

GUIÓN DE PRÁCTICAS

MICROBIOLOGÍA GENERAL

Grado en Medicina



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Profesoras:

Esther Culebras López

Esther Ríos Dueñas

Contenido

OBJETIVO.....	3
NORMAS DE SEGURIDAD.....	4
NORMAS GENERALES	4
DESARROLLO DE LAS PRÁCTICAS.....	5
Primer día.....	6
ESTERILIZACIÓN	6
MEDIOS DE CULTIVO.	6
SIEMBRA DE MICROORGANISMOS.	8
PROCEDIMIENTO TINCIÓN DE GRAM.....	9
Segundo día.	10
Tercer día.-.....	13
INFORME DE RESULTADOS	14
ANEXO I	15
ANEXO II	16
ANEXO III	17

FASES DEL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO



NORMAS DE SEGURIDAD.

Debemos pensar que los microorganismos que vamos a encontrar en una muestra son posibles patógenos y, por tanto, deben mantenerse unas normas básicas de seguridad:

- No se puede comer ni beber en el laboratorio.
- Es obligatorio la utilización de bata.
- La ropa y los objetos personales deben mantenerse alejados de la zona de trabajo.
- Al comenzar las prácticas conviene colocar un papel de filtro sobre la zona de manipulación que se retirará una vez terminada la práctica.
- Lavarse las manos al abandonar el laboratorio.

NORMAS GENERALES

- Se preparará un resumen del trabajo realizado en el laboratorio y se entregará el último día de las prácticas.
- El trabajo se realizará por parejas. Los resultados serán conjuntos pero cada alumno deberá preparar su resumen.
- Todas las placas, muestras y tubos deben ir identificados para que, cada persona, sepa cuál es su material.

DESARROLLO DE LAS PRÁCTICAS.

Día 1:

- Esterilidad
- Medios de cultivo y tipos de medio
- Técnicas de siembra
- Siembra de muestras problema en los distintos medios de cultivo
- Tinción de Gram

Día 2:

- Visualización del crecimiento en los distintos medios.
- Interpretación
- Realización de pruebas bioquímicas
- Concepto de antibiograma
- Realización del antibiograma

Día 3:

- Interpretación de los resultados obtenidos
- Identificación microorganismos en la muestra problema
- Sensibilidad
- Cuaderno

Primer día.

ESTERILIZACIÓN.

Esterilización. La presencia de microorganismos en todos los medios ambientales hace imprescindible que, para estudiar una bacteria determinada sea necesario destruir todas aquellas que pudieran encontrarse contaminando los medios o los instrumentos de trabajo. Esto se consigue mediante la **ESTERILIZACIÓN**, consistente en la destrucción de todo microorganismo.

La esterilización puede realizarse por:

A. Agentes físicos

a. Directo:

Flameado con el mechero de la boca de los tubos, asas de siembra, etc.

Incineración. Material de desecho.

b. Indirecto:

Horno Pasteur. Calor seco

Autoclave: Calor húmedo

Filtración. Esterilización de líquidos que contienen compuestos termolábiles

Radiaciones. Radiaciones ultravioletas.

B. Agentes químicos: Óxido de etileno.

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 que vayamos a utilizar.

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos. Los medios líquidos son los caldos de cultivo. La presencia de bacterias en este tipo de medios se detecta por turbidez.

Los medios sólidos llevan un agar gelificante que permite su solidificación a temperaturas inferiores a 50°C. Hay dos formatos: Placas de Petri y tubos con agar inclinado.



Medios sólidos



Medios líquidos

Los medios de cultivo se clasifican en 3 grupos:

- a. **Medios básicos o nutritivos.** Son aquellos que contienen los nutrientes que permiten que las bacterias importantes en medicina crezcan y se vean de forma rápida. Crecen los microorganismos no exigentes. El medio básico más común es el agar-sangre (COS) que está suplementado con un 5% de sangre de carnero.
- b. **Medios selectivos.** Se les añaden sustancias químicas como antibióticos o colorantes que son capaces de inhibir el crecimiento de algún tipo de bacteria.
 - i. Agar CNA. Posee colistina y ácido nalidixico que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram negativas
 - ii. Agar McConkey. Posee sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de los microorganismos Gram positivos.
- c. **Medios diferenciales.** Se les ha añadido algún colorante y varios nutrientes.

Agar McConkey:

Lactosa (fermentación): Ácido láctico. Baja pH. Color rosa

Peptonas: Aminoácidos. NH_3 . Sube pH. Color naranja.



SIEMBRA DE MICROORGANISMOS.

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 a un medio nutritivo para su crecimiento.

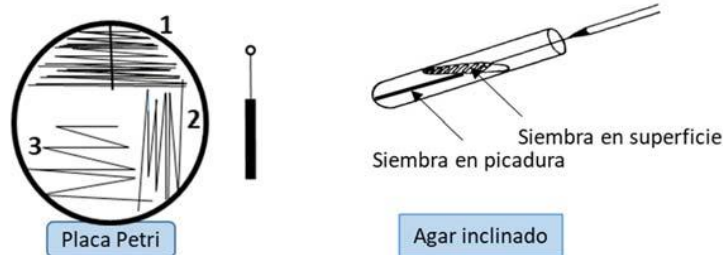
Todo este proceso hay que llevarlo a acabo con instrumentos y medios estériles.

Si se trabajase con mechero, debe trabajarse próximos a él, debido a que las corrientes de convección verticales que genera, crean un ambiente estéril en la zona inmediatamente alrededor y debajo de la llama.

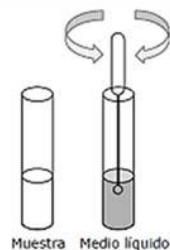
Actualmente NO se utilizan mecheros de llama en los laboratorios de microbiología por el peligro que puede conllevar su uso. Se trabaja sobre superficie limpia, con material estéril y evitando que los medios de cultivo estén expuestos al medio ambiente más tiempo del imprescindible (placas y tubos cerrados salvo cuando se estén manipulando).

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

Siembra en medios sólidos



Siembra en medio líquido



El objetivo de siembra en placa Petri es conseguir colonias aisladas en algún punto de la superficie.

PRÁCTICA.

1. - Siembra de microorganismos. Cuando las bacterias se siembran en placa para su posterior identificación deben estriarse hasta conseguir colonias aisladas. De esta forma podremos saber si en nuestra muestra están presentes una o más bacterias y podremos observar sus características morfológicas.

Se sembrará la muestra problema en un medio básico sólido (agar-sangre) y dos medios selectivos (CNA y McConkey)

2. - Tinción de Gram. Se trata de una tinción diferencial muy utilizada que distingue las bacterias por las características de su pared celular, clasificándolas en Gram positivas y Gram negativas. Además nos permitirá apreciar la morfología de la bacteria distinguiendo entre cocos y bacilos.çç

PROCEDIMIENTO TINCIÓN DE GRAM.

1.- Hacer un frotis. Si el medio en el que están los microorganismos es un medio líquido, dispensaremos una o dos gotas sobre el protaobjetos. Si el medio es un medio sólido, pondremos un par de gotas de solución salina estéril y en ellas disolveremos varias colonias recogidas del medio de cultivo mediante asa estéril.

Extendemos (BIEN), dejamos secar y fijamos con calor, con cuidado para no quemar las bacterias.

2.- Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto

3.- Lavar con agua destilada

4.- Tratar con lugol durante 1 minuto

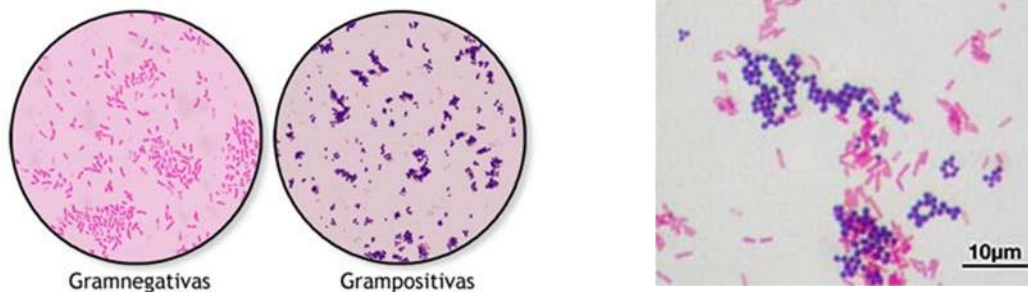
5.- Lavar con agua destilada.

6.- Cubrir con alcohol-acetona durante 30 segundos

7.- Lavar con agua destilada

8.- Cubrir con safranina durante 1 minuto

9.- Lavar con agua destilada, secar al aire y observar con el objetivo de inmersión (x100). No olvidarse del aceite de inmersión.



Segundo día.

PRÁCTICA.

1.- Observación macroscópica de las bacterias. Observamos las colonias que forman sobre medios sólidos.

A nivel morfológico podemos estudiar la forma de las colonias, su tamaño, aspecto de borde (liso, rugoso, ramificado, etc..), la presencia de brillo, color, si son más o menos mucosas.

Determinar la morfología de las distintas colonias que aparezcan en las placas en las que se han realizado la siembra el día anterior especificando cuántas colonias diferentes aparecen en cada uno de los medios y las características de cada una en cada medio específico.

2.- Identificación bacteriana. Se realizarán una serie de pruebas bioquímicas para identificar las bacterias presentes en cada una de las muestras.

2.1.- Microorganismos Gram positivos. Todas las pruebas para la identificación de las bacterias Gram positivas se llevarán a cabo con las colonias crecidas en la **placa de CNA.**

2.1.1.- Actividad catalasa. Se trata de un ensayo muy simple que intenta determinar si la bacteria problema tiene capacidad para degradar el peróxido de hidrógeno, uno de los agentes oxidantes producidos como consecuencia de determinadas reacciones metabólicas oxidativas propias del metabolismo aerobio.

El ensayo es muy sencillo. Basta con añadir una gota de agua oxigenada sobre un porta y disolver en ella una colonia recogida del medio CNA. Si se desprenden burbujas de oxígeno como consecuencia de la actividad enzimática de la catalasa, el microorganismo será catalasa positivo.

Staphylococcus spp. Catalasa positivo.

2.1.2. - Coagulasa. Capacidad de coagular plasma. Se depositan varias colonias en los tubos con el plasma. Se mezclan bien y se incuban 18 horas.

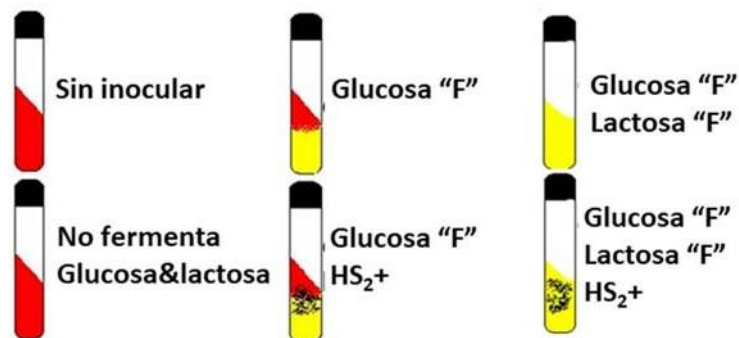
Prueba positiva para *S. aureus* y negativa para los *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN).

Streptococcus spp y *Enterococcus* spp. Catalasa negativo. Considerar tipo de hemólisis. Aglutinaciones específicas.

2.2. - Microorganismos Gram negativos. Todas las pruebas para la identificación de las bacterias Gram negativas se llevarán a cabo con las colonias crecidas en la **placa de McConkey**.

2.2.1. - Kligler's. Utilización de azúcares. Glucosa, lactosa y SH₂. Se siembra en picadura. El medio tiene rojo fenol como indicador de pH. Cuando el medio se acidifica vira a amarillo.

Posibles resultados medio Kligler's

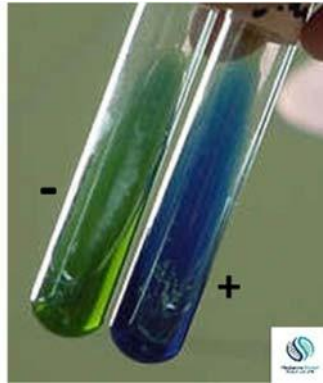


Glucosa +: Todas las enterobacterias.

Lactosa +: *Klebsiella* spp y *E. coli* (entre otras)

HS₂: *Proteus* spp

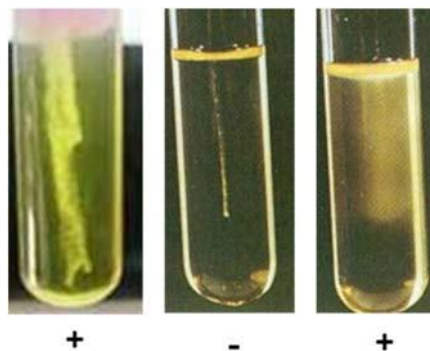
2.2.2. - Citrato. Se ve si una bacteria es capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono. Tiene como indicador de pH el azul de bromotimol que a pH 7 es verde. Cuando el citrato es utilizado como fuente de carbono el pH aumenta y se vuelve azul.



Citrato +: *Klebsiella* spp.

2.2.3. - Reacciones bioquímicas en distintos medios. Inoculación en tubos eppendorf. **Se utilizarán para identificar enterobacterias.** Varios ensayos de forma simultánea. La positividad de cada prueba se observa como cambio de color con respecto al tubo sin inocular (**Anexos I y II**).

2.2.4. - Movilidad. En un medio semisólido. Permite determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Los microorganismos móviles se desplazan desde la línea de siembra y provocan turbidez en el medio de cultivo mientras que las bacterias inmóviles sólo crecen en la línea de siembra dejando limpio el resto del tubo.



Entre las enterobacterias, la movilidad nos permite diferenciar el género *Klebsiella* (inmóvil) de las restantes que suelen ser movilidad (+).

El Kliglers, citrato, resto de pruebas bioquímicas y agar semisólido precisan de incubación en estufo 18-24 horas antes de proceder a su lectura.

2.2.5. - Antibiograma. Se basa en la difusión del antibiótico sobre una placa de medio a partir de un punto central.

El antibiograma se realizará sobre placas con medio Müller-Hinton. Este es el medio estandarizado para la realización del antibiograma. Se suplementará con sangre u otros componentes cuando se quieran analizar microorganismos que tengan necesidades para su crecimiento.

Inocular la placa Petri con una dilución 0,5 en la escala de McFarland. Se sembrará para conseguir un césped que cubra toda la superficie de la placa.

Los antibióticos se depositarán sobre la placa con ayuda de un dispensador.

Incubar en estufa y leer el diámetro de los halos al día siguiente.



Tercer día.-

Lectura e interpretación de los resultados del día anterior.





Especificar los microorganismos presentes en la muestra problema y el antibiótico recomendado para su tratamiento (razonado).

INFORME DE RESULTADOS

El alumno deberá redactar un informe **centrado exclusivamente en los resultados** obtenidos del análisis de la muestra problema, incluyendo:

- **Identificación de las dos especies bacterianas**, basada en las **pruebas realizadas durante la práctica** (observación microscópica, cultivos, pruebas bioquímicas, etc.).
- **Interpretación razonada del antibiograma**, explicando la sensibilidad y resistencia observadas.
- **Propuesta de tratamiento antibiótico adecuado** para el paciente, justificando la elección en función de los resultados del antibiograma y considerando la presencia simultánea de ambos microorganismos.

ANEXO I. Interpretación de las pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias.

Prueba bioquímica	Color del medio cuando es positiva	Color del medio cuando es negativa
LISINA		
ORNITINA		
ARABINOSA		
ADONITOL		
SORBITOL		
FENILALANINA		
UREA		

Los tonos pueden variar dependiendo del medio e indicador.

ANEXO II. Tabla de las reacciones bioquímicas (en valores porcentuales) para la identificación de enterobacterias.

ANEXO III. Interpretación del diámetro del halo de inhibición del antibiograma.

Fuente: Tendencias EUCAST/CLSI; valores aproximados para docencia.

Grupo	Código	Antibiótico	Resistente (\leq mm)	Intermedio (mm)	Sensible (\geq mm)
Penicilinas β -lactámicos	P 10	Penicilina	≤ 14	15-18	≥ 19
	AM 10	Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
	PIP 100	Piperacilina	≤ 17	18-20	≥ 21
	TIC 75	Ticarcilina	≤ 14	15-19	≥ 20
β -lactámico + inhibidor	AMC 30	Amoxicilina/Clavulánico	≤ 13	14-17	≥ 18
	SAM 20	Ampicilina/Sulbactam	≤ 11	12-14	≥ 15
	TZP 36	Piperacilina/Tazobactam	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefalosporinas	CZ 30	Cefazolina	≤ 14	15-17	≥ 18
	CXM 30	Cefuroxima	≤ 15	16-18	≥ 19
	CAZ 30	Ceftazidima	≤ 17	18-20	≥ 21
	CRO 30	Ceftriaxona	≤ 19	20-22	≥ 23
Carbapenémicos	IPM 10	Imipenem	≤ 19	20-22	≥ 23
	MEM 10	Meropenem	≤ 19	20-22	≥ 23
Monobactámicos	ATM 30	Aztreonam	≤ 17	18-20	≥ 21
Glucopéptidos (Gram +)	VA 30	Vancomicina	≤ 14	15-16	≥ 17
	TEC 30	Teicoplanina	≤ 14	15-16	≥ 17
Aminoglucósidos	CN 10	Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
	AN 30	Amikacina	≤ 14	15-16	≥ 17
	NET 30	Netilmicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Macrólidos (Gram +)	E 15	Eritromicina	≤ 13	14-22	≥ 23
	AZM 15	Azitromicina	≤ 13	14-22	≥ 23
Tetraciclinas	TE 30	Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
	DO 30	Doxiciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
Quinolonas	CIP 5	Ciprofloxacino	≤ 15	16-20	≥ 21
	NOR 10	Norfloxacino	≤ 12	13-16	≥ 17
	OFX 5	Ofloxacino	≤ 12	13-16	≥ 17
Lincosamidas	CC 2	Clindamicina	≤ 14	15-20	≥ 21
Otros	C 30	Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18

Grupo	Código	Antibiótico	Resistente (\leq mm)	Intermedio (mm)	Sensible (\geq mm)
	SXT 25	Trimetoprim/Sulfametoxazol	≤ 10	11-15	≥ 16