



**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA EN
LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

BACTERIOLOGÍA

Guías de Laboratorio



Visión

Ser la mejor organización de educación superior posible para unir personas e ideas que buscan hacer realidad sueños y aspiraciones de prosperidad en un entorno incierto

Misión

Somos una organización de educación superior que conecta personas e ideas para impulsar la innovación y el bienestar integral a través de una cultura de pensamiento y acción emprendedora.

Universidad Continental

Material publicado con fines de estudio
2020



Índice

VISIÓN	2
MISIÓN	2
NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO	3
ÍNDICE	3
Primera unidad	
Practica 01 Morfología Bacteriana	3
Practica 02 Estafilococos	6
Practica 03 Estreptococos	12
Practica 04 Estreptococo pneumoniae	15
Segunda unidad	
Practica 05 Cocos y bacilos Gram negativos	18
Practica 06 Enteropatógenos	20
Practica 07 Cultivo y Aislamiento de Brucellas	23
Practica 08 Cultivo aislamiento e identificación de no fermentadores	25
Tercera unidad	
Practica 09 Identificación de Mycobacterium tuberculosis	27
Practica 10 Hemocultivo	30
Practica 11 Urocultivo	32
Cuarta unidad	
Practica 12 Coprocultivo	34
Practica 13 Cultivo de secreciones	37
Practica 14 Antibiograma	38



Guía de práctica N° 1:

MORFOLOGIA BACTERIANA

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../Duración: 180 minutos

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

1. Propósito (de la práctica):

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

2. Indicaciones/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.

3. Equipos y materiales a utilizar:

- 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*

4. Notas de seguridad:

- Cumplir con las medidas de bioseguridad como es: Uso de material de barrera como son guantes, guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.
- Procedimiento experimental :



- Dividir la lámina en 3 partes: 1/3 para rotular el N° 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 éste.
- Mover el asa trazando un espiral del centro a la periferia.
- Dejar cierta distancia entre la frotis y cada uno de los lados del portaobjeto.
- Dejar secar la muestra completamente a temperatura ambiente o pasar 3 veces a través de la llama del mechero con el frotis hacia arriba.
- Aplicar la tinción utilizando el procedimiento correcto para cada coloración.

5. Observaciones:

Distinguir la diferencia entre una coloración dicromica y monocromica

6. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

7. CUESTIONARIO:

1. Cuáles son las formas bacterianas observadas en la práctica
2. Según la coloración de 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?

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires

PAGINAS DE INTERNET

- Applied Environmental Microbiology, www.asm.org
- Clinical Reviews Microbiology, www.asm.org
- Emerging Infectious Diseases www.cdc.gov
- New England Journal of Medicine www.nejm.org



Guía de práctica N° 02:

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS.

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha : .../.../.....Duración: 180 min

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

1. **Tema:** Identificación de Staphylococcus

2. **Propósito/objetivo:**

Aislamiento e identificación de estafilococos mediante cultivo pruebas bioquímicas específicas

3. **Equipos y materiales a utilizar:**

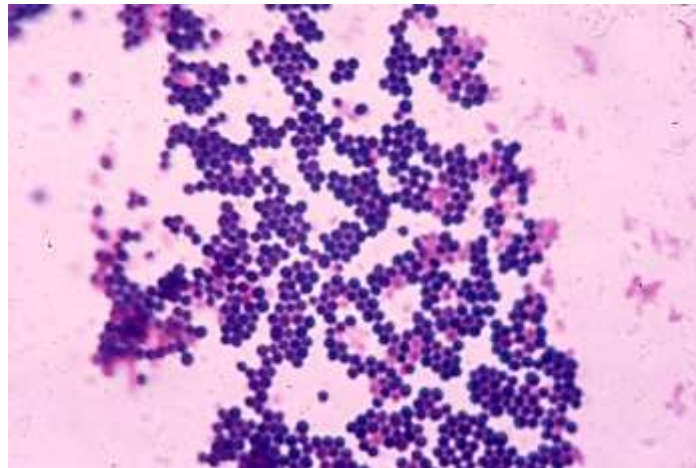
- Placa de agar sangre
- Placa de agar hipertónico de Manitol salado
- Placa de agar DNAasa
- Placa de agar Muller-Hinton
- Tubos con caldo nutritivo
- Tubos con plasma
- Cepa de S. Aureus
- Cepa de S. Epidermidis
- Cepa de S. Saprophyticus
- Escala de Mac Farland.
- Hisopos estériles
- Agua destilada estéril.
- Discos de Novobiocina o Neomicina.
- Reactivo de catalasa
- Pinzas
- Láminas portaobjeto
- Set de colorantes de Gram.



4. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:
Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

5. Procedimiento experimental:



A. Morfología microscópica y colonial

- Inocular las tres cepas de estafilococos por dispersión agotamiento en la placa de agar sangre.
- 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 manita positiva de *S. aureus* y *S. saprophyticus* que presentan color amarillo por viraje del Indicador rojo de fenol; y las colonias manita negativas de *S. 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, por espacio de 4 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 *S. 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 *S. 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 *S. Aureus* y *S. Epidermidis*, lo que indica sensibilidad a la Novobiocina.
2. Observar que no aparece dicho halo de inhibición alrededor de la placa con *S. Saprophyticus* lo que indica esta es resistente a la Novobiocina.
3. Esta prueba ayuda a diferenciar las tres especies patógenas de estafilococos.

4. Antibiograma

Se efectuará un antibiograma por el método de disco-difusión de Kirby-Bauer

con máximo 8 discos en la placa. Los *S. 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					

TIPIFICACION

Cepa	Manitol	Coagulasa	Catalasa	DNAasa	Novobiocina
s. Aureus					
S. Epidermidis					
S. Saprophyticus					

5. Observaciones:

Distinguir la diferencia entre las diferentes especies de estafilococos.

6. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

7. 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.



8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Jawetz, Ernest. (2011). Microbiología Médica de Jawets (25). s.i.: Mac Graw-Hill.
- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 03: STREPTOCOCCUS

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../.....Duración: 90 min

Instrucciones: Los cultivos y muestras tienen que ser frescas

1. Tema: Streptococcus

2. Propósito/objetivo:

Aislar e identificar Estreptococo mediante cultivo, medios de identificación bioquímica específicas

3. Equipos y materiales a utilizar:

- Cepas de S. Pyogenes, S, Pneumoniae, S. Viridans, S. 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



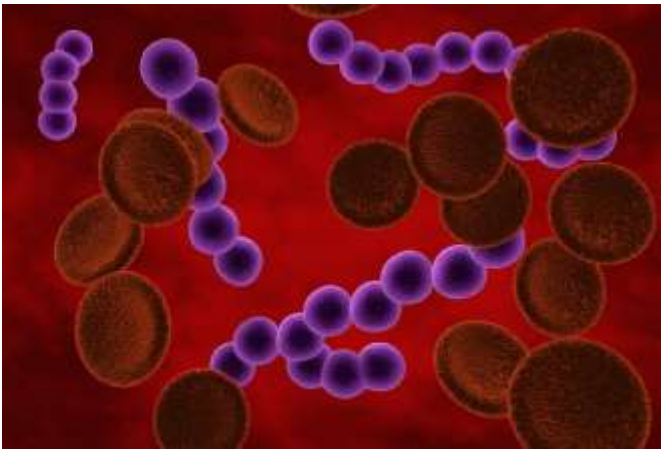
- Set de colorantes de Gram
- Asas de siembra
- Microscopio, aceite de inmersión
- Pinzas

4. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:

Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

5. Procedimiento experimental:



- a. Dividir con un marcador de cera, las placas de agar sangre y de agar chocolate en 4 cuadrantes, para sembrar cada una de las 4 cepas en cada cuadrante.



- b. En el cuadrante del agar sangre sembrado con *S. Pyogenes*, colocar con ayuda de la pinza un disco de Bacitracina.
- c. En los cuadrantes del agar sangre sembrados con Neumococo y *S. Viridans*, colocar un disco de Optoquina.
- d. Sembrar cada una de las 4 cepas en tubos de caldo tioglicolato.
- e. Sembrar cada una de las 4 cepas en un tubo con caldo con CINa al 6%
- f. En 4 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 4 cepas.
- h. Incubar-las placas y los tubos a 37°C por 24 horas.

6. Lectura

- a. Observar el desarrollo de las 4 cepas en el agar sangre, apreciar el tipo de hemolisis, la sensibilidad a la Bacitracina del *S. pyogenes*, la sensibilidad a la Optoquina del Neumococo y la resistencia del *S. viridans*.
- b. Observar el desarrollo de las 4 cepas en el agar chocolate, agregando 1 gota de la solución de Desoxicolato a colonias de Neumococo y *S. viridans*, observando, cuando se seca el reactivo, que las colonias del Neumococo desaparecen, no así las de *S. viridans*.
- c. Apreciar el desarrollo de las 4 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			
	<i>S. Pyogenes</i>	<i>S. Viridans</i>	<i>S. Pneumoniae</i>	<i>E. Faecalis</i>
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				



7. Observaciones:

Distinguir la diferencia entre las diferentes especies de Estafilococos.

8. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

9. 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 Enterococos Faecalis?
4. Describa el protocolo de trabajo para los Streptococcus y mencione en que muestras es común el aislamiento.

10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados.

- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 04

IDENTIFICACIÓN DE COCOS Y BACILOS, GRAM NEGATIVOS

Sección :
Docente :

Apellidos :
Nombres :
Fecha : .../.../.....Duración: 180 min

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

1. **Tema:** Identificación de cocos y bacilos Gram Negativos

2. **Propósito/objetivo:**

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

3. **Equipos y materiales a utilizar:**

- Cepas de Enterobacterias.
- Placas Petri con agar Mac Conkey.
- 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.

4. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:
Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

5. 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.

6. Observaciones:

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

7. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

8. 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.

9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Jawetz, Ernest. (2011). Microbiología Médica de Jawets (25). s.l.: Mac Graw-Hill.
- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires

PAGINAS DE INTERNET

- Clinical Reviews Microbiology, www.asm.org
- Emerging Infectious Diseases www.cdc.gov
- New England Journal of Medicine www.nejm.org



Guía de práctica N° 05

CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROPATOGENOS SALMONELLA Y SHIGUELLA.

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../..... Duración: 180 min

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 de ser en todos los casos que trabajamos con microorganismos potencialmente patógenos.

Tema: CULTIVO AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROPATOGENOS SALMONELLA Y SHIGUELLA.

1. Propósito/objetivo:

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

2. Equipos y materiales a utilizar:

- Placas Petri con agar Mac Conkey.
- Placas con agar SS.
- Placas con agar XLD
- Placas con agar Müeller Hinton
- Caldo de enriquecimiento Selenito
- Láminas portaobjeto y cubreobjeto
- Set de colorantes para Gram
- Cepas de Salmonella y Shiguella

3. Notas de seguridad:

- Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:
- Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

**4. 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 Mac Conkey**, 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

5. Observaciones:

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

6. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

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



8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 6

CULTIVO, AISLAMIENTO DE BRUCELLAS

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../ Duración: 180 minutos

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.

Tema: CULTIVO, AISLAMIENTO DE BRUCELLAS

1. Propósito/objetivo:

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

2. Equipos y materiales a utilizar:

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Balanza
- Placas Petri descartables
- Tubos de ensayo 13 x 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.



3. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:

Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

4. Procedimiento experimental :

Previa 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 5 días.

Si hay desarrollo realizar cultivo ciego en agar chocolate y agar sangre.

Luego identificar mediante las pruebas pertinentes.

5. Observaciones:

Se realiza la prueba bacteriostática mediante medios de colorantes, requerimiento de CO₂ Catalasa, reducción de nitratos a nitritos producción de ureasa y tipificación serológica. Nos permitirá identificar Brucellas.

6. Conclusiones:

7. Cuestionario

1. ¿Qué son las brucellas?
2. Describa el protocolo de trabajo para Brucellas

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericano, B. Aires



Guía de práctica N° 7

CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE NO FERMENTADORES

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../Duración: 180 minutos

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

Tema: Aislamiento de no fermentadores (Pseudomona aeruginosa)

1. Propósito/objetivo:

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

2. Equipos y materiales a utilizar:

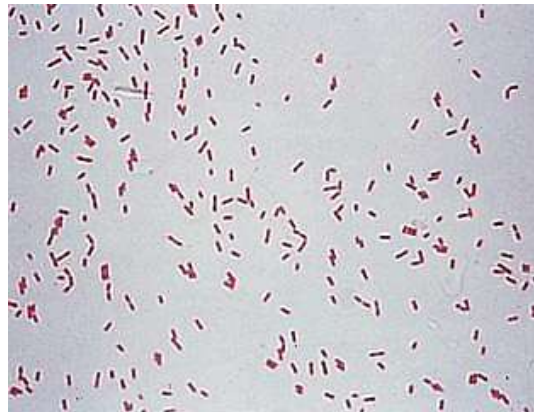
- Cepa de Pseudomonas aeruginosa en caldo nutritivo
- Caldo tripticase en tubo de 13 x 100
- Agar nutritivo en placa Petri
- Agar Mac Conkey en tubo
- Medio ceftrimide en placa Petri.
- Medio de TSI
- Medio de Urea
- Reactivo de oxidasa



3. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:
Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

4. Procedimiento experimental:



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

Resultados

Examen microscópico

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

Examen macroscópico

- o Observar las características de las colonias, similares a *Salmonella*.

Características diferenciales

- o Observe el desarrollo en Mac Conkey, TSI, Oxidasa, Urea, Indol.

5. Observaciones:

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



6. Conclusiones:

- Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

7. Cuestionario

1. ¿Cuál es el factor de virulencia de Pseudomona Aeruginosa?
2. Mencione su diferenciación bioquímica.

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados.

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 8

IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIUM TUBERCULOSO

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../Duración: 180 minutos

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

Tema: IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIUM TUBERCULOSO

1. Propósito/objetivo:

Identificar Mycobacterias, cuál es su método diagnóstico, que tipo de afecciones causan y cómo manejarlos hospitalariamente.

2. Equipos y materiales a utilizar:

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

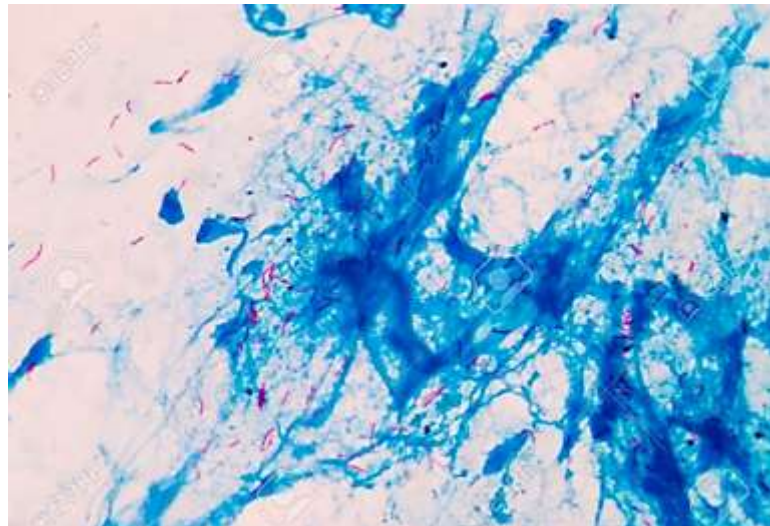
3. Notas de seguridad:

- Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:
- Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo



- Mascarilla N 95, cofia, gorro.

4. Procedimiento experimental :



DIAGNOSTICO 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 ej.: proliferación de la flora del tracto respiratorio superior en la expectoración. La conservación puede hacerse a 4 °C hasta 7 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.



5. Observaciones:

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

6. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

7. CUESTIONARIO:

1. Mencione los factores de virulencia de Mycobacterium tuberculosis.
2. Explique como se realiza la coloración, ¿Que sucede con la pared bacteriana?
3. ¿Cuál es el fundamento de la coloración Ziehl-Neelsen?
4. En que muestras podemos observar a Mycobacterium tuberculosis.

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Gestion%20de%20calidad%20modulo%203.pdf
- <http://www.ingesa.msc.es/estadEstudios/documPublica/pdf/actualzFasePreanalitica.pdf>
- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 9

HEMOCULTIVO

Sección :
Docente :

Apellidos :
Nombres :
Fecha :/...../Duración: 180 minutos

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

Tema: Hemocultivo

1. Propósito/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.

2. Equipos y materiales a utilizar:

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Balanza
- Placas Petri descartables
- Tubos de ensayo 13 x 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

3. Notas de seguridad:

- Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:
- Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

4. 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 5 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.

5. 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.

6. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

7. Cuestionario

1. ¿Cuál es el procedimiento correcto para la realización del hemocultivo?
2. ¿Cuáles son los medios de cultivo y que contienen?

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 10

UROCULTIVO

Sección :
Docente :

Apellidos :
Nombres :
Fecha :/...../Duración: 180 minutos

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

9. Tema: UROCULTIVO

10. Propósito/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.

11. Equipos y materiales a utilizar:

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Placas petri descartables
- Tubos de ensayo 13 x 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 Mc Farland.
- Papel filtro.

12. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:

Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

13. Procedimiento experimental :

- Con el asa de 10 coger 10 ul de la muestra de orina y sembrar en Agar Sangre, Agar Mack conkey y Agar CLED, llevar a incubar a 37° grados 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

14. Observaciones:

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

15. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

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. ¿Que observamos en el examen directo?

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 11

COPROCULTIVO

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../Duración: 180 minutos

Instrucciones: La cátedra facilitará cepas de Salmonella y Shigella para poder reconocer las principales características culturales de las bacterias más frecuentes en enfermedades diarreicas.

15. Tema: COPROCULTIVO

16. Propósito/objetivo:

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

17. Equipos y materiales a utilizar:

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Balanza de sensibilidad.
- Placas petri descartables
- Tubos de ensayo 13 x 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 Mc Farland.
- Papel filtro.

18. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:

Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

19. 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° grados 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.



20. Observaciones:

Todas las colonias lactosa negativas no necesariamente son patógenas.

21. 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.

CUESTIONARIO:

1. Mencione los indicadores e inhibidores de los medios utilizados en coprocultivo.
2. ¿Cuáles son las bacterias lactosa positiva y lactosa negativa?

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 12

CULTIVO DE SECRESIONES

Sección :	Apellidos :
Docente :	Nombres :
	Fecha :/...../Duración: 180 minutos

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

22. Tema: CULTIVO DE SECRESIONES

23. Propósito/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.

24. Equipos y materiales a utilizar:

- Autoclave
- Microscopio
- Mechero
- Balanza de sensibilidad.
- Placas petri descartables
- Tubos de ensayo 13 x 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 Mc Farland.
- Papel filtro.
- Peroxido de hidrogeno 30 vol.



25. Notas de seguridad:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:

Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

26. Procedimiento experimental :

- Con el asa siembra flameada coger la muestra de herida operatoria y sembrar en los medios de Agar Mac conkey y Agar Manitol salado agar sangre, agar chocolate, SS llevar a incubar a 37° grados 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 a ello hacer las pruebas de identificación correspondientes.
Resembrar en los medios diferenciales y las pruebas bioquímicas correspondientes, paralelamente realizar el antibiograma

27. Observaciones:

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

28. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la diferencia entre el Agar Chocolate y el Agar Sangre?
2. Mencionar los principales hallazgos en muestras de secreciones.

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



Guía de práctica N° 13

ANTIBIOGRAMA

Sección :
Docente :

Apellidos :
Nombres :
Fecha :/...../Duración: 180 min

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

29. Tema: ANTIBIOGRAMA

30. Propósito/objetivo:

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

31. Equipos y materiales a utilizar:

MATERIALES:

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

REACTIVOS:

- Azul de metileno
- Safranina
- Iodo Gram
- Cristal violeta
- Alcohol cetona

**32. Notas de seguridad:**

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:

Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro

33. Procedimiento experimental :**INOCULO:**

A partir de un cultivo puro tomar una colonia con un hisopo estéril.

Colocarlo 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.

34. Observaciones:

Tener en cuentas condiciones para la realización del antibiograma

35. Conclusiones:

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe.

CUESTIONARIO:

1. ¿A que antibióticos son resistentes comúnmente las bacterias y por qué?
2. Describa el procedimiento para realizar el antibiograma.

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires