

GUIÓN DE PRÁCTICAS

MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Grado en Nutrición Humana y Dietética



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Profesora: Esther Ríos Dueñas

Curso 2021-2022

INDICE

Normas de Laboratorio

PLAN DE TRABAJO

PRÁCTICA 1. Análisis microbiológico. Detección de patógenos.

1. Obtención de muestras, esterilización y asepsia.
2. Medios de cultivo.
3. Técnicas de Siembra.
4. Identificación bacteriana:
 - a) Macroscópica
 - b) Microscópica: Tinción Gram
 - c) Pruebas bioquímicas
5. Antibiograma.

PRÁCTICA 2. Estudio de la microbiota de la piel.

PRÁCTICA 3. Identificación de bacterias del yogur y productos probióticos.

ANEXO I. Esquema de identificación bacteriana.

ANEXO II. Categorías de Sensibilidad antibiótica según el halo de inhibición del antibiograma.

NORMAS DE LABORATORIO:

- 1.- Es imprescindible el uso de bata de laboratorio.
- 2.- Al iniciar y finalizar las prácticas, el estudiante se lavará las manos con agua y jabón.
- 3.- El lugar de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado.
- 4.- Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el laboratorio, ya que crean corrientes que originan contaminaciones o pueden producir accidentes.
- 5.- Durante las prácticas está prohibido comer, beber y fumar.
- 6.- La ropa y los objetos personales deben ser alejados del lugar de trabajo.
- 7.- El trabajo se realizará en parejas.
- 8.- Para deshacernos del material contaminado utilizaremos los recipientes adecuados.
Nunca se debe tirar nada por el fregadero o la basura común.
- 9.- Bajo ningún concepto debe sacarse ninguna muestra contaminada del laboratorio.
- 10.- Todas las placas, muestras, tubos deben ir identificados para que cada persona sepa cuál es su material.
- 11.- En caso de accidente (ruptura de material, derramamiento de microorganismos...) se comunicará inmediatamente al profesor.

PLAN DE TRABAJO

PRIMER DÍA

PRÁCTICA 1:

- ✓ Observación macroscópica y microscópica del cultivo problema.
- ✓ Realización de pruebas bioquímicas.
- ✓ Realizar el Antibiograma
- ✓ Obtención de un subcultivo a partir del cultivo problema.

PRÁCTICA 2:

Realizar la práctica.

SEGUNDO DÍA

PRÁCTICA 1:

- Observación del subcultivo.
- Lectura de pruebas bioquímicas.
- Lectura del Antibiograma

PRÁCTICA 3:

Realizar la práctica.

PRÁCTICA 1. Análisis microbiológico. Detección de patógenos.

En esta primera parte el alumno se familiarizará con las técnicas básicas de la ciencia de la Microbiología. Este proceso contará básicamente de las siguientes partes:



1. Obtención de muestras, esterilización y asepsia.

En general, se define **como muestra** a cualquier elemento orgánico, líquido o sólido, natural o patológico, procedente del individuo o del ambiente que le rodea. Serán muestras, por lo tanto, los líquidos fisiológicos (sangre, orina, saliva, heces), los líquidos patológicos (exudados, pus, esputos, vómitos), las biopsias y las **muestras de alimentos** o del ambiente.

La presencia de microorganismos en todos los medios ambientales y formando parte de nuestra microbiota, hace imprescindible que en el laboratorio trabajemos en **condiciones de asepsia**. El concepto de **asepsia** hace referencia a la utilización de procedimientos que impidan el acceso de microorganismos patógenos a un medio libre de ellos, por ejemplo, mediante el lavado de manos. Es decir, debemos evitar la contaminación de la muestra recogida con nuestra propia microbiota o microorganismos del ambiente.

La **antisepsia** tiene como objetivo reducir al máximo los microorganismos sobre seres vivos. Para la implementación de la antisepsia se usan los biocidas, tanto en piel y tejido humanos (antisépticos) como en objetos, superficies o ambiente (desinfectantes).

Asimismo, debemos destruir cualquier microorganismo, nocivo o no, presente en los medios de cultivo, instrumentos o utensilios de trabajo. Esto se consigue mediante la **esterilización**.

La **esterilización** puede realizarse por:

A. Agentes físicos:

- Flameado con el mechero de la boca de los tubos, asas de siembra, etc.
- Incineración: Material de desecho
- Horno Pasteur: Calor seco. 160°C- 180°C durante 1-2 horas.
- Autoclave: Calor húmedo. 121°C durante 20 minutos.
- Filtración: Esterilización de líquidos que contienen compuestos termolábiles.
- Radiaciones: ultravioleta o ionizantes.

B. Agentes químicos: óxido de etileno.

La **pasteurización** es otro método utilizado para muchos líquidos termolábiles (leche, nata, mosto, bebidas alcohólicas...) que no pueden someterse a elevadas temperaturas porque se desnaturalizarían sus componentes. La **pasteurización** es un tratamiento térmico de un líquido (generalmente un alimento) cuyo objetivo es reducir el número de microorganismos o eliminar los posibles patógenos que pueda contener, alterando lo menos posible su estructura física, sus componentes químicos y sus propiedades organolépticas. A diferencia de la esterilización, la pasteurización no destruye completamente las esporas de los microorganismos, ni elimina todas las células de microorganismos termófilos.

2. Medios de cultivo.

Las bacterias para crecer deben tomar del ambiente todas las sustancias que requieren para la síntesis de su material celular y para la obtención de energía. Estas sustancias son las que denominamos NUTRIENTES y deben de estar presentes en los medios de cultivo.

En el laboratorio, trabajamos con los medios de cultivo para poder estudiar a los microorganismos. Un **medio de cultivo** es una solución de nutrientes necesarios para que un microorganismo se multiplique y crezca.

Los medios de cultivo pueden ser **según su consistencia**: sólidos y líquidos. La diferencia estriba en que los sólidos contienen AGAR, una sustancia gelificante (mezcla de polisacáridos). El agar tiene la propiedad de fundirse a una temperatura mayor de 90°C, pero solidifica a una temperatura de 40°C. También hay medios semisólidos si incorporan un 0,2% de gelificante mientras que los en los medios sólidos oscila entre 1,5-2%.

La mayoría de los medios de cultivo están comercializados en forma de polvo, que se resuspende en agua y se esteriliza. Posteriormente, se distribuye en distintos recipientes: matraces, tubos o placas Petri.

Los medios de cultivo también se pueden clasificar **según su composición** en:

- A. Medios generales enriquecidos: contienen la mayoría de los factores necesarios para el crecimiento de casi todas las bacterias, incluso las más exigentes. El más común es el **agar sangre**, que está suplementado con un 5% de sangre de carnero.
- B. Selectivos: Se les añaden sustancias químicas como antibióticos o colorantes que son capaces de inhibir el crecimiento de algún tipo de bacteria. Los más habituales son el agar MacConkey, y el agar CNA.
 - **Agar MacConkey** contiene sales biliares, cristal violeta, rojo de metilo y lactosa, que en su conjunto favorecen el crecimiento de los microorganismos Gram negativos e inhibe a los Gram positivos.
 - **Agar CNA**, posee ácido nalidíxico y colistina que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas y favorece el de las bacterias Gram positivas.
- C. Diferenciales: Nos permiten detectar alguna característica bioquímica o ruta metabólica. Ej: Agar MacConkey, Agar Kligler, agar sangre.

- La presencia de lactosa en el **agar MacConkey** permite distinguir entre bacterias Gram negativas que fermentan o no la lactosa:

α -hemolíticos	Lisis parcial. Colonias rodeadas de un halo verde.
β - hemolíticos	Lisis total. Colonias rodeadas de un halo transparente.
γ - hemolíticos	Sin lisis. Sin variación alrededor de las colonias.
Lactosa +	Utilizan la lactosa produciendo ácido láctico, baja el pH. Colonias rosas
Lactosa -	Usan los aminoácidos del medio produciendo NH ₃ , subiendo el pH-. Colonias amarillentas

- **Agar sangre:** Nos permite diferenciar el tipo de hemólisis, es decir la capacidad de ciertos microorganismos de lisar los eritrocitos del medio de cultivo, clasificándose en α -, β - o γ -hemolíticos.

3. Técnicas de Siembra, aislamiento y cultivo puro.

En Microbiología se entiende como **siembra** el proceso mediante el cual se lleva una porción de una población de microorganismos, denominada **inóculo**, de un cultivo crecido o desde una muestra (biológica, ambiental, alimentos) a un medio nutritivo para su crecimiento.

Para poder identificar y estudiar una bacteria, es fundamental **aislar** el microorganismo de interés de la muestra inicial y obtener un **cultivo puro**, es decir un conjunto de bacterias, todas ellas procedentes de la misma célula. El aislamiento consistirá en la separación del resto de cada una de las colonias con morfología diferente y su subcultivo posterior en medios nutritivos. Tras la incubación, se confirma visualmente que el nuevo cultivo es puro por la morfología colonial.

Como instrumento porta-inóculos más frecuente se utiliza el **asa de siembra**, o la **torunda** (hisopo) con el que se puede tomar un inóculo a partir de colonias o de un medio líquido, debido a que mantiene un pequeño volumen de líquido por tensión superficial. Para depositar el inóculo en un medio de cultivo líquido, basta con introducir el extremo en el medio y agitar ligeramente. Sobre un medio de cultivo sólido, hay que hacer un recorrido largo sobre la superficie.

Existen distintos métodos de siembra:

A. Siembra por agotamiento de asa.

El objetivo es obtener, a partir de un elevado número de bacterias, un número reducido de ellas distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa. Cada una de las células bacterianas se multiplicará y originará una colonia (un acúmulo de bacterias visibles al ojo humano).

B. Siembra por picadura o en profundidad (Slant).

C. Siembra en césped. Extensión del inóculo en todas las direcciones sobre la superficie de la placa.

Todas las placas y medios de cultivo, una vez sembrados, se incubarán a 36°C en aerobiosis durante 18-24h.

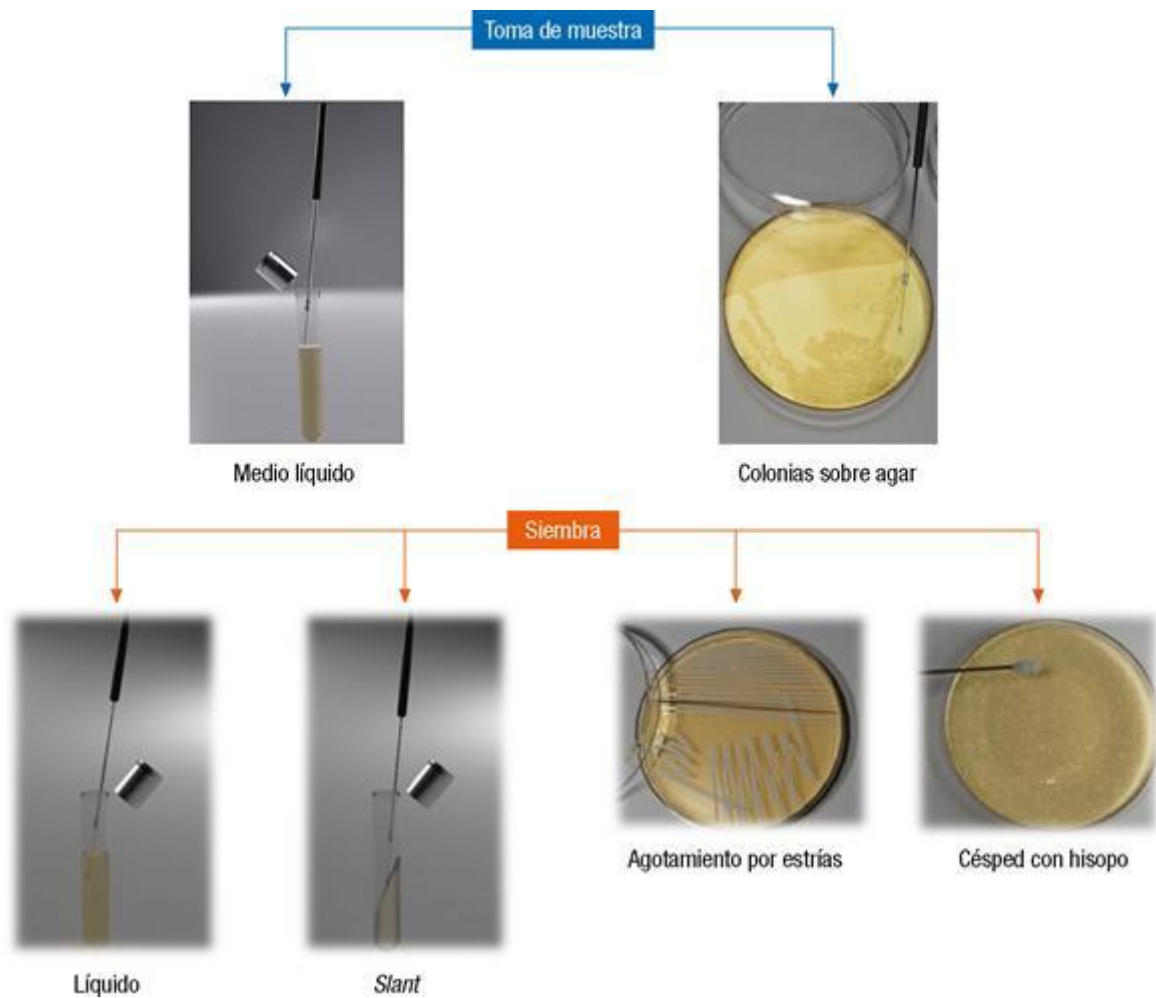


Figura 1. Cultivo de microorganismos: en medio líquido y sólido (agotamiento por estrías, en césped y en slant). Tomado de Carlos, Gamazo De La, R. et al. *Microbiología basada en la experimentación*. Elsevier España, 2013.

4. Identificación bacteriana:

A. Macroscópica:

El crecimiento bacteriano se puede observar de dos formas: por turbidez (en medios de cultivo líquidos) y por visualización de las colonias crecidas en medios de cultivo sólidos. En este último caso, podemos estudiar: la forma de la colonia, su tamaño, color, brillo, su aspecto de borde (liso, rugoso, ramificado, etc), la elevación de la colonia, si son más o menos mucosas.

B. Microscópica:

A nivel microscópico, también podemos estudiar las bacterias. Sin embargo, es necesario realizar **tinciones** con colorantes ya que el índice de refracción de las bacterias es muy similar al del medio que las rodea y, por tanto, son difíciles de ver al microscopio.

Tinción Gram:

Se trata de una tinción diferencial que permite establecer diferencias morfológicas y estructurales de la pared. El alumno tendrá que distinguir el tipo de pared bacteriana (Gram positivo o Gram negativo) y la morfología bacteriana (cocos, bacilos u otros) de las diferentes bacterias contenidas en la mezcla problema.

Procedimiento:

1. Hacer un **frotis**: Si el medio en el que están los microorganismos es un medio líquido, dispensaremos una o dos gotas sobre el portaobjetos. Si el medio es sólido, pondremos una o dos gotas de solución salina estéril y en ellas disolveremos varias colonias recogidas del medio de cultivo mediante un asa estéril. A continuación, **extendemos** bien por todo el portaobjetos con el asa, **secamos y fijamos** con calor, con cuidado, para no quemar a las bacterias. El calor excesivo alteraría la forma normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir.
2. Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto.
3. Lavar con agua destilada.
4. Tratar con Lugol-yodo durante 1 minuto.
5. Lavar con agua destilada.
6. Decolorar con alcohol-acetona durante 30 segundos.
7. Lavar con abundante agua.

8. Teñir con safranina durante 1 minuto.
9. Lavar, secar al aire y examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.

C. Pruebas bioquímicas.

Prueba	Fundamento	Procedimiento/Técnica de siembra	Reactivo o indicador	Lectura/Interpretación
Catalasa	Presencia de la enzima catalasa que transforma el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) se transforma en agua y oxígeno.	Dispensar una gota de agua oxigenada sobre un porta y disolver en ella una colonia.	Agua oxigenada (peróxido de hidrógeno)	Formación de burbujas: (+) Ausencia de burbujas: (-)
Coagulasa	Presencia de coagulasa, enzima que transforma el fibrinógeno en fibrina (coágulo).	Se depositan varias colonias en los tubos con el plasma de conejo, se homogeniza y se incuba a 36°C en aerobiosis durante 18-24h.	Plasma de conejo	Formación de coágulo: (+) No formación de coágulo: (-)
Oxidasa	Presencia de citocromo oxidasa C.	Tomamos una colonia con el asa de siembra y la depositamos en el papel de filtro. Añadimos el reactivo redox teniendo lugar la reacción en pocos segundos.	Discos de papel impregnados con un indicador redox.	Color azul/granate: (+) Otro color: (-)
Agar Kligler (semisólido inclinado)	Fermentación de azúcares (glucosa y lactosa). Producción de H ₂ S. Producción de gas.	Siembra en profundidad con la aguja de siembra hasta tocar el fondo del tubo. En superficie, en la zona del pico de flauta, realizaremos una siembra en zig-zag. El tubo se incuba a 36°C durante 18-24h.	Rojo fenol	- Fondo amarillo: Glucosa (+) - Fondo rojo: Glucosa (-) - “Pico de flauta” amarillo: Lactosa (+) - “Pico de flauta” rojo: Lactosa (-) - Ennegrecimiento del medio: Produce H ₂ S - Burbujas/agar agrietado: Producción de gas.
Agar Citrato	Capacidad de crecimiento utilizando como única fuente de carbono el citrato y fosfato amónico como fuente de nitrógeno.	Siembra en zig-zag en el pico de flauta del agar inclinado y se incubará a 36°C durante 18-24h.	Azul de bromotimol	Color verde: (-) Color azul: pH básico (+)
Agar SIM	Movilidad mediante flagelos bacterianos	Se realizará una siembra en picadura y se incubará a 36°C durante 18-24h.	Medio de cultivo semisólido.	Bacteria móvil: enturbiamiento homogéneo del medio. Bacterias inmóviles: turbidez sólo en la misma línea de la picadura en que se sembraron.

5. Antibiograma

Fundamento

El antibiograma es la prueba que evalúa la actividad de los antimicrobianos frente a una bacteria. Existen diversas técnicas, pero la más empleada y sencilla es la **Técnica de Difusión en Agar**, basada en la difusión del antibiótico (impregnado en discos de papel con una concentración fija y estandarizada) sobre una placa de medio de cultivo.

Procedimiento:

1. Tomar con asa de siembra 3-4 colonias del microorganismo crecido en placa fresca, y resuspender en suero salino.
2. Mojar un hisopo en la suspensión y extender en todas las direcciones sobre toda la superficie.
3. Dejar secar 5 min., y depositar los discos de antibióticos a ensayar con ayuda del dispensador.
4. Incubar en estufa.
4. Medir el diámetro del halo de inhibición (zonas sin crecimiento bacteriano), y determinar resistencia/sensibilidad.

PRÁCTICA 2. Estudio de la microbiota de la piel.

Fundamento

La microbiota humana es la población microbiana formada por bacterias, hongos o virus presentes en el cuerpo humano (tubo digestivo, piel, vía respiratoria alta y vagina). Aunque en general no suelen producir daños en el huésped sano, algunos son causantes de enfermedades, como sucede en las infecciones cutáneas y de tejidos blandos (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*), el acné (*Propionibacterium acnes*) o la caries (*Streptococcus mitis*). La microbiota tiene un importante papel en la salud y el desarrollo normal de los seres vivos. En sujetos sanos es muy diversa, mostrando una variabilidad alta en la cavidad oral (*Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Veillonella sp.*) y el tracto gastrointestinal (enterobacterias, *Lactobacillus spp.*, anaerobios obligados); intermedia en la piel (*Staphylococcus spp.*); y baja en la vagina (*Lactobacillus spp.*). Por el contrario, la microbiota bacteriana de una región corporal determinada es similar en los distintos individuos.

Objetivo

Conocer la variedad de bacterias que componen la microbiota humana presente en las manos y evaluar la acción de los desinfectantes.

Procedimiento

Cada grupo realizará un estudio de la microbiota de la piel de sus manos antes y después de realizar un lavado de manos con clorhexidina/alcohol. Para ello, seguimos los siguientes pasos:

1. Poner los dedos de la mano en una placa de agar sangre y frotar suavemente contra el agar durante 10 segundos. Identificar la placa como Pre.
2. Lavar las manos con clorhexidina/alcohol durante 1 min.
3. Poner los dedos de la mano en una placa de agar sangre y frotar suavemente contra el agar durante 10 segundos. Identificar como Post.

Análisis de resultados.

Se analizará macroscópicamente (color y forma de la colonia, olor, propagación y hemólisis) las diferentes colonias obtenidas en las placas de agar sangre y se observará la reducción de la carga microbiana tras el lavado de manos.

PRÁCTICA 3. Identificación de bacterias del yogur y productos probióticos.

Fundamento

El yogur es el producto lácteo resultante de fermentar la leche con **bacterias ácido-lácticas** como son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Los postres lácteos también se procesan mediante fermentación ácido-láctica, sin embargo, una vez procesados se someten a tratamiento térmico (termización o pasteurización), con lo que se pierden las bacterias vivas que sí están presentes en el yogur. Numerosas leches fermentadas comercializadas incluyen en su composición **bacterias probióticas** normalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*, los cuales deben permanecer como organismos viables y en cantidades suficientes en el producto final, hasta el momento de su consumo y de acuerdo a las normativas vigentes.

Objetivo

El **objetivo** de esta práctica consistirá en diferenciar dos derivados lácteos problema, yogur o producto bio, en función de su composición microbiológica. Se realizará una tinción simple con azul de metileno empleando los dos derivados lácteos problema.

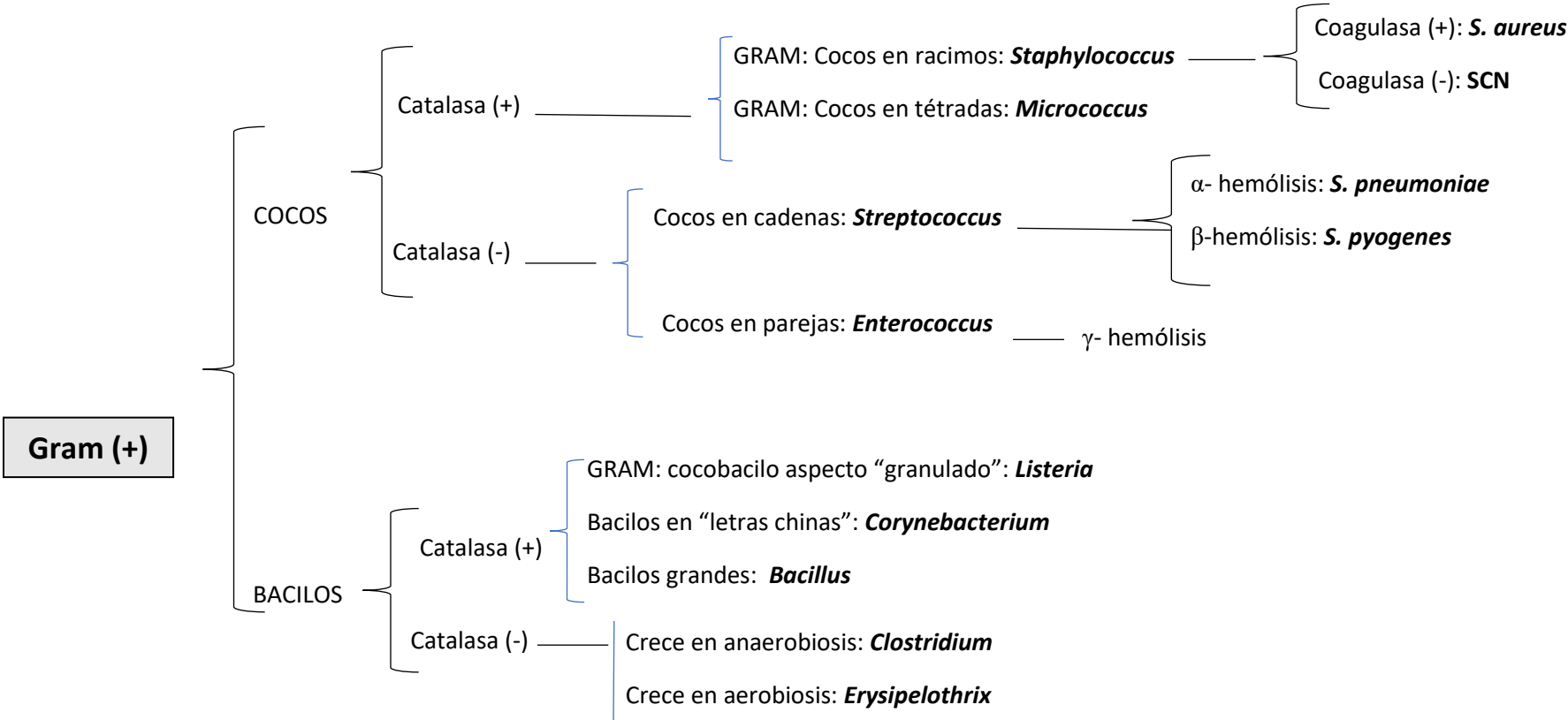
Procedimiento

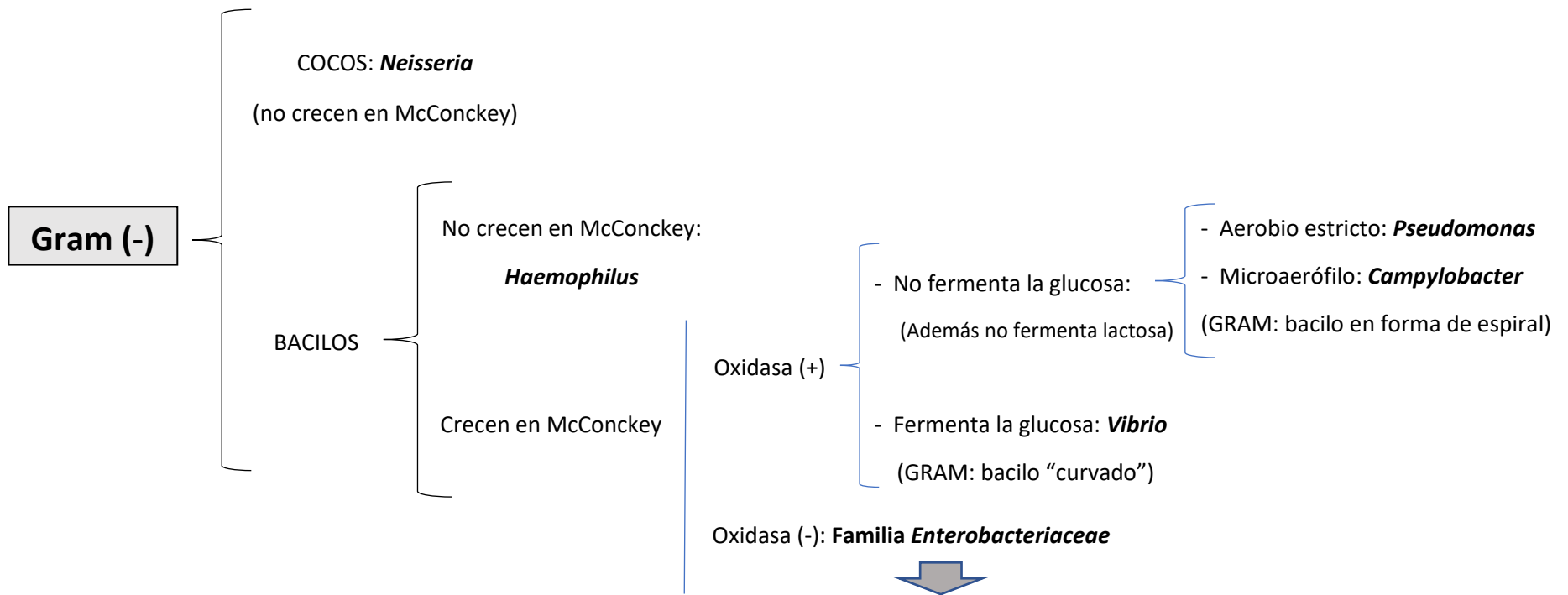
1. Extensión: Con el asa de siembra toma una mínima porción de yogur en una pequeña gota de agua y realiza un frotis (extenderla sobre todo el portaobjetos).
2. Dejar secar al aire hasta la evaporación.
3. Pasar el portaobjeto por la llama del mechero para fijar la muestra, sin dejar de moverlo para impedir la fractura del cristal.
3. Añadir una gota de azul de metileno al 1 % sobre la preparación durante 1-2 minutos.
4. Lavar la muestra con el frasco lavador, cuidadosamente, para eliminar el exceso de colorante.
5. Dejar evaporar el agua sobrante moviendo la preparación en abanico.
6. Añadir una gota de aceite de inmersión a la muestra, colocarlo sobre el microscopio y observar al máximo aumento del microscopio.

Análisis de resultados

Se anotarán las formas y disposiciones celulares visualizadas al microscopio y de acuerdo con sus hallazgos, se identificará el producto lácteo como yogur o producto bio.

ANEXO I. Esquema de identificación bacteriana.





Bacteria	Glucosa	Lactosa	Producción H ₂ S	Producción de gas	Citrato	Movilidad
<i>Escherichia coli</i>	+	+/-	-	+	-	+
<i>Klebsiella</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus</i>	+	-	+	+/-	+/-	+
<i>Citrobacter</i>	+	+	+/-	+	+	+
<i>Salmonella</i>	+	-	+	+	+/-	+
<i>Yersinia</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	--	-

ANEXO II. Categorías de Sensibilidad antibiótica según el halo de inhibición del antibiograma.

Tomado de Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)

Antimicrobiano	<i>Staphylococcus sp. y Corynebacterium sp.</i>			<i>Streptococcus sp.</i>			<i>Enterococcus sp</i>			Enterobacterias y BGNNF		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ampicilina - AMP	-	-	-	≥24			≥17	NE	≤16	≥17	14-16	≤13
Amoxicilina-ácido clavulánico - AMC	≥22	NE	≤21	≥24			≥17	NE	≤16	≥18	14-17	≤13
Aztreonam - ATM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥21	18-20	≤17
Cefepima - FEP	≥22	NE	≤21	≥24			-	-	-	≥25	19-24	≤18
Cefuroxima - CXM	≥22	NE	≤21	≥24			-	-	-	≥18	15-17	≤14
Ceftazidima - CAZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≥21	18-20	≤17
Ceftriaxona - CRO	≥22	NE	≤21	≥24			-	-	-	≥23	20-22	≤19
Ciprofloxacino - CIP	≥21	16-20	≤15	-	-	-	≥21	16-20	≤15	≥21	16-20	≤15
Clindamicina - CC	≥21	15-20	≤14	≥19	16-18	≤15	-	-	-	-	-	-
Meticilina /Cefoxitina - FOX	≥22	NE	≤21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cotrimoxazol -SXT	≥16	11-15	≤10	≥19	16-18	≤15	-	-	-	≥16	11-15	≤10
Eritromicina - E	≥23	14-22	≤13	≥21	16-20	≤15	≥23	14-22	≤13	-	-	-
Gentamicina - GN	≥15	13-14	≤12	-	-	-	-	-	-	≥15	13-14	≤12
Imipenem - IPM	≥22	NE	≤21	≥24			≥17	NE	≤16	≥23	20-22	≤19
Linezolid - LZD	≥21	NE	≤20	≥21			≥23	21-22	≤20	-	-	-
Penicilina - P	≥29	NE	≤28	≥24			≥15	NE	≤14	-	-	-
Tetraciclina -TE	≥19	15-18	≤14	≥23	19-22	≤18	≥19	15-18	≤14	≥15	12-14	≤11

NOTAS: La interpretación del antibiograma debe realizarse una vez identificado el microorganismo, al menos al nivel taxonómico de género. S; sensible. I; Sensibilidad intermedia. R; resistente. Los valores numéricos refieren a mm del halo de inhibición.

NE; no existe esta categoría

-; indica no activo