
Guía de Laboratorio

Bacteriología

Manual de guías de bacteriología

Guía de Laboratorio
Bacteriología
Manual de guías de bacteriología

Primera edición digital
Huancayo, 2022

De esta edición

© Universidad Continental, Oficina de Gestión Curricular
Av. San Carlos 1795, Huancayo-Perú
Teléfono: (51 64) 481-430 anexo 7361
Correo electrónico: recursosucvirtual@continental.edu.pe
<http://www.continental.edu.pe/>

Cuidado de edición

Fondo Editorial

Diseño y diagramación

Fondo Editorial

Todos los derechos reservados.

La *Guía de Laboratorio*, recurso educativo editado por la Oficina de Gestión Curricular, puede ser impresa para fines de estudio.

Contenido

Guía de práctica 1: Morfología bacteriana	5
Guía de práctica 2: Aislamiento e identificación de las principales especies de <i>Staphylococcus</i>	8
Guía de práctica 3: <i>Streptococcus</i>	15
Guía de práctica 4: Identificación de cocos y bacilos, gram negativos	20
Guía de práctica 5: Cultivo, aislamiento e identificación de enteropatógenos salmonella y shiguela	23
Guía de práctica 6: Cultivo, aislamiento de brucellas	26
Guía de práctica 7: Cultivo, aislamiento e identificación de no fermentadores	28
Guía de práctica 8: Identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
Guía de práctica 9: Hemocultivo	35
Guía de práctica 10: Urocultivo	38
Guía de práctica 11: Coprocultivo	41
Guía de práctica 12: Cultivo de secreciones	44
Guía de práctica 13: Antibiograma	47

Guía de práctica 1

Morfología bacteriana

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Los cultivos y muestras tienen que ser frescos para que no cambien las características tintoriales y morfológicas de las bacterias.

I. Objetivo

Identificar las características morfológicas mediante el uso de coloraciones como Gram, azul de metileno.

II. Instrucciones

- Realizar coloraciones: simples, diferenciales.
- Diferenciar que tipos de muestras se utilizan para cada coloración.
- Interpretar y evaluar correctamente los resultados obtenidos en las distintas coloraciones.

III. Equipos y materiales

- Microscopios.
 - Coloración de Gram.
 - Coloración de azul de metileno.
 - Láminas portaobjeto.
 - Varillas de coloración.
 - Aceite de inmersión.
 - Muestras de esputo.
 - Cepa de *Staphylococcus* y *Streptococcus*.
 - Cepa de *Escherichia coli*.
-
-

IV. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

V. Procedimiento experimental.

- Dividir la lámina en tres partes: 1/3 para rotular el número de muestra y 2/3 para la preparación del frotis.
- Tomar una porción de la muestra con el asa de siembra estéril.
- Colocar el asa sobre el portaobjeto y presionar ligeramente sobre este.
- Mover el asa trazando un espiral del centro a la periferia.
- Dejar cierta distancia entre el frotis y cada uno de los lados del portaobjeto.
- Dejar secar la muestra completamente a temperatura ambiente o pasar tres veces a través de la llama del mechero con el frotis hacia arriba.
- Aplicar la tinción utilizando el procedimiento correcto para cada coloración.

VI. Observaciones

Distinguir la diferencia entre una coloración dicrómica y monocrómica.

VII. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VIII. Cuestionario

1. ¿Cuáles son las formas bacterianas observadas en la práctica?

2. Según la coloración, se les denomina Gram positivas y Gram negativas. ¿Por qué?

3. ¿Cuál es el mordiente en la coloración Gram?

4. ¿Cuál es la afinidad del colorante hacia las bacterias al teñirlas?

Referencias

Jawetz, E., Hobden, J., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., Mitchell, T., Sakanari, J., Hotez, P. y Mejia, R. (2019). Jawetz, Melnick, & Adelberg. *Microbiología Médica* (28^a ed.) Mac Graw-Hill.

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.

Páginas de internet

American Society for Microbiology (1980-2021). *Clinical Microbiology Reviews* <https://journals.asm.org/loi/cmvr>

Center for Disease Control and Prevention (1995-2021). Emerging Infectious Diseases <https://wwwnc.cdc.gov/eid/>

Harvard Medical School (2021-2022). New England Journal of Medicine. www.nejm.org



Aislamiento e identificación de las principales especies de *Staphylococcus*

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Los cultivos, para distinguir las características culturales, no deben ser de más de 48 horas, así como las muestras deben de ser frescas.

I. Objetivo

Aislamiento e identificación de estafilococos mediante cultivo pruebas bioquímicas específicas.

II. Equipos y materiales

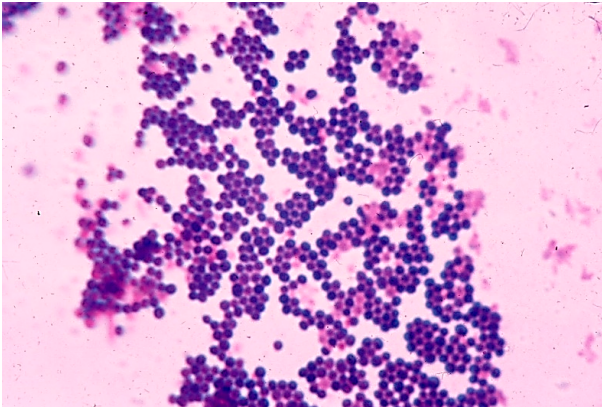
- Placa de agar sangre
- Placa de agar hipertónico de manitol salado
- Placa de agar DNAasa
- Placa de agar Muller-Hinton
- Tubos con caldo nutritivo
- Tubos con plasma
- Cepa de *S Aureus*
- Cepa de *Staphylococcus epidermidis*
- Cepa de *Staphylococcus saprophyticus*
- Escala de McFarland
- Hisopos estériles
- Agua destilada estéril
- Discos de novobiocina o neomicina
- Reactivo de catalasa

- Pinzas
- Láminas portaobjeto
- Set de colorantes de Gram

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental



A. Morfología microscópica y colonial

1. Inocular las tres cepas de estafilococos por dispersión agotamiento en la placa de agar sangre.
2. Incubar a 37 °C por 24 horas.



B. Lectura: Morfología microscópica y colonial

1. Observar las características típicas de las colonias de los estafilococos.
2. Hacer frotices en capa fina a partir de las colonias crecidas en el agar sangre, colorear por Gram y observar al microscópica 100X.
3. Anotar los resultados en el protocolo.

C. Crecimiento en medio líquido

1. Inocular las tres cepas de estafilococos en los tubos con caldo nutritivo.
2. Incubar a 37 °C por 24 horas.

D. Lectura: Crecimiento en medio líquido

1. Observar el crecimiento de los estafilococos, en el caldo nutritivo: turbidez homogénea en todo el tubo, con formación de poco sedimento.

E. Prueba de la catalasa

1. Colocar con el asa de siembra una pequeña parte de la colonia de cada una de las cepas sobre una lámina.
2. Añadir una gota de peróxido de hidrógeno.
3. Observar la aparición de burbujas, lo que indica la presencia de la enzima catalasa. Todos los estafilococos son catalasa; positivos.

F. Crecimiento en el agar manitol salado

1. Inocular las tres cepas de estafilococos en la placa de agar manitol salado.
2. Incubar a 37 °C por 24 horas.

G. Lectura: Crecimiento en el agar manitol salado

1. Observar las colonias manitas positivas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus saprophyticus* que pre-

sentan color amarillo por viraje del indicador rojo de fenol; y las colonias manitas negativas de *Staphylococcus epidermis*.

H. Prueba de la coagulasa

1. Inocular las tres cepas de estafilococos en tubos con plasma.
2. Incubar a 37 °C por 24 horas.

I. Lectura: Prueba de la coagulasa

1. Observar cada hora la aparición de coágulos durante cuatro horas. De ser negativo el resultado, dejar incubando y hacer una lectura final a las 24 horas.
2. Si aparece un coágulo, la bacteria posee la enzima coagulasa y se trata de la especie *Staphylococcus aureus*.

J. Prueba de la DNAasa

1. Inocular las tres cepas bacterianas en una placa de agar DNAasa en forma tupida en un área circular de 1 cm de diámetro.
2. Incubar a 37 °C por 24 horas.

K. Lectura: Prueba de la DNAasa

1. Añadir una gota de HCl al borde del crecimiento bacteriano de cada una de las especies y esperar uno minutos.
2. El HCl precipita el DNA contenido en el medio de cultivo. Alrededor del crecimiento de *Staphylococcus aureus* se observa un halo transparente como resultado de la producción de DNAasa de parte de la bacteria, que metabolizó el DNA contenido en el medio circundante.
3. Alrededor del crecimiento de las otras dos especies, no se encontrará el halo, sino turbidez; son DNAasa negativas.



L. Prueba de sensibilidad a la novobiocina

1. Inocular la placa de agar Muller Hinton con un hisopo para cada una de las cepas de estafilococos, en suero fisiológico, caldo TSA o agua destilada estéril, la turbidez de la suspensión homogénea debe ser equivalente a la concentración del patrón 0.5 de la escala de McFarland.
2. Colocar con una pinza previamente esterilizada al calor, un disco de novobiocina en la placa.
3. Incubar la placa a 37 °C por 24 horas.

M. Lectura: Prueba de sensibilidad a la novobiocina

1. Observar la aparición de un halo de inhibición alrededor del disco colocado en las placas inoculadas con *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, lo que indica sensibilidad a la novobiocina.
2. Observar que no aparece dicho halo de inhibición alrededor de la placa con *Staphylococcus saprophyticus* lo que indica esta es resistente a la novobiocina.
3. Esta prueba ayuda a diferenciar las tres especies patógenas de estafilococos.

Antibiograma

Se efectuará un antibiograma por el método de disco-difusión de Kirby-Bauer con máximo seis discos en la placa. Los *Staphylococcus aureus* son bacterias de interés clínico, es por ello que cuando se aísla una cepa de *Staphylococcus* se debe realizar el antibiograma, considerando la resistencia antibiótica de esta bacteria.

Protocolo

Medio de cultivo	Colonias				
	Tamaño	Forma	Indicador	Hemolisis	Gram
Agar Sangre					

Tipificación

Cepa	Manitol	Coagulasa	Catalasa	DNAasa	Novobiocina
<i>Staphylococcus aureus</i>					
<i>Staphylococcus epidermidis</i>					
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>					

V. Observaciones

Distinguir la diferencia entre las diferentes especies de *Staphylococcus*.

VI. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1. ¿Cuál es la especie de *Staphylococcus* de aislamiento común?



2. ¿Cuántas colonias se deben observar para desarrollar el procedimiento?

3. De las especies mencionadas, explique por qué algunas hacen virar al manitol salado y otras no.

4. Describa el protocolo para el estudio de *Staphylococcus*.

Referencias

Jawetz, E., Hobden, J., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., Mitchell, T., Sakanari, J., Hotez, P. y Mejia, R. (2019). Jawetz, Melnick, & Adelberg. *Microbiología Médica* (28^a ed.) Mac Graw-Hill.

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.



Guía de práctica 3

Streptococcus

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 90 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Los cultivos y muestras tienen que ser frescas.

I. Objetivo

Aislar e identificar *Streptococcus* mediante cultivo, medios de identificación bioquímica específicas.

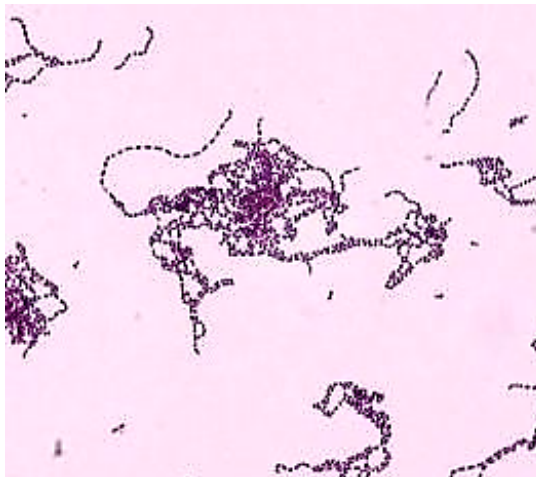
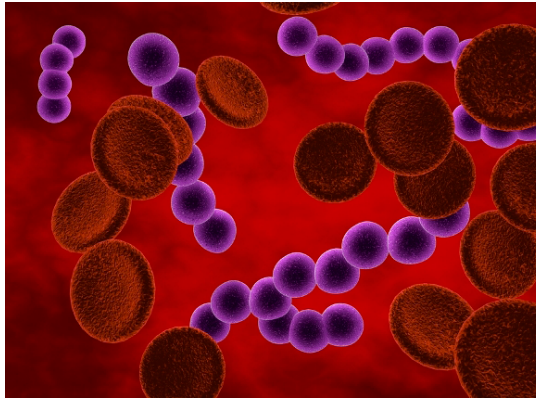
II. Equipos y materiales

- Cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*
- Placas de agar sangre
- Placas de agar chocolate
- Tubos con tioglicolato
- Caldo con NaCl al 6 %
- Discos de bacitracina
- Discos de optoquina
- Solución de desoxicolato al 2 % en frascos goteros
- Láminas portaobjeto
- Set de colorantes de Gram
- Asas de siembra
- Microscopio, aceite de inmersión
- Pinzas

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental



- a. Dividir con un marcador de cera, las placas de agar sangre y de agar chocolate en cuatro cuadrantes, para sembrar cada una de las cuatro cepas en cada cuadrante.
- b. En el cuadrante del agar sangre sembrado con *Streptococcus pyogenes*, colocar con ayuda de la pinza un disco de bacitracina.

- c. En los cuadrantes del agar sangre sembrados con Neumococo y *Streptococcus viridans*, colocar un disco de optoquina.
- d. Sembrar cada una de las cuatro cepas en tubos de caldo tioglicolato.
- e. Sembrar cada una de las cuatro cepas en un tubo con caldo con ClNa al 6 %.
- f. En cuatro láminas porta objeto, con ayuda del asa de siembra en aro, colocar una asada de cada cepa de *Streptococcus*, fijar y realizar la coloración Gram.
- g. Observar al microscopio las características morfológicas de las cuatro cepas.
- h. Incubar-las placas y los tubos a 37 °C por 24 horas.

V. Lectura

- a. Observar el desarrollo de las cuatro cepas en el agar sangre, apreciar el tipo de hemolisis, la sensibilidad a la bacitracina del *Streptococcus pyogenes*, la sensibilidad a la optoquina del neumococo y la resistencia del *Streptococcus viridans*.
- b. Observar el desarrollo de las cuatro cepas en el agar chocolate, agregando una gota de la solución de Desoxicolato a colonias de Neumococo y *Streptococcus viridans*, observando, cuando se seca el reactivo, que las colonias del Neumococo desaparecen, no así las de *Streptococcus viridans*.
- c. Apreciar el desarrollo de las cuatro cepas en los tubos de tioglicolato, apreciando su desarrollo en aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis. Observar que el neumococo metabolizó la inulina.
- d. Observar que sólo el Enterococo desarrollen el caldo con 6 % de NaCl.



Protocolo

Observaciones	Cepas			
	S. Pyogenes	S. Viridans	S. Pneumoniae	E. Faecalis
Desarrollo en el caldo				
Coloración de Gram				
Tipo de hemolisis en agar sangre				
Sensibilidad a la bacitracina				
Sensibilidad al optoquina				
Tamaño colonia en agar chocolate				
Desarrollo en tioglicolato				
Desarrollo en caldo con CINa 6% cambio de color				
Desaparición de las colonias con desoxicolato de sodio				

VI. Observaciones

Distinguir la diferencia entre las diferentes especies de Estafilococos.

VII. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VIII. Cuestionario

1. ¿Cuáles son las principales características de los *Streptococcus*?

2. ¿En qué medios se pueden aislar los *Streptococcus*?

3. ¿Cuál es la prueba para identificar a *Enterococcus faecalis*?

4. Describa el protocolo de trabajo para los *Streptococcus* y mencione en qué muestras es común el aislamiento.

Referencias

Jawetz, E., Hobden, J., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., Mitchell, T., Sakanari, J., Hotez, P. y Mejia, R. (2019). Jawetz, Melnick, & Adelberg. *Microbiología Médica* (28^a ed.) Mac Graw-Hill.

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.



Identificación de cocos y bacilos, gram negativos

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Las muestras para el examen directo y los cultivos deben ser frescos para evitar el deterioro y pérdida de las características culturales y morfológicas de las bacterias a estudiar.

I. Objetivos

- Conocer los diferentes fundamentos de las pruebas empleadas para la identificación.
- Realizar los diferentes métodos de identificación de las familias y géneros de cocos Gram positivos.
- Reconocer algunas especies mediante las técnicas de identificación empleadas.
- Mediante el empleo de medios de cultivos identificar enterobacterias.
- Realizar la correcta interpretación de las reacciones de los medios de cultivos mediante la intervención de enzimas y cambios de pH.

II. Equipos y materiales

- Cepas de Enterobacterias.
- Placas Petri con agar MacConkey.
- Placas con agar SS.
- Placas con agar EMB.
- Placas con agar XLD.

- Placas con agar Müller-Hinton.
- Caldo de enriquecimiento selenito.
- Láminas portaobjeto y cubreobjeto.
- Set de colorantes Gram.
- Cepas de Estafilococos.

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental

Hacer frotices de las cepas a partir de las colonias. Desarrolladas en el agar, utilizando solución fisiológica y colorear por el Gram. Observar con el objetivo de inmersión.

V. Observaciones

Debe utilizarse el objetivo de inmersión. Se coloca una gota de aceite de sobre la preparación. Se enfoca, preferentemente, con el micrométrico.

VI. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1.- Describa las características del cultivo de enterobacterias.

2.- ¿Cuál es la morfología de las bacterias observadas?



3.- Mencione la utilidad de los medios de cultivo para estas bacterias.

4.- Describa las principales diferencias entre estas bacterias.

Referencias

Jawetz, E., Hobden, J., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., Mitchell, T., Sakanari, J., Hotez, P. y Mejia, R. (2019). Jawetz, Melnick, & Adelberg. *Microbiología Médica* (28^a ed.) Mac Graw-Hill.

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.

Páginas de internet

American Society for Microbiology (1980-2021). *Clinical Microbiology Reviews* <https://journals.asm.org/loi/cmvr>

Center for Disease Control and Prevention (1995-2021). Emerging Infectious Diseases <https://wwwnc.cdc.gov/eid/>

Harvard Medical School (2021-2022). New England Journal of Medicine. www.nejm.org



Guía de práctica 5

Cultivo, aislamiento e identificación de enteropatógenos salmonella y shiguella

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Las cepas y muestras a procesar son de bacterias que producen enfermedades diarreicas e incluso procesos sépticos. Se exige el estricto cuidado con las medidas de bioseguridad como debe ser en todos los casos que trabajamos con microorganismos potencialmente patógenos.

I. Objetivo

Aislamiento e identificación de salmonella y shiguella dos de las bacterias patógenas en los seres humanos.

II. Equipos y materiales

- Placas Petri con agar MacConkey.
- Placas con agar SS.
- Placas con agar XLD.
- Placas con agar Müller-Hinton.
- Caldo de enriquecimiento selenito.
- Láminas portaobjeto y cubreobjeto
- Set de colorantes para Gram.
- Cepas de salmonella y shiguella.

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental

- Siembra primaria
- A partir de la muestra fresca o Cary Blair, en los medios selectivos:
 1. Agar XLD, sembrar por estría-agotamiento e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C.
 2. Agar salmonella-shigella, sembrar por estría-agotamiento e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C.
 3. Agar MacConkey, sembrar por estría-agotamiento e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C.
 4. Caldo selenito F, inocular aprox. una asada de la muestra e incubar por 18-24 horas a 35-37 °C. A partir de medio de enriquecimiento, Caldo selenito F, sembrar por estría-agotamiento en agar Salmonella-shigella e incubar a 37°C por 24 horas.
 5. Inocular las cepas bacterianas en los medios diferenciales Citrato, TSI, LIA y SIM.
 6. Comparar los resultados con tabla de reacciones de los medios diferenciales e identificar la cepa.
 7. Realizar el antibiograma.

V. Observaciones

Para identificación bioquímica de salmonella y shiguella, debe usarse la tabla de identificación.

VI. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1. ¿Cuál es el medio de transporte usado para la conservación de muestras de coprocultivo?

2. ¿Cuáles son las especies del género shigella y cuál es la de aislamiento común?

3. ¿Cuáles son las características bioquímicas y del cultivo en placa de Salmonella y shigella?

4. ¿Cuáles son los medios de cultivo para Campylobacter y cuál es la coloración de rutina?

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6ª ed.). Editorial Médica Panamericana.



Cultivo, aislamiento de brucellas

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

La muestra para el aislamiento e identificación de brucellas es sangre en el momento de alza de la temperatura del paciente llamado también pico febril.

I. Objetivo

Que el alumno aprenda las técnicas de siembra y técnicas anexas para identificación de brucellas. Que obtenga la información básica para hacer la descripción inicial de esta bacteria.

II. Equipos y materiales

- Autoclave.
- Microscopio.
- Mechero.
- Balanza.
- Placas Petri descartables.
- Tubos de ensayo 13 × 100.
- Asa de siembra.
- Frascos de hemocultivo.
- Agar sangre.
- Agar chocolate.
- Colorante de fuchina.
- Colorante de tionina.
- Reactivo de oxidasa.
- Jeringas estériles descartables.
- Material para toma de 4 muestra de sangre.

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental

- Antes de la asepsia adecuada, se debe:
 - Obtener de 5 a 10 ml de sangre con una jeringa estéril de 10 ml.
- Inocular en el frasco de hemocultivo. El frasco contiene el anticoagulante adecuado. Incubar el frasco a 37 °C durante cinco días.
- Ver si hay desarrollo realizar cultivo ciego en agar chocolate y agar sangre. Luego identificar mediante las pruebas pertinentes.

V. Observaciones

Realizar la prueba bacteriostática mediante medios de colorantes, requerimiento de CO₂ Catalasa, reducción de nitratos a nitritos producción de ureasa y tipificación serológica. Ello permitirá identificar brucellas.

VI. Cuestionario

1. ¿Qué son las brucellas?

2. Describa el protocolo de trabajo para brucellas.

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.



Cultivo, aislamiento e identificación de no fermentadores

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Los medios con cultivo positivo serán frescos de 48 horas de sembrado.

I. Objetivo

Aislar e identificar una bacteria no fermentadora como ejemplo del grupo de no fermentadoras.

II. Equipos y materiales

- Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en caldo nutritivo.
- Caldo tripticase en tubo de 13 x 100.
- Agar nutritivo en placa Petri.
- Agar MacConkey en tubo.
- Medio ceftrimide en placa Petri.
- Medio de TSI.
- Medio de urea.
- Reactivo de oxidasa.

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental



- Hacer un frotis a partir de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y colorear por el método de Gram.
- Sembrar la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en los diferentes medios de cultivo, por las técnicas conocidas. Incubar a 37 °C por 24-48 horas.

Resultados

Examen microscópico

- Observar las características morfológicas, bacilos pequeños, Gram negativos.

Examen macroscópico

- Observar las características de las colonias, similares a salmonella.

Características diferenciales

- Observe el desarrollo en MacConkey, TSI, oxidasa, urea, indol.



V. Observaciones

Distinguir las características culturales de la *Pseudomonas aeruginosa* con el resto de las bacterias no fermentadoras.

VI. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1. ¿Cuál es el factor de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*?

2. Mencione su diferenciación bioquímica.

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.



Guía de práctica 8

Identificación de *Mycobacterium tuberculosis*

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Las muestras de esputo tienen que procesarse cumpliendo estrictamente las medidas de bioseguridad.

I. Objetivo

Identificar Mycobacterias. ¿Cuál es su método diagnóstico?, ¿qué tipo de afecciones causan? y ¿cómo manejarlos hospitalariamente?

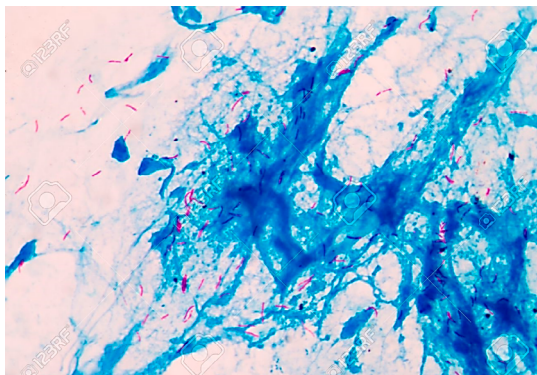
II. Equipos y materiales

- Microscopios
- Placas porta y cubre objetos
- Bajalengua
- Hisopos estériles
- Asas microbiológicas
- Placas coloreadas con Ziehl-Neelsen de bacilos tuberculosos
- Agar Löwenstein-Jensen positivos

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental



Diagnóstico de tuberculosis

Bioseguridad en la bacteriología de la tuberculosis

Existen estrictas normas de bioseguridad para el manejo de las muestras clínicas en el laboratorio.

El estudiante que se dedicará fundamentalmente a la observación de frotis y cultivos ya procesados y no al manejo de muestras clínicas.

Obtención de la muestra

Las muestras pueden provenir de zonas naturalmente estériles, zonas naturalmente contaminadas o de zonas estériles,

pero en las que, al efectuar la toma, se pasa por un área contaminada.

La expectoración es la muestra de más frecuente manejo, ya que, como dijimos, la pulmonar es la presentación más habitual. La expectoración debe ser representativa de las secreciones del tracto respiratorio inferior; para ello se debe recoger a primera hora de la mañana, previa higiene bucal, y con el esfuerzo de la tos, en frasco estéril.

Transporte y conservación

La rapidez es una condición fundamental en el transporte pues los bacilos se debilitan con el tiempo y prolifera, en caso de ser una muestra contaminada, la flora acompañante, por ejemplo: proliferación de la flora del tracto respiratorio superior en la expectoración. La conservación puede hacerse a 4 °C hasta siete días.

Procesamiento

El trabajo con las muestras clínicas en el laboratorio se realiza en cabina de seguridad, con las debidas protecciones para el personal.

Métodos directos

Microscopía-baciloscopía.

El examen microscópico directo o baciloscopía es la técnica fundamental para la investigación bacteriológica de la tuberculosis pulmonar, tanto para el diagnóstico como para el control de tratamiento, resultando también útil para muestras provenientes de otros orígenes.

Técnica de Ziehl-Neelsen

Se trata de una coloración diferencial basada en la capacidad de las mycobacterias de incorporar colorantes y luego retenerlos ante la acción de una mezcla de alcohol y ácido, lo que es conocido como ácido-alcohol resistencia.



V. Observaciones

Distinguir la diferencia entre una coloración de Ziehl-Neelsen con otras como la tinción de, Gram.

VI. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1. Mencione los factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Explique cómo se realiza la coloración. ¿Qué sucede con la pared bacteriana?

3. ¿Cuál es el fundamento de la coloración Ziehl-Neelsen?

4. ¿En qué muestras podemos observar a *Mycobacterium tuberculosis*?

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.

Guía de práctica 9

Hemocultivo

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

La muestra de sangre para hemocultivo se debe tomar durante el pico febril y el volumen mínimo en neonatos es 0.5 ml y en adultos 5 ml.

I. Objetivo

Que el alumno aprenda las técnicas de siembra y técnicas anexas para identificación de bacterias presentes en procesos sépticos. Que obtenga la información básica para hacer la descripción inicial de esta bacteria.

II. Equipos y materiales

- Autoclave.
 - Microscopio.
 - Mechero.
 - Balanza.
 - Placas Petri descartables.
 - Tubos de ensayo 13 × 100.
 - Asa de siembra.
 - Frascos de hemocultivo.
 - Agar sangre.
 - Agar chocolate.
-
-

- Colorante de fuchina.
- Colorante de tionina.
- Reactivo de oxidasa.
- Jeringas estériles descartables.
- Material para toma de muestra de sangre.
- Agar TSI.
- Agar LIA.

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental

- Se realiza la asepsia adecuada.
- Obtener de 5 a 10 ml de sangre con una jeringa estéril de 10 ml.
- Inocular en el frasco de hemocultivo, el frasco contiene el anticoagulante adecuado.
- Incubar el frasco a 37 °C durante cinco días. Se descarta los frascos a los 21 días.
- Si hay desarrollo, realizar cultivo ciego en agar chocolate y agar sangre.
- Luego identificar mediante las pruebas pertinentes.

V. Observaciones

En los hemocultivos se puede aislar bacterias que producen bacteriemia en los procesos sépticos que pueden ser bacilos, cocos Gram positivos y Gram negativos.

VI. Conclusiones



Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1. ¿Cuál es el procedimiento correcto para la realización del hemocultivo?

2. ¿Cuáles son los medios de cultivo y que contienen?

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6ª ed.). Editorial Médica Panamericana.



Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Los cuidados en la toma de muestra, conservación y transporte de la misma son muy importantes en este estudio.

I. Objetivo

Investigar la orina para determinar la presencia de bacterias responsables de las infecciones urinarias y consecuentemente hacer el estudio de sensibilidad de estas a los antibióticos convenientes.

II. Equipos y materiales

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Placas Petri descartables
- Tubos de ensayo 13 × 100
- Asa calibrada 1/1000
- Agar Mack conkey, agar sangre y agar CLED
- Medio de TSI, LIA, Citrato de Simmons
- Reactivo de Kovacks
- Hisopos largos de algodón
- Discos de sensibilidad
- Escala de McFarland
- Papel filtro

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental



- Con el asa de 10 coger 10 ul de la muestra de orina y sembrar en agar sangre, agar MacConkey y agar CLED, llevar a incubar a 37 °C por 24 horas.
- Colocar una gota de orina en la lámina portaobjeto y cubrirla con un cubreobjetos, observar al microscopio para el examen directo.
- Pasadas las 24 horas de incubación, leer las placas. Si no hay crecimiento es un cultivo negativo, pero si hubo crecimiento lo primero es:
 - Realizar el recuento de colonias en agar CLED.
 - Resembrar en los medios diferenciales sacando las colonias del agar McConkey y paralelamente realizar el antibiograma.



V. Observaciones

El uso del asa calibrada para el sembrado permite hacer el recuento de colonias. Así, podremos diferenciar si se trata de un ITU o contaminación.

VI. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1. ¿Cuántas colonias deben contarse para que el cultivo sea positivo?

2. ¿Cuáles son los medios de cultivo para urocultivo?

3. ¿Cuáles son las bacterias de aislamiento común en urocultivo?

4. ¿Qué observamos en el examen directo?

Referencias

Jawetz, E., Hobden, J., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., Mitchell, T., Sakanari, J., Hotez, P. y Mejia, R. (2019). Jawetz, Melnick, & Adelberg. *Microbiología Médica* (28^a ed.) Mac Graw-Hill.

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.

Guía de práctica 11

Coprocultivo

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

La cátedra facilitará cepas de salmonella y shigella para reconocer las principales características culturales de las bacterias más frecuentes en enfermedades diarreicas.

I. Objetivo

Investigar la muestra de heces para determinar la presencia de bacterias responsables de las infecciones intestinales. Además, hacer el estudio de sensibilidad de estas a los antibióticos convenientes.

II. Equipos y materiales

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Balanza de sensibilidad
- Placas Petri descartables
- Tubos de ensayo 13 × 100
- Asa de siembra
- Agar SS, XLD, EMB y McConkey
- Medio de TSI, LIA, Citrato de Simmons
- Reactivo de Kovacks
- Hisopos largos de algodón
- Discos de sensibilidad
- Escala de McFarland
- Papel filtro

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental



- Con el asa de siembra flameada coger la muestra de heces y sembrar en los medios de agar SS, agar McConkey, agar XLD y agar EMB llevar a incubar a 37 °C por 18 a 24 horas.
- Pasadas las 24 horas, si hay desarrollo de colonias lactosa negativo y positivo, pasar a los medios diferenciales.
- Realizar el antibiograma.

V. Observaciones

Todas las colonias lactosa negativas no necesariamente son patógenas.

VI. Conclusiones

Cada medio de cultivo para coprocultivo es selectivo y específico para el aislamiento de determinada bacteria en la presente práctica se trabajó con los medios de SS y caldo selenito específicos para salmonella y shigella.

VII. Cuestionario

1. Mencione los indicadores e inhibidores de los medios utilizados en coprocultivo.

2. ¿Cuáles son las bacterias lactosa positiva y lactosa negativa?

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6ª ed.). Editorial Médica Panamericana.



Guía de práctica 12

Cultivo de secreciones

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.
Docente:
Apellidos y nombres:

Instrucciones

Se requiere muestra de secreción que esté produciendo un cuadro infeccioso en este caso de secreción de herida operatoria.

I. Objetivo

Investigar una muestra de secreción de herida operatoria para determinar la presencia de una bacteria responsable de la infección consecuentemente hacer el estudio de sensibilidad de estas a los antibióticos convenientes.

II. Equipos y materiales

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Balanza de sensibilidad
- Placas petri descartables
- Tubos de ensayo 13 × 100
- Asa de siembra
- Agar Mack conkey o agar EMB, agar Sangre, agar manitol salado, agar SS
- Agar DNasa, agar chocolate
- Medio de TSI, LIA, citrato de Simmons

- Reactivo de Kovacks
- Hisopos largos de algodón
- Discos de sensibilidad
- Escala de McFarland
- Papel filtro
- Peroxido de hidrógeno 30 vol

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental

- Con el asa de siembra flameada, coger la muestra de herida operatoria y sembrar en los medios de agar Mac conkey, agar manitol salado, agar sangre, agar chocolate, agar SS y llevar a incubar a 37 °C por 18 a 24 horas.
- Pasadas las 18 a 24 horas examinar el sembrado, si no hay crecimiento esperar 24 horas más para informar como un cultivo negativo, pero si hubo crecimiento lo primero que hay que hacer es:
 - Realizar coloración de Gram, de acuerdo con ello hacer las pruebas de identificación correspondientes.
 - Resembrar en los medios diferenciales y las pruebas bioquímicas correspondientes, paralelamente realizar el antibiograma.

V. Observaciones

Distinguir las diferentes bacterias que se puede aislar e identificar de muestras de diferentes secreciones.

VI. Conclusiones

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.



VII. Cuestionario

1. ¿Cuál es la diferencia entre el agar chocolate y el agar sangre?

2. Mencione los principales hallazgos en muestras de secreciones.

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.



Guía de práctica 13

Antibiograma

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 180 min.

Docente:

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Se debe de tener cultivos puros e identificados mediante las pruebas correspondientes.

I. Objetivo

Conocer que son los antibióticos, para qué sirven, cuáles son sus mecanismos de acción y cómo se realiza un antibiograma.

II. Equipos y materiales

Materiales

- Placas porta y cubre objetos.
- Hisopos estériles.
- Asas microbiológicas.
- Placas con agar Mueller-Hinton.
- Discos de antibióticos.
- Incubadora.

Reactivos

- Azul de metileno safranina.
- Yodo Gram.
- Cristal violeta.
- Alcohol cetona.

III. Nota de seguridad

Cumpla con las medidas de bioseguridad. Use material de barrera (guantes guardapolvo, cofia, gorro, mascarilla N95).

IV. Procedimiento experimental

Inoculo

A partir de un cultivo puro, tomar una colonia con un hisopo estéril. Colocarla en agua destilada estéril o suero fisiológico. Comparar con el patrón estándar McFarland 0.5.

Antibiograma en Agar

Estriar en una placa de agar Mueller-Hinton horizontalmente, cambiar de posición hacerlo verticalmente, cambiar de posición hacerlo inclinado, cambiar de posición hacerlo nuevamente inclinado, terminar dando la vuelta el hisopo por el borde de la placa.

Colocar los discos en la placa Petri. Máximo 8 discos.

Gram positivos: oxacilina, penicilina, gentamicina, cotrimoxasol sulfametoxazol, ciprofloxacina, Clindamicina, eritromicina, linezolid, vancomicina, teicoplanina.

Gram negativos: amoxicilina ácido clavulánico, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, aztreonam, ciprofloxacina, gentamicina, ampicilina, cotrimoxasol sulfametoxazol.

Ampliaciones: carbapenémicos, tetraciclinas, fosfomicinas. Incubar a 37°C por 24 horas.

Realizar lecturas de halos de discos y comparar con las tablas CLSI.

V. Observaciones

Tener en cuentas condiciones para la realización del antibiograma.

VI. Conclusiones



Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

VII. Cuestionario

1. ¿A qué antibióticos son resistentes comúnmente las bacterias y por qué?

2. Describa el procedimiento para realizar el antibiograma.

Referencias

Winn, K., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Wood, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico: textos y atlas en color* (6^a ed.). Editorial Médica Panamericana.



