABIS online S = 90,8% p = 29,3% reacción esperada citrato+. Identificada como *Klebsiella oxytoca*

- 30.PC6-9.2** (creció en MacConkey y TCBS) LACTOSA- SAC- H<sub>2</sub>S+ OXIDASA+ CATALASA+ TSI: K/K- +++++ LIA: negativo M<sup>W</sup>, I-, O+, C-, mucoide con filancia, pigmento rosa-salmón. Identificada como *Shewanella algae*
- 31.PC6-9.3** (creció en TCBS SAC+) OXIDASA+ CATALASA+ TSI: A/A<sup>R</sup> LIA: K/K M+, I+, O+, C+, sin pigmento, ABIS online S = 99% p = 36% sin reacciones opuestas. Identificada como *Vibrio cholerae*
- 32.PC6-9.4** (creció en TCBS SAC-) OXIDASA+ CATALASA+ TSI: K/K - +++++ LIA: negativo M<sup>W</sup>, I-, O+, C-, mucoide con filancia, pigmento rosa-salmón. Identificada como *Shewanella algae*

**Tabla N° 8.** Resultados bioquímicos para identificación de la tercera remesa excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”).

**ORIGEN:** excretas de *Phalacrocorax brasilianus* (“cormorán neotropical”) (HCPA), 30-03-2022

- 33.AV2-7.1** LACTOSA+, OXIDASA-, CATALASA+ TSI: A/A ++ -, LIA: K/K, M+, O+, I+, C- *Escherichia coli* S = 94,9% p = 90,5%; sin reacciones opuestas
- 34.AV4-7.1** LACTOSA+ OXIDASA- CATALASA+, TSI: A/A +++ -, LIA: K/K, M+, O+, I+, C- *E. coli* S = 94,9% p = 90,5%; sin reacciones opuestas ROSA-VIOLACEO (MALVA)
- 35.AV5-7.1** LACTOSA- (“swarming”) OXIDASA-, CATALASA+, TSI: A/A - +++, LIA: R/A, M<sup>W</sup>, O-, I-, C- *Proteus mirabilis* (sin ABIS online)
- 36.AV5-7.2** LACTOSA+, OXIDASA-, CATALASA+, TSI: A/A +++ -, LIA: K/A, M+, O-, I+, C- *Leclercia (Escherichia) adecarboxylata* S = 94,2% p = 28,2%; sin reacciones opuestas
- 37. AV7-7.1** LACTOSA-, OXIDASA-, CATALASA+, TSI: K/A + -, LIA: K/K, M+, O-, I+, C- *Morganella morganii* subsp. *sibonii* S = 96,8% p = 61,6%; sin reacciones opuestas
- 38.AV7-7.3** LACTOSA-, OXIDASA-, CATALASA+, TSI: A/A ++ -, LIA: K/K, M+, O+, I+, C-, *Escherichia fergusonii* S = 98,3% p = 54,7%; sin reacciones
- 39.CX** Colonia SACAROSA - en TCBS (3 mm en TSA, circular, cremosa, rosa-salmón), OXIDASA+ CATALASA+ (semi-mucoide en TSA) K/K - +++++ (n/n) M-O-I-C- *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens* (P = 89,81%) OIbM



**Tabla N° 9.** Resultados bioquímicos en la Identificación de las cepas control.

**CONTROL CLINICO:**

**CONTROL 1:** 27.4 LACTOSA+, OXIDASA -, CATALASA +, TSI: A/A + -, LIA: K/K, M-, I-, O-, C+, U+, (MUCOIDE) cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

**CONTROL 2:** Cepa de *Vibrio cholerae* non-01 147-2022 INS (gentileza Blga. María Luz Zamudio)

**LEYENDA**

**W** =reacción débil; **R**= reversión alcalina de pico en TSI, **TCBS**= Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa, **TSI**= Triple Iron Sugar, **LIA**= Lysine Iron Agar, **M**= motilidad, **I**= indol, **O**= ornitina, **C**= Citrato de Simmons, **U**= ureasa, **S**= índice de similitud, **P**= probabilidad, **ABIS**= Advanced Bacterial Identification Software.

Figura N° 8. Registros fotográficos.

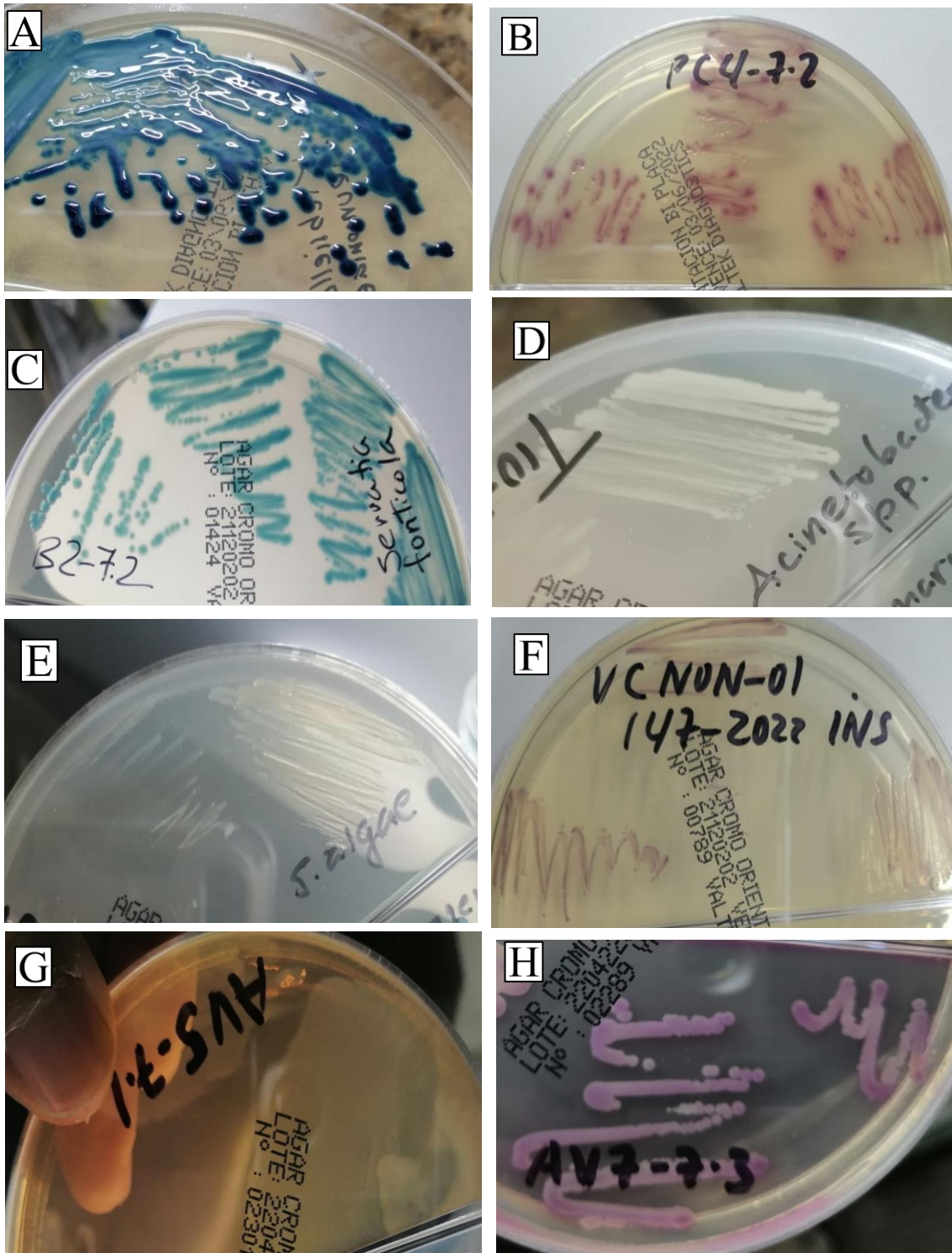


Fig. 2. A) *Klebsiella pneumoniae*; B) *Escherichia coli*; C) *Serratia fonticola*; D) *Acinetobacter spp.* E) *Shewanella algae*; F) *Vibrio cholerae*; G) *Proteus mirabilis*; H) *Escherichia fergusonii*