|  |
| --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | NOVIEMBRE 2020- ABRIL 2021 |
| **ASIGNATURA** | **MICROBIOLOGÍA II** | **SEMESTRE: 4** | **PARALELO: A** |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | **ANA CAROLINA GONZÁLEZ R** |
|  **FECHA** | **29/01/2021** |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | **6** | **HORA: 14:00-17:00H** | **DURACIÓN: 3H** |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | **GRUPO 1** | **GRUPO 2** |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |  |
|  **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | AULA VIRTUAL |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | COPROCULTIVO  |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE.** |
| Diagnostica e identifica las infecciones de bacterias Gram positivas y Gram negativas en órganos y Sistemas. Evalúa la sensibilidad y resistencia bacteriana con la ayuda del antibiograma. |
| **OBJETIVO GENERAL** | Aplicar los métodos convencionales para el diagnóstico microbiológico de muestras de heces en pacientes con enfermedad diarreica aguda. |
| **Objetivos específicos** | 1.-Describir las condiciones adecuadas para la toma y transporte de la muestra de heces.2.-Aislar los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA.3.-Identificar los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA.4.-Determinar la susceptibilidad antimicrobiana del (los) microorganismo(s) aislado(s).5.-Analizar los resultados obtenidos. 6.-Reportar los resultados obtenidos, siguiendo las normas de taxonomía y de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana |

|  |
| --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | MAYO2020- OCTUBRE 2020 |
| **ASIGNATURA** | **MICROBIOLOGÍA II** | **SEMESTRE: 4** | **PARALELO: B** |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | **ANA CAROLINA GONZÁLEZ R** |
|  **FECHA** | **31/08/2020** |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | **6** | **HORA: 14:00-17:00H** | **DURACIÓN: 3H** |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | **GRUPO 1** | **GRUPO 2** |
| ALMACHI CHUQUILLA RICARDO ALONSO  | MUÑOZ GUEVARA ALEJANDRO  |
| AMPUDIA ARIAS ANA BELEN | PALOMO MASABANDA LESLIE PAMELA  |
| ANALUISA MEJIA NORMA PAOLA - LEGALIZADA (DEFINITIVA) | PUJOS AGUALONGO ARIANA  |
| BARRIGAS PEÑAFIEL EVELYN KATHERYNE - | QUINTANILLA QUINTANILLA ANA ELIZABETH  |
| CAMPOVERDE JAYA NICOLE ESTEFANIA  | RIOFRIO MONGE VERONICA ESTEFANIA  |
| CARRILLO BECERRA JENNIFER IVETTE  | ROBLES REYES ROSA ANGELICA -  |
| CHARCO VARGAS JHEISON VINICIO - LEGALIZADA (DEFINITIVA) | ROJAS LIZCANO LUCERO NAYLETH -  |
| CUENCA GAONA HEYDI CRISTINA | SALAZAR MARROQUIN ALEJANDRA ELIZABETH  |
| MALACATUS VALDIVIEZO JOEL ALEXANDER  | SAMANIEGO PARRA THALIA XIOMARA -  |
| MEJIA CHICAIZA ANTHONY JAVIER - | SANGOTUÑA PILAGUANO MARYURI GUADALUPE  |
| MINA VASQUEZ KIARA STEFANIA - | SILVA DURAN NATALIA ESTEFANIA -  |
|  | MULLO ANILEMA GEORGINA NOEMI  | TANGUILA ANDY MIRKA ROCIO - |
|  | VEINTIMILLA SOLIZ KELY JACQUELINE  | YUGCHA VERDESOTO ARACELLY IBETH |
|  **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | AULA VIRTUAL |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | COPROCULTIVO  |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE.** |
| Diagnostica e identifica las infecciones de bacterias Gram positivas y Gram negativas en órganos y Sistemas. Evalúa la sensibilidad y resistencia bacteriana con la ayuda del antibiograma. |
| **OBJETIVO GENERAL** | Aplicar los métodos convencionales para el diagnóstico microbiológico de muestras de heces en pacientes con enfermedad diarreica aguda. |
| **Objetivos específicos** | 1.-Describir las condiciones adecuadas para la toma y transporte de la muestra de heces.2.-Aislar los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA.3.-Identificar los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA.4.-Determinar la susceptibilidad antimicrobiana del (los) microorganismo(s) aislado(s).5.-Analizar los resultados obtenidos. 6.-Reportar los resultados obtenidos, siguiendo las normas de taxonomía y de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana |
|  |
| **FUNDAMENTO TEÓRICO:** |
| Las infecciones del tracto gastrointestinal representan un grave problema de salud pública. La diarrea es la manifestación más común de esas infecciones, las cuales constituyen una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en lactantes y niños menores de cinco años, con el mayor número de casos en los países en vías de desarrollo de Asia, África y Latinoamérica. La terapia de rehidratación oral, se ha identificado como la medida más eficaz para la reducción de la mortalidad por diarrea. Una mayor reducción de la misma se alcanzará al lograr el tratamiento integral de los casos, particularmente en los cuadros de disentería y de diarrea persistente.La etiología de la enfermedad diarreica es diversa y numerosos esfuerzos se han realizado para tratar de explicarla, observándose que el factor infeccioso continua siendo el más importante, sin duda, por su carácter transmisible. De los agentes infecciosos, los bacterianos se encuentran entre los más frecuentes en todos los países del mundo.La utilidad del diagnóstico de la diarrea se enfoca fundamentalmente desde dos puntos de vista:1.El clínico, para la atención y seguimiento de pacientes, particularmente cuando está indicado el tratamiento con antibiótico-terapia, como, por ejemplo, en la disentería.2.Desde el punto de vista de salud pública: control de brotes, vigilancia epidemiológica y estudio sobre vacunas.Definiciones operativas:Diarrea aguda: incremento en el número o volumen de las heces de 72 horas o menos de duración.Diarrea crónica o persistente: incremento en el número o volumen de las heces de más de 14 días de duración.Disentería: historia de moco o sangre en las heces con tenesmo o dolor al defecar y temperatura axilar de 38,5 ºC.Gastroenteritis: diarrea líquida de color amarillo verdosa o no, acompañada con vómito y fiebre en algunas oportunidades.Fiebre entérica: fiebre, cefalea, dolor abdominal, bradicardia relativa, esplenomegalia y leucopenia. Ej: Fiebre tifoidea.El estudio de la material fecal, para el aislamiento e identificación de las bacterias productoras de diarrea se denomina: coprocultivo.Al realizar un coprocultivo es importante tener presente:Flora bacteriana intestinal:En el intestino delgado, el duodeno es estéril, en el yeyuno aparecen enterococos, lactobacilos y difteroides, en el íleon se suman algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y anaerobios gramnegativos, en una proporción de aproximadamente 105 por gramo de heces.En el intestino grueso, la flora habitual constituye el 50% del peso seco de las heces.Las bacterias anaerobias que se encuentran en mayor proporción son las siguientes: *Bacteroides* 100%, *Peptococcus, Fusobacterium, Peptostrepotococcus, Lactobacillus y Clostridium.*Las bacterias anaerobias facultativas o aerobias son las siguientes: E. coli 100%, Klebsiella y Enterobacter 40 – 80%, *Proteus* 5-50%, *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterococccus* sp. 100%, *Staphylococcus* 30-50%.Esta flora se mantiene en equilibrio por diferentes mecanismos tales como: producción de bacteriocinas y sustancias tóxicas como ácidos grasos, entre otras.ETIOLOGÍA Y PATOGENIAEn la trascendencia del proceso diarreico, interviene no solo la patogenicidad del agente, sino la respuesta particular del huésped y de su propio ecosistema microbiano, esto trae como consecuencia que el espectro de respuestas clínicas varíe de un individuo a otro, manifestándose en unos, con enfermedades clínicas graves, en otros, con síntomas leves, y en otros, con infección intestinal subclínica, de allí que algunas veces al realizar coprocultivos en personas sin diarrea, se aislen enteropatógenos.COPROCULTIVOETAPA PRE-ANALÍTICAMuestra: La muestra de heces o hisopado rectal debe ser recolectada durante el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. Utilizar un envase de boca ancha, tapa hermética, preferiblemente estéril, en caso de muestras líquidas se recomienda recolectarla en un envase para recolección de orina.Conservación y transporte de la muestra: Si la muestra no se cultiva de inmediato, antes de las dos horas, se recomienda colocarla en un medio de transporte: Cary Blair y mantenerla a temperatura ambiente por un lapso no mayor a 5 días.Datos clínicos y epidemiológicos del paciente: Edad, síntomas, tiempo de evolución del cuadro diarreico, tipo de alimentos ingeridos, contacto con animales y cuáles, procedencia, ocupación.ETAPA ANALÍTICAExamen directo:Examen macroscópico: consistencia, color, olor, presencia o ausencia de moco y/o sangre.Examen microscópico: para determinar rápidamente la naturaleza de una enfermedad diarreica es de gran ayuda y tiene un alto grado de confiabilidad la Investigación de leucocitos fecales, que consiste en determinar el tipo de células inflamatorias presentes en las heces; esta información orienta sobre la naturaleza del proceso infeccioso, ejemplo, en la shigelosis hay abundancia de neutrófilos polimorfonucleares.Detección de leucocitos fecales: 1.Colocar una pequeña cantidad de moco o de heces en una lámina y mezclar con 2-3 gotas de azul de metileno al 1%.2.Cubrir con una laminilla y esperar 2 a 3 minutos con la finalidad de obtener una buena coloración nuclear.3.Observar al microscopio con los objetivos secos (10X y 40X).Nota: También se puede realizar un frotis y colorearlo con una coloración simple o compuesta.Interpretación: La presencia de 5 o más leucocitos por campo microscópico sugiere la presencia de un agente enteroinvasor. La ausencia de células inflamatorias sugiere la presencia de un agente toxigénico Aislamiento bacteriano:En las muestras de heces, las bacterias entéricas patógenas se encuentran siempre asociadas a una gran variedad de bacterias comensales, es por ello, que para facilitar el aislamiento y posterior identificación de estas bacterias, se emplean diferentes medios de enriquecimiento, selectivos y selectivos diferenciales Medios selectivos y selectivos diferenciales: La muestra completa (Suspensión fecal en solución salina fisiológica) o conservada en Cary Blair se siembra en los medios agar MacConkey (MK), agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), agar salmonella-shigella (SS), agar cefsulodin-irgasan-novoviocina (CIN), agar desoxirribonucléico-ampicilina (ADN-AMP), agar tiosulfato-citaro-sales biliares (TCBS) y agar preston modificado (PM). Todos los medios a excepción del CIN y PM, son incubados a 36 °C durante 24 horas y luego a temperatura ambiente por 24 horas más. Los medios CIN y PM se incuban durante 48 horas a temperatura ambiente (25 °C), 42 °C y en microaerofilia, respectivamente.Medios de enriquecimiento: Se utiliza el caldo selenito (para enterobacterias) y agua peptonada alcalina (APA) pH 8,4, para Vibrio, los cuales después de transcurridos 6-8 horas de incubación a 36°C, del caldo selenito se toma una muestra con el asa en aro de la parte más superficial del caldo y se inoculan los medios agar MK, XLD y SS, y del mismo modo a partir del APA al agar TCBS, luego estos medios se incuban en las condiciones anteriormente señaladas.Identificación:*Escherichia coli* diarreogénicas: Se investigan cuatro tipos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) *E. coli* enterotoxigénica productora de la toxina termolábil (ECET-TL), *E. coli* enterohemorrágica O:157 H:7 (ECEH). Para ello se seleccionan del agar MK, de la siembra directa con la materia fecal, 5 colonias fermentadoras de la lactosa sugestivas de E. coli, las colonias seleccionadas se identifican como E. coli mediante las pruebas de: oxidasa, Kligler, Indol-motilidad, citrato. A esta bioquímica inicial se le adiciona el medio lisina-hierro-agar (LIA), cuando se sospecha de ECEI (particularmente cuando el recuento de leucocitos es superior a 5 x campo microscópico), la cual no decarboxila la lisina. Cuando se sospecha de ECEH serotipo O:157 H:7, se adiciona caldo sorbitol, la cual no fermenta el sorbitol, también se recomienda el uso de agar MK con sorbitol para la recuperación de este serotipo Luego en el caso de ECEP, ECEI y ECEH, se procede a realizar la identificación serológica, utilizando antisueros comerciales anti “O” y la determinación de la toxina termolábil en el caso de ECET-TL.En la actualidad, la identificación definitiva de estas categorías de *E. coli* se realiza mediante técnicas de biología molecular, detectando genes que codifican fundamentalmente factores de virulencia.Géneros *Salmonella* y *Shigella*: La recuperación e identificación de estos géneros, se realiza seleccionando colonias no fermentadoras de la lactosa de los medios MK, XLD y SS, de la siembra directa y a partir de la siembra en estos medios del caldo selenito. También se seleccionan como colonias sospechosas de Salmonella, las no fermentadoras de la lactosa y con producción de H2S que han desarrollado en los medios XLD y SS . La identificación bioquímica se realiza mediante las pruebas de oxidasa, kligler, LIA, motilidad-indol-ornitina (MIO), citrato, urea y otras que se consideren necesarias  La identificación serológica se realiza con antisueros polivalente anti ”O” para los grupos A, B, C y D en el caso de *Shigella* y antisueros anti ”O” para los grupos A,B, C, C1-2, D, E y F en el género Salmonella.Género *Yersinia*: Se investiga fundamentalmente en el medio CIN. Después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente (22 °C), se seleccionan colonias fermentadoras del manitol, la identificación bioquímica se realiza mediante las pruebas de: oxidasa, kligler, urea, motilidad a 36 y 22 °C Género *Aeromonas* : La búsqueda de este género bacteriano se realiza en los medios MK, XLD, y SS, sembrados directamente con la materia fecal o a partir del caldo selenito. En algunas oportunidades se puede recuperar del agar TCBS. En los primeros medios se recupera como una colonia no fermentadora de la lactosa, pero algunas especies son fermentadoras de este carbohidrato. Del medio TCBS, puede aislarse como fermentadora o no de la sacarosa. En el caso del ADN-AMP, la búsqueda se facilita porque además del carácter selectivo del medio, la mayoría de las cepas hidrolizan el ADN, lo cual se evidencia por el viraje del indicador de pH azul de toluidina, de azul a rosado. La identificación bioquímica se realiza mediante las pruebas de oxidasa (positiva), fermentación de glucosa y se debe realizar la diferenciación con el género Vibrio y *Plesiomonas shigelloides.**Plesiomonas shigelloides*: Se investiga en los medios MK, XLD y SS de la siembra directa o a partir del caldo selenito . Se seleccionan colonias no fermentadoras de la lactosa que deben ser positivas a las pruebas de oxidasa y fermentación de la glucosa; al igual que en el género *Aeromonas*, realizar diferenciación con los géneros relacionados .*Vibrio cholerae*: Del medio TCBS de la siembra directa o a partir del APA, se seleccionan colonias fermentadoras de la sacarosa . Con la coloración de Gram de las colonias sugestivas se confirma que sean bacilos gramnegativos para continuar la identificación. Luego se comprueba que sean oxidasa positiva, fermentadoras de la glucosa, no productoras de gas, crecimiento en caldo nutritivo con cloruro de sodio 1% pero no al 6,5%. Se deben realizar otras pruebas bioquímicas para diferenciar a V. cholerae de otros géneros relacionadosLuego se realiza la tipificación serológica, con antisueros “O1” y “O139”. En el caso de “O1”, se debe realizar la serotipificación para determinar si es el serotipo Owaga o Inaba, y la biotipificación si se trata del biotipo Clásico o El Tor . En los laboratorios de referencia se debe determinar si la cepa aislada es productora o no de la toxina termolábil.*Campylobacte*r sp.: A partir del medio PM, después del período de incubación durante 48 horas a 42 °C en microaerofilia (frasco con la vela), se investigan las campilobacterias termotolerantes, las colonias sospechosas son de color gris, brillantes, con aspecto de gota de agua, algunas pueden seguir la línea de siembra, adherentes, a las cuales se les practica una coloración de Gram con el fin de observar bacilos gramnegativos curvos, en forma de coma o con apariencia de alas de gaviota. La identificación de las especies más involucradas en trastornos diarreicos se realiza mediante la prueba de oxidasa (positiva) y pruebas bioquímicas.Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para el tratamiento específico se realizan en los siguientes casos:a)Fiebre tifoidea causada clásicamente por *S. typhi*, sin embargo, otras salmonelas como *S. paratyphi* A, B, *S. cholerasuis* producen cuadros clínicos similares.b)Síndrome disentérico: los agentes asociados son diversos: *Shigella* sp., ECEI, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* sp., *Plesiomonas shigelloides*, *S. typhimurium*, *V. parahaemoliticus* entre otros. Se recomienda tratamiento específico para Salmonella sp. en el caso de menores de un año o cuando se sospeche de infección extraintestinal.c)Diarrea crónica o persistente que puede ser causada por *C. jejuni, Salmonella* sp. y ECEP.d)Cólera: producido por *V. cholerae* O1 y O139. El tratamiento no cura la enfermedad, pero acorta el volumen y duración de la diarrea y reduce el período de excreción del Vibrio. Se recomienda sugerir al médico tratante realizar un estudio de control post-tratamiento.ETAPA POST-ANALÍTICAInforme de resultados:Datos personales del paciente: Nombre y apellidos, cédula de identidad. Nombre del médico tratante Fecha de recepción de la muestra y emisión del reporte.Tipo de muestra: Heces completas o hisopado rectalExamen realizado: Coprocultivo o cultivo y antibiogramaResultados del examen directo: fresco o frotis: Azul de metileno al 1% o Gram: Observación o no de leucocitos mononucleares o polimorfonucleares (cantidad x campo microscópico).Agente microbiano aislado (género y especie):Antibiograma: Solo se debe realizar en aquellos casos que se mencionaron anteriormente. Observaciones: Mencionar solo los microorganismos investigados |
|  |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** |
| **Equipos** | **Materiales** | **Reactivos** |
| Microscopios, mecheros | Muestra de heces, asas, placas, láminas portaobjeto | Coloración de Gram,  |
| Estufa |  Medios de cultivo agar macConkey y agar Salmonella Shigella | Azul de metileno al 1%, reactivo de oxidasa, Solución salina fisiológica (SSF) |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** |
| 1.Realizar el examen macroscópico y microscópico (leucocitos fecales) de una muestra de heces y describir lo observado en cada caso.2.Preparar una suspensión fecal en SSF y sembrar con pipeta Pasteur en los diferentes medios selectivos-diferenciales, selectivos y de enriquecimiento, diseminar por agotamiento en las placas de agar e incubar a 37°C 12-18/H3.- Posteriormente Observar las placas sembradas en el período anterior, describa las características observadas en cada medio y seleccione las colonias de interés, realizar la purificación correspondiente en agar TS 3%, inocular las pruebas bioquímicas según el caso, incubar a 37 °C en aerobiosis durante 12-18 horas.4.-Realizar la prueba de oxidasa de las colonias purificadas y ubicar la bacteria según el resultado obtenido.5.Realizar la lectura de las pruebas bioquímicas montadas en el período anterior e identificar la(s) bacteria(s) presente(s), utilizando las tablas y esquemas.6.Realizar las pruebas serológicas en caso necesario.7.Realizar el antibiograma si el caso lo amerita, de lo contrario realizar el reporte |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** |
|  |
| **OBSERVACIONES** |
|  |
| **CONCLUSIONES** |
| 1.-Los estudiantes aplicaron los conocimientos sobre técnicas de toma de muestra y procesamiento adecuado para el diagnóstico de infecciones del tracto gastrointestinal2.- Los estudiantes aplicaron las condiciones adecuadas para la toma y transporte de la muestra de heces.2.- Los estudiantes Aislaron los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA.3.- Los estudiantes identificar los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA. 4.- Los estudiantes determinar la susceptibilidad antimicrobiana del (los) microorganismo(s) aislado(s). |
| **RECOMENDACIONES** |
| Aplicar las medidas de bioseguridad en el laboratorio uso de guates, tapabocas, mandil , pelo recogido |
| **BIBLIOGRAFÍA** |
| Microbiologia en Práctica de Jawets, Melnick y Adelberg E. Alche Editorial Atlante s.r.lMicrobiologia Fuerst Nueva Editorial Interamericana |
| **XIMENA ROBALINO****DIRECTORA DE CARRERA** |  **ANA CAROLINA GONZÁLEZ** **DOCENTE** |  |