



Técnico Superior
en Laboratorio de
Diagnóstico Clínico
y Biomédico

Microbiología clínica

Coordinador
Julián Sanz Ortega

ARÁN

Autores

Director

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1996. Desde el año 2000 es Director Científico del Biobanco del Hospital Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012. Autor de 66 artículos científicos: publicaciones internacionales en revistas indexadas y nacionales.

Premio Extraordinario de la Universidad Complutense de Madrid y Premio de la Fundación San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina en 1994.

Coordinador

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área. Hospital Universitario Clínico San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Director Científico del Biobanco del Hospital Universitario Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012.

Autores

Pilar Barbero del Palacio

Técnico del Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Cristina García Salguero

Residente en Microbiología y Parasitología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Ana Merino Marina

Enfermera S.U.F. Microbiología e Inmunología. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

María Palomo Lastra

Facultativo Especialista en Microbiología y Parasitología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Irene Pena Viña

Facultativo Especialista en Microbiología y Parasitología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Marina Peñuelas Martínez

Residente en Microbiología y Parasitología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Paz Uribe Llopis

Enfermera y Técnico Superior de Prevención de Riesgos Laborales. Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Belén Saavedra Cervera

Residente en Microbiología y Parasitología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área. Hospital Universitario Clínico San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid

Avelina Suárez Moya

Facultativo Especialista de Área en Microbiología y Parasitología. Jefe de Sección. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Índice

Capítulo 1

Aplicación de procedimientos de prevención de riesgos laborales y protección ambiental	13
1. Niveles de seguridad y medidas de contención.....	14
2. Identificación de los riesgos asociados a las técnicas realizadas en el laboratorio de microbiología clínica	17
3. Gestión de la eliminación de residuos	19

Capítulo 2

Aplicación de técnicas de tinción y observación de microorganismos	27
1. Microorganismos: concepto, tipos y taxonomía	28
2. Bacterias: morfología y agrupación. Estructura bacteriana	30
3. Técnicas de observación microscópica de los microorganismos.....	33

Capítulo 3

Preparación de medios para el cultivo de microorganismos	57
1. Componentes de un medio de cultivo	58
2. Tipos de medios: generales, diferenciales, selectivos y enriquecidos, entre otros.....	60
3. Preparación de medios de cultivo: líquidos, sólidos y semisólidos en tubo (agar inclinado). Medios en placa.....	64
4. Medios de cultivo utilizados habitualmente en un laboratorio de microbiología...	66

Capítulo 4

Aplicación de técnicas de aislamiento y de recuento de microorganismos...	89
1. Técnicas de siembra: en medio líquido, en medio sólido o semisólido	90
2. Técnicas de inoculación	91
3. Técnicas de aislamiento: estría simple, estría múltiple. Cuatro cuadrantes....	94
4. Incubación: aeróbica y anaeróbica	98
5. Crecimiento bacteriano	101
6. Descripción macroscópica de los cultivos	103
7. Técnicas de determinación del crecimiento.....	104

Capítulo 5

Aplicación de técnicas de identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana	111
1. Pruebas de identificación bioquímica. Pruebas rápidas: catalasa y oxidasa. Pruebas individuales. Sistemas multiprueba.....	112
2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Antibióticos. Tipos de antibiograma. Resistencia antimicrobiana	118
3. Inmunología y diagnóstico microbiológico	120
4. Biología molecular y diagnóstico microbiológico	121
5. Protocolo de aislamiento e identificación de cocos grampositivos. Géneros: <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i>	122
6. Protocolo de aislamiento e identificación de cocos gramnegativos. Género <i>Neisseria</i>	126
7. Protocolo de aislamiento e identificación de bacilos grampositivos aerobios..	127
8. Protocolo de aislamiento e identificación de bacilos gramnegativos.....	129
9. Otras bacterias de importancia clínica: bacterias anaerobias. Micobacterias. Rickettsias, clamidias y micoplasmas	136
10. Antibióticos. Resistencia y sensibilidad. Antibiogramas.....	144

Capítulo 6

Aplicación de técnicas de identificación de hongos y parásitos	153
1. Aislamiento e identificación de mohos y levaduras	154
2. Técnicas de identificación de parásitos.....	165

Capítulo 7

Identificación de virus	185
1. Características diferenciales de los virus	186
2. Clasificación vírica y patología asociada.....	190
3. Diagnóstico por el laboratorio de las infecciones víricas	200

Evalúate tú mismo	213
--------------------------------	-----

A detailed illustration of a compound light microscope, shown in a semi-transparent style. The microscope is oriented vertically, with the eyepieces at the top and the base at the bottom. The objective lenses and eyepieces are dark grey, while the body tube and base are a lighter grey. The stage is a dark brown color. The entire illustration is overlaid with a semi-transparent white rectangular box that contains the chapter information.

capítulo

2

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE TINCIÓN Y OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

María Palomo Lastra

Sumario

1. Microorganismos: concepto, tipos y taxonomía
2. Bacterias: morfología y agrupación. Estructura bacteriana
3. Técnicas de observación microscópica de los microorganismos

La **microbiología** es la ciencia que estudia los **organismos microscópicos**. Algunos de ellos son perjudiciales para el ser humano (microorganismos patógenos), de cuyo estudio se encarga la microbiología clínica en sus distintas ramas: virología, bacteriología, micología y parasitología.

La **identificación del microorganismo etiológico** es fundamental para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas.

La **observación con el microscopio**, en sus distintas variantes, aunque no permite una identificación definitiva en la mayoría de los casos, aporta una información fundamental para el manejo de múltiples procesos infecciosos.

En este capítulo se pretende explicar los **conocimientos básicos** para el estudio de los microorganismos mediante el uso de técnicas microscópicas.

I. MICROORGANISMOS: CONCEPTO, TIPOS Y TAXONOMÍA

Los **microorganismos** constituyen un grupo de seres vivos sumamente heterogéneo que, debido a su tamaño, pasan inadvertidos al ojo humano, siendo preciso el uso de dispositivos de aumento como el microscopio óptico o, en algunos casos, el microscopio electrónico para poder observarlos. Se incluyen además algunos hongos o parásitos a pesar de no ser microscópicos.

Dada la gran diversidad de los microorganismos es necesaria su sistematización. La **taxonomía** es la ciencia encargada de la **clasificación, nomenclatura e identificación** de estos en particular y de los seres vivos en general. Los ordena en **grupos taxonómicos** o **taxones** en función de semejanzas mutuas (fenotípicas, estructurales o genéticas, o del grado evolutivo), asignando a cada grupo un nombre que lo defina de conformidad con las normas publicadas, y permitiendo la identificación de un organismo al establecer su pertenencia a un determinado grupo reconocido.

Los nuevos avances científicos hacen de esta una ciencia dinámica con cambios continuos en las clasificaciones. Así, con la incorporación de las técnicas de secuenciación y estudio comparativo del ARN ribosómico 16S, se ha establecido el sistema de clasificación actual propuesto por Woese en 1990, que diferencia **tres dominios** en los que estarían incluidos todos los organismos a excepción de los virus por ser subcelulares (Figura 1).

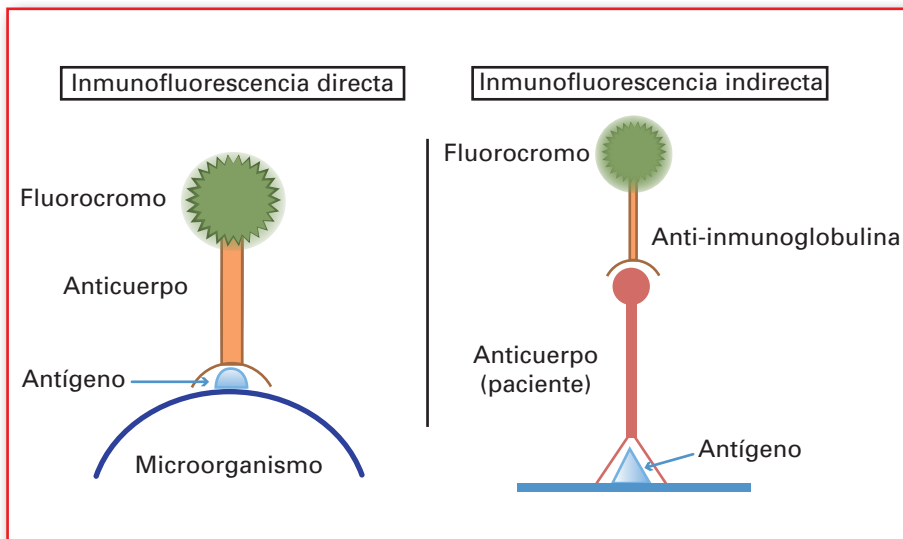


Figura 8. *Inmunofluorescencia directa e inmunofluorescencia indirecta.*

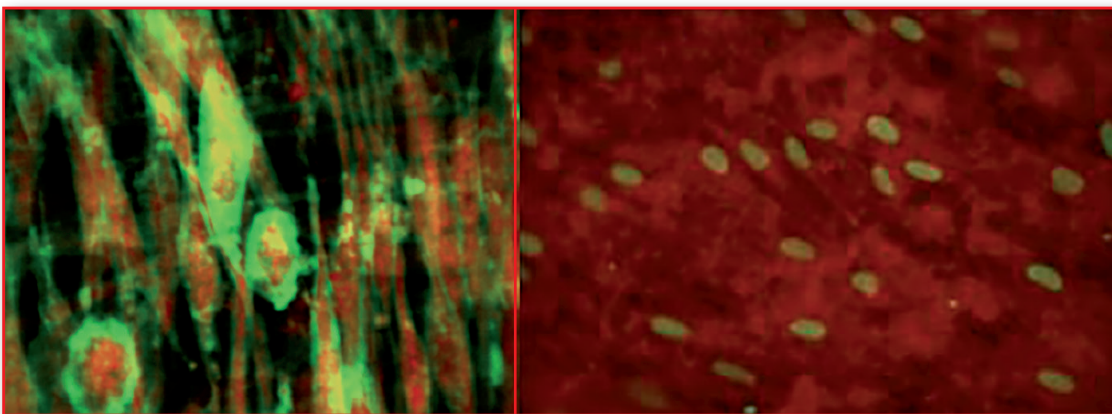


Figura 9. *Imagen de inmunofluorescencia, procedente de cultivos virales: virus herpes simple 1 (izda.) y citomegalovirus (dcha.).*

En la **microscopía electrónica**, en vez de luz se utiliza un haz de electrones con una longitud de onda mucho menor que los fotones, lo que le confiere mucho mayor **poder de resolución**. Gracias a ello se ha podido conocer el tamaño, la estructura y morfología de virus y las diferentes estructuras que componen la célula bacteriana, hongos y parásitos.

Los **electrones** son producidos por un filamento de tungsteno y son dirigidos hacia la muestra gracias a unas espirales. Aquellos que logren atravesarla serán amplificados y recogidos por una pantalla fluorescente donde reflejarán una **imagen aumentada hasta un millón de veces**, en blanco y negro, que luego puede ser coloreada por sistemas informáticos. Todo ello se realiza bajo un alto **grado de vacío**.

**RECUERDA QUE**

A la hora de realizar cualquier observación microscópica hay que tener en cuenta que puede haber artefactos que pueden asemejarse a los microorganismos y ser confundidos con estos.

4. Con el porta así invertido, presionar sobre el cubre hasta que se adhiera.
5. Invertir nuevamente con un movimiento rápido. La gota quedará pendiendo sobre la excavación del portaobjetos.
6. Observar con el objetivo de inmersión y el condensador bajo.

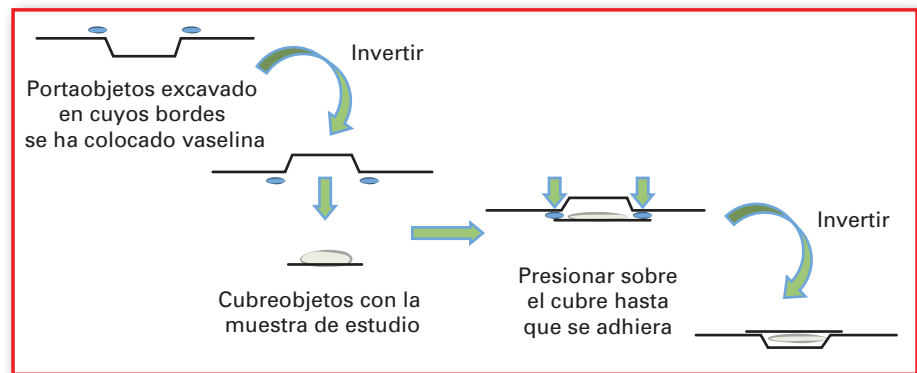


Figura 12. Preparación de la gota pendiente.

3.2. Preparación del frotis bacteriano. Muestra líquida. Muestra sólida

Para facilitar la visualización de las características morfológicas de los microorganismos se emplean diferentes **tinciones**. Aunque existen multitud de técnicas, en la mayoría de los casos es preciso la **extensión y fijación del material** de estudio para poder ser teñido.

La **preparación del frotis** dependerá de si se parte de muestras líquidas o sólidas, y se realizará igualmente de productos clínicos como de cultivos. Para ello se siguen los siguientes pasos (Figura 13):

1. **Preparación de la extensión.** Consiste en aplicar la muestra en el portaobjetos formando una capa fina y homogénea, ya que si fuera demasiado gruesa dificultaría la visualización al microscopio. La técnica depende de la muestra que se va a examinar:
 - ▶ Cuando se trata de **muestras líquidas**: depositar una gota del mismo en el centro del portaobjetos y extender con un asa de siembra.
 - ▶ Cuando se trata de una **biopsia o tejido**: homogenizar en solución salina estéril y extender una gota del producto obtenido sobre el portaobjetos con la ayuda de un asa.
 - ▶ Si se trata de una colonia aislada en un **medio de cultivo sólido**: colocar una gota de agua destilada o suero salino fisiológico en

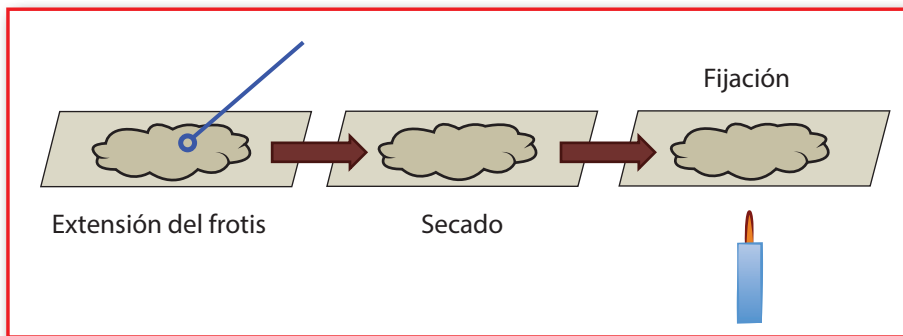


Figura 13. Preparación del frotis.

la que se suspende una pequeña cantidad del cultivo. Extender cuidadosamente de manera homogénea y uniforme.

- ▶ Cuando se trata de un **exudado**: se puede aplicar directamente con la torunda sobre el portaobjetos con un movimiento de rotación mientras se va extendiendo.

2. Deseccación. El secado se realiza a temperatura ambiente.

3. Fijación. Tiene por objeto la inmovilización de los microorganismos al portaobjetos para que no sean arrastrados en los distintos procesos de lavado, permitiendo que mantengan el estado más similar al vivo. Este proceso se puede realizar mediante:

- ▶ **Calor:** es el empleado habitualmente. Se calienta levemente la parte inferior del portaobjetos al pasar varias veces la extensión por la llama.

La extensión debe estar totalmente seca antes de fijarla con calor, ya que de no ser así se podrían producir alteraciones en las estructuras de los microorganismos, lo que dificultaría su interpretación. Posteriormente, debe dejarse enfriar antes de proceder a la tinción para evitar precipitaciones del colorante.

- ▶ **Fijadores químicos:** se cubre la preparación con alcohol etílico o metílico y se deja que actúe durante 2 o 3 minutos, se escurre y se deja secar a temperatura ambiente.

3.3. Técnicas de tinción y tipos. Negativa. Simple. Tinción de Gram. Ziehl-Neelsen. Cápsulas. Esporas

Las técnicas tintoriales se basan en el empleo de colorantes para dar color a los microorganismos y/o al resto de elementos de la preparación. Existe una gran variedad de tinciones de aplicación en microbiología que se pueden agrupar en: **tinciones simples, diferenciales y estructurales.**



Todas las preparaciones deben estar correctamente identificadas. Resultados incongruentes pueden ser debidos a una identificación errónea.

La tinción se puede realizar de muestras de las lesiones cutáneas **sospechosas de micosis o de cultivo**, obteniéndose mediante la aplicación de una cinta adhesiva transparente. Esta cinta se adhiere a un portaobjetos en el que previamente se habrá puesto una gota del colorante, agregándose una nueva gota sobre ella antes de cubrir la preparación con el cubreobjetos. Se visualiza con objetivo seco 10X y 40X (Figura 15).

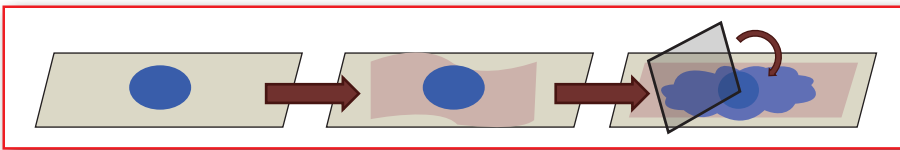


Figura 15. Técnica de la tinción con azul de lactofenol.

La **tinción con lugol** es muy útil para el diagnóstico de algunas parasitosis intestinales a partir de muestras de heces que se suspenden con esta solución yodada (Figura 16).

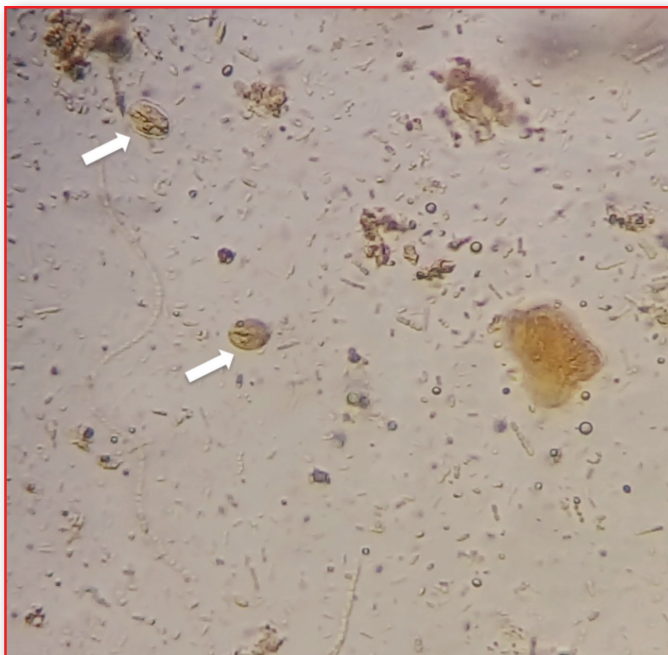


Figura 16. Imagen de tinción con lugol. Se pueden observar quistes de *Giardia spp.*

3.3.2. Tinciones diferenciales

Emplean **más de un colorante en pasos sucesivos**, lo que hace que los microorganismos se puedan diferenciar, no solo por su morfología, sino por también por su afinidad con los diferentes colorantes utilizados.

La **tinción de Gram** es la tinción diferencial más utilizada en microbiología. El fundamento de la tinción está basado en las diferentes características de la pared celular bacteriana. En función de ello, las bacterias se clasifican en: **grampositivas** y **gramnegativas**.

El componente principal de la pared celular en ambos grupos de bacterias es el **peptidoglicano**. Las bacterias grampositivas tienen una pared gruesa muy rica en este elemento. En las gramnegativas es más compleja, con tres zonas diferenciadas: una capa externa, una capa intermedia y una capa profunda en la que se encuentra el peptidoglicano aunque en una menor proporción y con una composición ligeramente diferente (Figura 17).

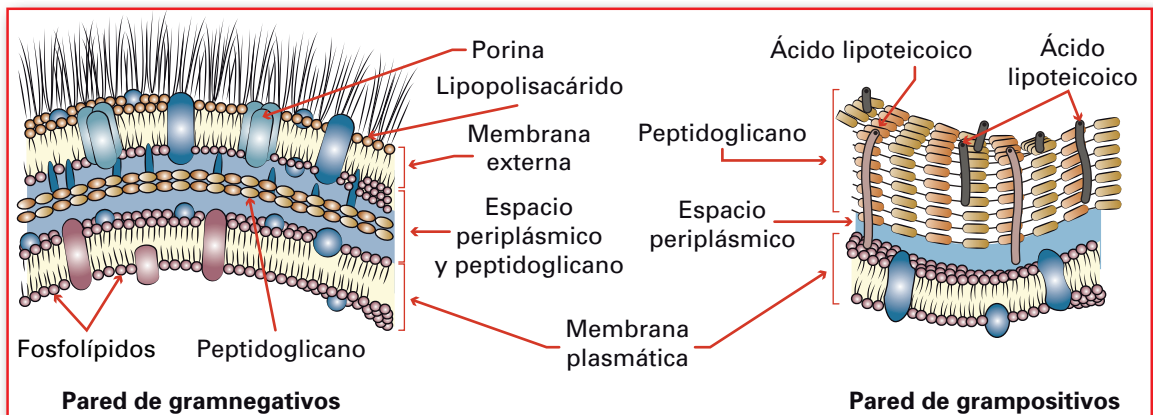


Figura 17. Diferencias en la pared celular de bacterias gramnegativas y grampositivas.

Estas diferencias determinan las **características tintoriales**: las bacterias grampositivas retienen el colorante inicial a pesar de la decoloración, por lo que se observan de un color azul-violeta; mientras que las gramnegativas se decoloran y se tiñen con el colorante de contraste de color rosa.

La **tinción** consta de los siguientes pasos (Figura 18):

1. Cubrir con cristal violeta (con afinidad por el peptidoglicano) durante 1-2 minutos.
2. Lavar ligeramente con agua para eliminar el exceso de colorante o simplemente volcar el portaobjetos y escurrir el colorante.
3. Cubrir con lugol que actúa como mordiente e impide la salida del colorante (1-2 minutos).
4. Escurrir la solución de lugol y lavar con agua.

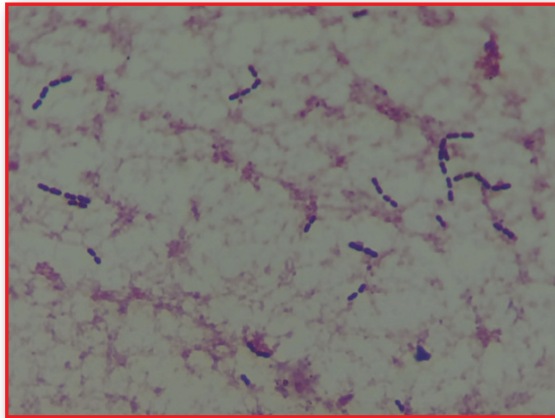


Figura 20. Imagen de cocos grampositivos con disposición en cadenas.

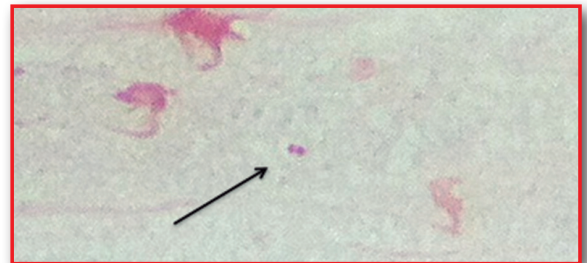


Figura 21. Imagen de diplococos gramnegativos.

- › **Bacilos grampositivos** (Figura 22), como *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp., *Clostridium* spp., *Propionibacterium* spp., etc.
- › **Bacilos gramnegativos** (Figura 23), como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Vibrio* spp., *Haemophilus* spp., *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp., etc.

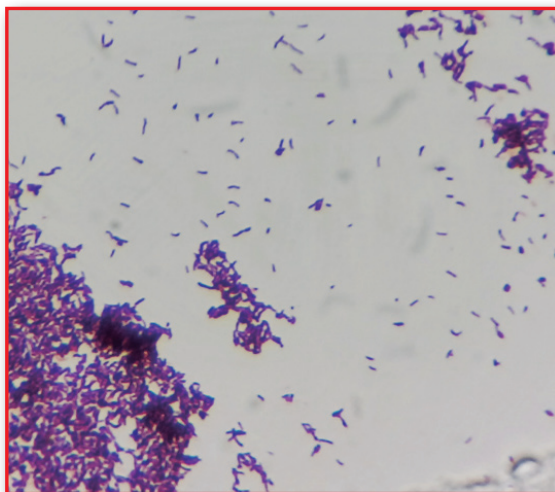


Figura 22. Imagen de bacilos grampositivos.

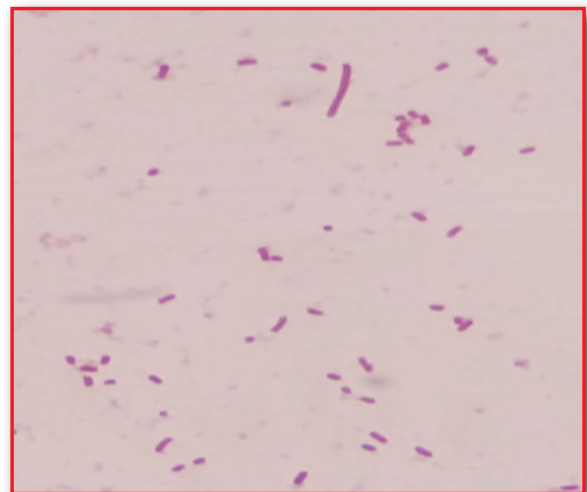


Figura 23. Imagen de bacilos gramnegativos.

Aunque esto no permite una identificación definitiva, orienta el **diagnóstico etiológico**, en ocasiones con mucha certeza, como en la uretritis gonocócica aguda masculina o en la meningitis por meningococo o neumococo.

6. Lavar nuevamente con agua y dejar secar en posición inclinada.
7. Observar al microscopio con **objetivo de inmersión** (100X) y con el **condensador alto**.

La extensión se debe revisar de manera sistemática, al menos **3 líneas**: empezar por el extremo superior izquierdo, avanzar lateralmente hasta el borde superior derecho; mover el frotis unos milímetros hacia abajo y hacer un recorrido paralelo al anterior en sentido inverso; cuando se llega de nuevo al extremo izquierdo se desplaza nuevamente unos milímetros en sentido descendente y se repite el recorrido hasta completar la tercera línea. Se puede proseguir así, hasta examinar toda la extensión.

Los BAAR se ven de color fucsia y las demás estructuras y microorganismos de color azul (Figura 25). De observarse, se debe hacer un **recuento** de su número e informar del mismo.



RECUERDA QUE

Cuando hay una alta sospecha, el hecho de no observar el microorganismo en el examen microscópico no es suficiente para poder descartarlo. La mayoría de las veces se debe a la baja concentración presente en la muestra. En estos casos, los métodos de cultivo o el empleo de técnicas de concentración, aumentarían la sensibilidad.

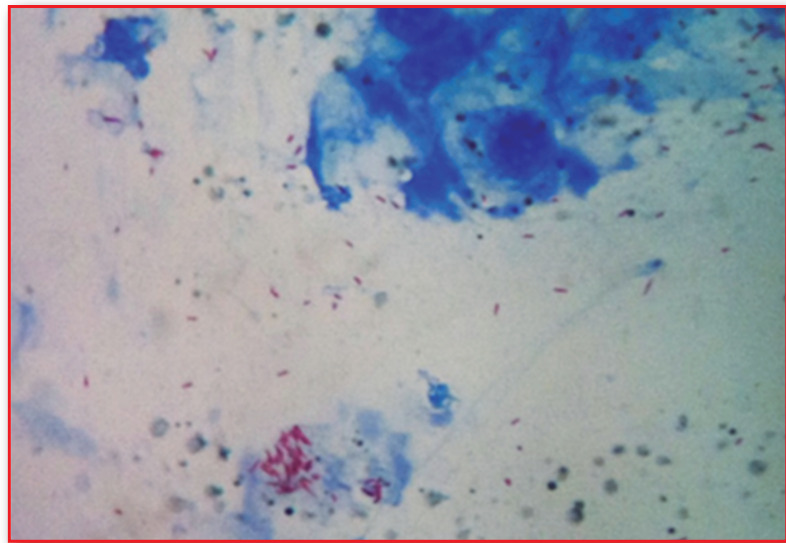


Figura 25. Imagen de BAAR con la tinción de Ziehl-Neelsen.

La positividad de la tinción apoya la sospecha clínica, aunque son precisas otras técnicas para la **identificación en género y especie**. Mientras que una tinción negativa no permitiría excluir la infección.

Otras bacterias con ácidos micólicos en su pared son *Nocardia* spp., *Gordonia* spp., *Tsukamurella* spp. o *Rhodococcus* spp., aunque decoloran parcialmente (**ácido-alcohol resistentes débiles**).

En parasitología se emplea la tinción de ácido alcohol resistencia de **Kinyoun** para determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*

RESUMEN

- ✓ En este capítulo hemos aprendido **qué son los microorganismos** y, más específicamente, hemos estudiado las **bacterias**, sus elementos obligados y facultativos, y su **clasificación** desde el punto de vista morfológico.
- ✓ Hemos visto que los microorganismos pueden ser observados con **diferentes técnicas de microscopia**, lo que nos permite realizar una aproximación al diagnóstico de las enfermedades infecciosas.
- ✓ Nos hemos familiarizado con los **elementos básicos del microscopio**, sus variantes y sus aplicaciones en la microbiología clínica.
- ✓ Hemos revisado las **diferentes técnicas para la observación microscópica**: preparaciones en fresco y diversos métodos de tinción, analizando las peculiaridades de cada una de ellas.

G L O S A R I O

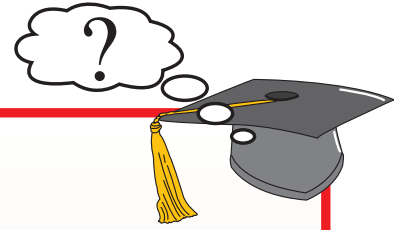
Ácido-alcohol resistencia: propiedad de algunas bacterias y parásitos de no decolorar ante el ácido-alcohol debido al alto contenido en ácidos micólicos de su pared.

Anticuerpos: proteínas producidas por el sistema inmunitario que reconocen y se unen a los antígenos de los microorganismos de manera específica para neutralizarlos. Estos anticuerpos pueden ser sintetizados y modificados para ser utilizados en medicina con aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Antígenos: elementos específicos de cada microorganismo capaces de producir una respuesta del sistema inmune.

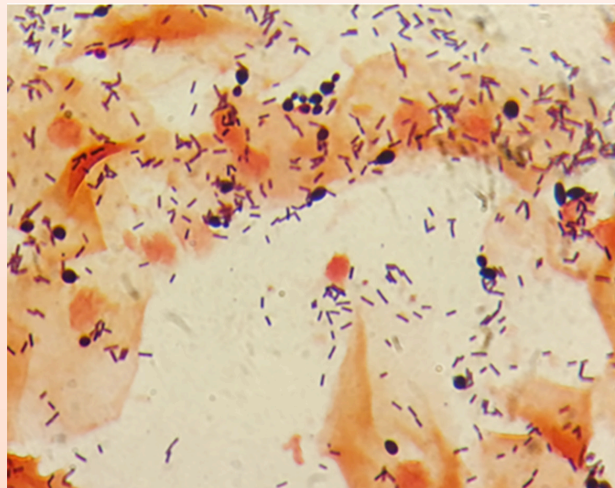
Autofluorescencia: propiedad de algunos microorganismos de generar luz fluorescente por sí mismos.

Colorante: sustancia capaz de dar color a los microorganismos y/o al resto de elementos de la preparación (células, tejidos, fibras...).



EJERCICIOS

- › E1. Busca en Internet una imagen de tinción negativa de *Cryptococcus neoformans*. ¿Puedes observar su cápsula? ¿Y las estructuras internas? ¿A qué crees que se debe?
- › E2. En un paciente con lesiones cutáneas compatibles con pitiriasis versicolor, cuyo agente etiológico es un hongo: ¿Qué técnica ayudaría al diagnóstico? ¿Podrías explicar cómo realizarías la toma de muestra? ¿Y cómo realizarías la tinción?
- › E3. La siguiente imagen se corresponde a una tinción de Gram de un exudado vaginal de una mujer joven. ¿Qué tipos de microorganismos están presentes?



- › E4. A un varón joven con úlcera en pene sugerente de chancro sifilítico, se le toma una muestra y se observa con el microscopio de campo oscuro. ¿Qué esperarías encontrar? ¿Podrías observar las estructuras internas? ¿Por qué?
- › E5. En un paciente inmunodeprimido con sospecha clínica de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. ¿Qué técnica crees que ayudaría al diagnóstico? ¿Podrías explicar por qué crees que es la apropiada?



EVALÚATE TÚ MISMO

1. Señala la respuesta incorrecta:

- a) Los microorganismos pasan inadvertidos al ojo humano debido a su pequeño tamaño.
- b) No todos los microorganismos son patógenos para el hombre.
- c) Algunas infecciones pueden pasar desapercibidas por no presentar apenas clínica.
- d) Solo los virus y las bacterias son considerados microorganismos.

2. ¿Cuál de los siguientes no es un elemento obligado de las bacterias?:

- a) Cápsula.
- b) Pared celular.
- c) Membrana citoplasmática.
- d) Citoplasma.

3. En cuanto a las técnicas de microscopia, señala cuál de las siguientes afirmaciones es falsa:

- a) Permiten la detección de microorganismos.
- b) Permiten el examen de muestras en fresco.
- c) Con algunas técnicas se puede ver la movilidad de los microorganismos.
- d) Gracias a estas técnicas podemos identificar los microorganismos de manera definitiva en todos los casos.

4. ¿Cuál de los siguientes no se considera una parte óptica del microscopio?:

- a) Tornillo macrométrico.
- b) Oculares.
- c) Objetivos.
- d) Condensador.

5. ¿En cuál de las siguientes técnicas microscópicas se emplean haces de electrones?:

- a) Microscopia de contraste de fases.
- b) Microscopia de campo brillante.
- c) Microscopia de campo oscuro.
- d) Ninguna de las respuestas anteriores es correcta.

6. Respecto al examen en fresco:

- a) Se realiza únicamente sobre muestras clínicas.
- b) Se visualiza con el microscopio electrónico.
- c) Permite determinar las características de las cápsulas.
- d) Ninguna de las respuestas anteriores es correcta.

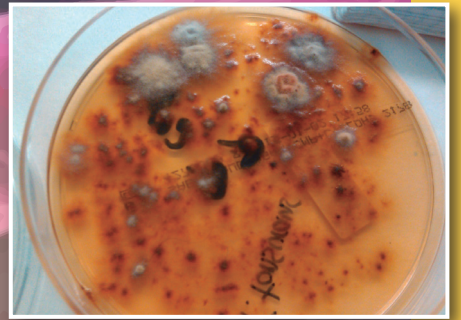
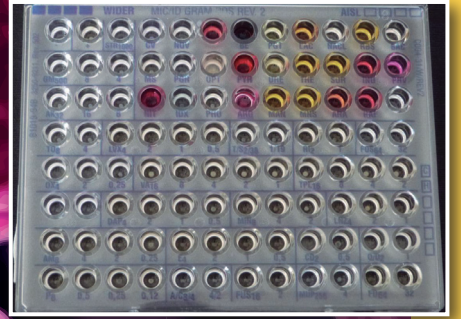


SOLUCIONES

EVALÚATE TÚ MISMO



http://www.aranformacion.es/_soluciones/index.asp?ID=19



Avalado por:



Sociedad Española de
Hematología y Hemoterapia

ISBN 978-84-16585-21-2



9 788416 585212