



FICHA DE TRABAJO	
MÓDULO	MICROBIOLOXÍA CLÍNICA
UNIDADE DIDÁCTICA	UD5 e UD6
PRÁCTICA: 11	Identificación fenotípica e antibiograma

PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO

OBXETIVOS

- Obxetivos xerais:
 - Identificar a partir de características fenotípicas as bacterias presentes na mostra.
 - Realizar os estudos de sensibilidade a antimicrobianos.

- Obxetivos específicos:
 - Describir a morfoloxía microscópica das bacterias presentes na mostra.
 - Utilizar diferentes tipos de medios de cultivo no procesamento dunha mesma mostra, para facer unha aproximación á identificación.
 - Facer sementeira en céspede, para un posterior estudo de sensibilidade a antimicrobianos.
 - Describir a morfoloxía macroscópica das colonias tras o periodo de incubación.
 - Utilizar claves dicotómicas para facer unha identificación presuntiva da bacteria presente na mostra.
 - Utilizar galerías multiproba para unha caracterización bioquímica do xénero ou especie problema.

MATERIAIS

- Placas de cultivo TSA, MacConkey e Müller Hinton (preparadas con anterioridade e conservadas en refrixeración)
- Mostra biolóxica: feces (tamén se pode utilizar ouriña, pero sempre tendo en conta a mostra de partida para a posterior interpretación dos resultados).
- Soro fisiolóxico estéril ou auga destilada estéril.
- Gradilla e tubos con tapón de rosca estériles.
- Vórtex.
- Chisqueiro de alcohol.
- Asas de sementar.
- Hisopo estéril.
- Estándar de McFarland 0.5.
- Discos de antibiótico e tiras ETest.
- Materiais necesarios para tinción de Gram: Kit de reactivos de tinción de Gram, cristalizador, ponte tinción, portas, auga destilada para lavados.
- Galería multiproba Enterosystem 18R (para enterobacterias).
- Micropitepa de 200 µL.
- Microscopio de contraste de fases.

MÉTODO

Esta práctica va a ser llevada a cabo en varias clases sucesivas.

Día 1: Cultivo da mostra problema.

Sementaremos por esgotamento en zig-zag a tres campos, en agar TSA e en agar MacConkey. Para realizar este paso:

1. Limpar e desinfectar a zona de traballo. Colocar un papel de filtro e dispor todos os materiais necesarios para desenvolver o procedemento.
2. Realizar dilución da mostra en soro fisiolóxico ou auga destilada estéril.
3. Cargar a asa e sementamos por esgotamento a tres campos, na placa TSA e na placa de agar MacConkey, segundo a técnica descrita no protocolo da práctica nº 7, sempre mantendo as condicións de asepsia.
4. Levar a incubar a 37 °C en condicións de aerobiose.
5. Partindo da dilución feita da mostra, cargamos a asa e facemos un frotis para a súa observación en fresco.
6. Observar o fresco en contraste de fases, tomar fotos e anotar o que se observa.
7. Realizar unha tinción de Gram da mostra, facendo o frotis a partir da dilución da mostra. Seguir o protocolo da tinción de Gram descrito no protocolo da práctica nº1 (Frotis da mostra → fixar con calor → tinguir con cristal violeta durante 1 minuto → retirar cristal violeta e aplicar lugol durante 1 minuto → retirar lugol e lavar con auga destilada → cubrir con alcol-acetona durante 20-30 segundos → lavar e retirar ben os restos de colorante → aplicar safranina durante 2 minutos → lavar con auga destilada e deixar secar).
8. Levar a mostra tinguida ó microscopio óptico a 100 X e anotar o que se observa.

Día 2: Probas bioquímicas e antibiograma

1. Limpar e desinfectar a zona de traballo. Colocar un papel de filtro e dispor todos os materiais necesarios para desenvolver o procedemento.
2. Anotar as características das colonias que medraron en TSA e en MacConkey.

Probas bioquímicas:

3. Coller unha colonia illada da placa de agar MacConkey.
4. Descargar a asa en soro fisiolóxico estéril e ir diluindo ata conseguir unha turbidez equivalente ó estándar 0.5 de McFarland.
5. Dispor a galería multiproba Enterosystem 18R no entorno aséptico do chisqueiro.
6. Dispensar 200 µL da suspensión bacteriana en cada celdiña da galería multiproba, descartando a punta de cada vez (axitar cada vez que se tome a mostra).
7. Cubrir as celdiñas: nº2 LDC; nº3 ODC; nº4 ADC; nº7 UR e nº8 H2S, cunha gota de vaselina líquida.
8. Incubar a 37 °C durante 24 horas.

Antibiograma

9. Sementar en céspede non hisopo estéril sobre a placa de Müller Hinton, a partir da suspensión bacteriana de turbidez 0.5 McFarland. Facer dúas placas: unha para estudo de difusión en disco e outra para estudo de CMI co sistema ETest.

Precaucións:

- **Unha vez preparada a suspensión bacteriana, facer a sementeira nos 15 minutos seguintes, ou como moito antes de 60 minutos.**
- **As placas deben ter a superficie do agar seca, e a tapa seca, sen condensación, para evitar arrastres do antibiótico e interferencias no procedemento.**

- Colocar de forma aséptica os discos de antibiótico presionando lixeiramente sobre o agar, para que o disco se humedezca e difunda o antibiótico. O disco debe collerse cunha pinza estéril. Colocaremos tres antibióticos diferentes (ampicilina, eritromicina e fosfomicina) suficientemente separados, para que non se solapen os halos de inhibición, en caso de que se presenten. **A colocación dos discos de antibiótico ou tiras de ETest debe facerse nos 15 minutos despois da sementeira, non esperar máis.**
- De forma similar a como colocamos os discos, colocaremos agora a tira de Etest sobre a outra placa de Müller Hinton sementada, tendo coidado de que a parte impregnada co antibiótico estea hacia abaixo, en contacto co agar.
- Levaremos a incubar a 37°C durante 24 horas, **tamén antes de que pasen máis de 15 minutos desde a colocación dos discos ou tiras de ETest.**

RESULTADOS

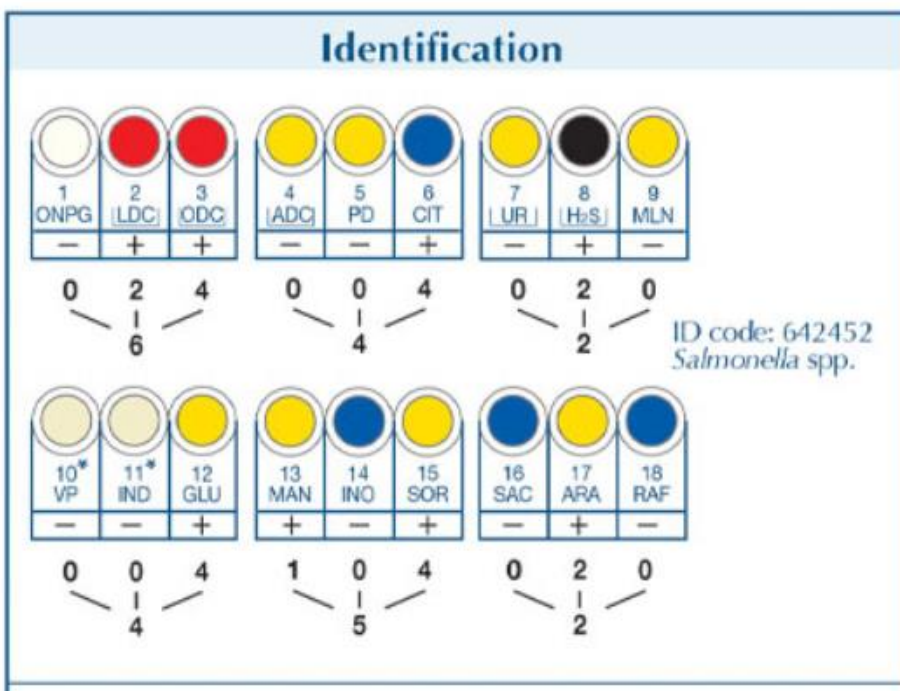
Documenta con fotos os pasos que fuches realizando e os resultados obtidos.

Día 3: lectura da galería multiproba e lectura do antibiograma

- Limpar e desinfectar a zona de traballo. Colocar un papel de filtro e dispor todos os materiais necesarios para desenvolver o procedemento.

Lectura Galería multiproba

- Despois da incubación, engadir **o reactivo VP na celdiña nº10 VP**, e **o reactivo de Kovac's na celdiña nº11 IND**.
- Lectura da galería multiproba Enterosystem 18R: colocaremos un signo – ou un signo + debaixo de cada proba, segundo o resultado sexa negativo ou positivo respectivamente. A lectura faise de 3 en 3 celdiñas. O valor que lle corresponde as celdiñas con resultado negativo é 0, mentes que a segunda celdiña se é positiva asignaráselle un valor de 2, e á terceira celdiña se é positiva asignaráselle un valor de 4. Súmase o resultado para cada tres celdiñas obténdose así os díxitos que van formar o código do m.o problema.
Exemplo:



Táboa de interpretación de resultados das probas incluídas no test Enterosystem 18R

TABELLA DELLE REAZIONI / REACTIONS TABLE

REACTIONS	GROUP 1			GROUP 2			GROUP 3			GROUP 4			GROUP 5			GROUP 6		
	1-ONPG	2-LDC	3-ODC	4-ADC	5-PD	6-CIT	7-UR	8-H ₂ S	9-MLN	10-VP	11-IND	12-GLU	13-MAN	14-INO	15-SOR	16-SAC	17-ARA	18-RAF
POSITIVE TEST	Yellow	Red	Red	Red	Brown	Blue	Pink	Black	Green	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
NEGATIVE TEST	White	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

4. Para coñecer o m.o problema a partir do código dirixete a esta URL: http://www.liofilchem.net/software/code_disk/code.php, unha vez aquí podes introducir o código numérico obtido ou ben ir cubrindo o resultado (como – ou +) en cada proba.

Lectura antibiograma

5. Observa se hai presenza de halos de inhibición.
6. No caso da difusión en disco, anota para qué antibióticos hai halos de inhibición e para cáles non. Os que presenten halos de inhibición, anota o diámetro do halo.
7. No caso dos estudos co sistema ETest, anota a CMI para cada tira, especificando sempre o/s antibiótico/s que porta esa tira.

Podedes consultar puntos de corte en:

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_14.0/Breakpoint_Tables.pdf

CUESTIÓNS

1. Tendo en conta a mostra utilizada, qué esperas que medre no medio TSA? e no MacConkey?
2. Por qué utilizamos unha suspensión microbiana de turbidez 0.5 McFarland, para facer a inoculación da galería de probas bioquímicas e para facer o antibiograma?
3. Poderíamos utilizar a mesma galería multiproba Enterosystem 18R para unha sospeita de infección por *Staphylococcus* spp.? Xustifica a túa resposta.
4. Qué concentración de antibiótico tiñan os discos utilizados no antibiograma?
5. Por qué non debemos esperar máis de 15 minutos despois de facer a sementeira en céspede para o antibiograma, para colocar os discos de antibiótico?
6. Tendo en conta o diámetro dos halos de inhibición obtidos no antibiograma, dirías que o m.o en estudo é sensible ou resistente a ese antibiótico?.