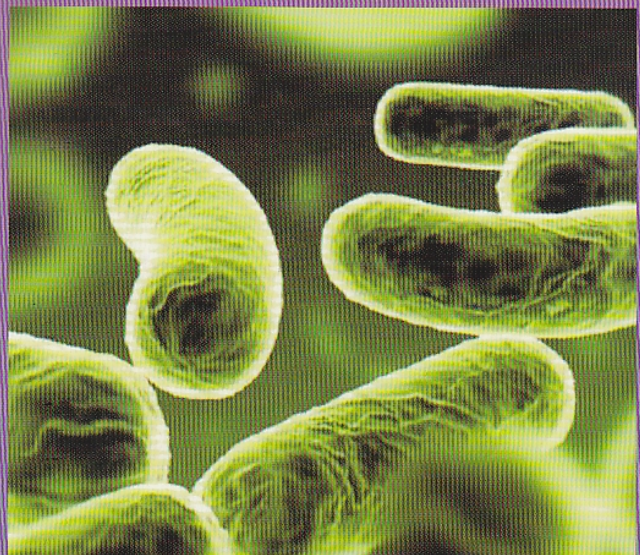
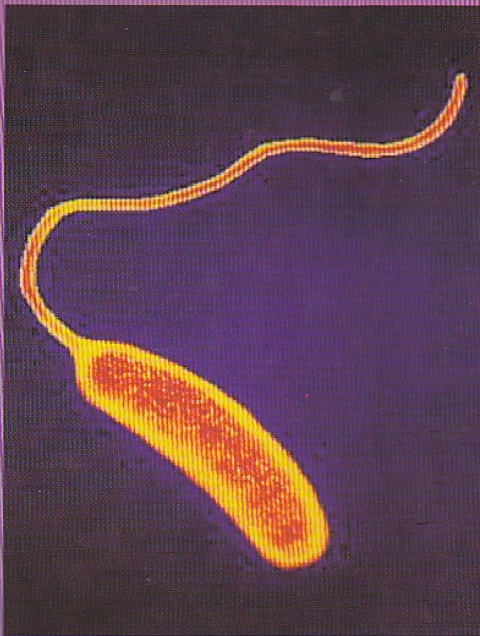


MANUAL

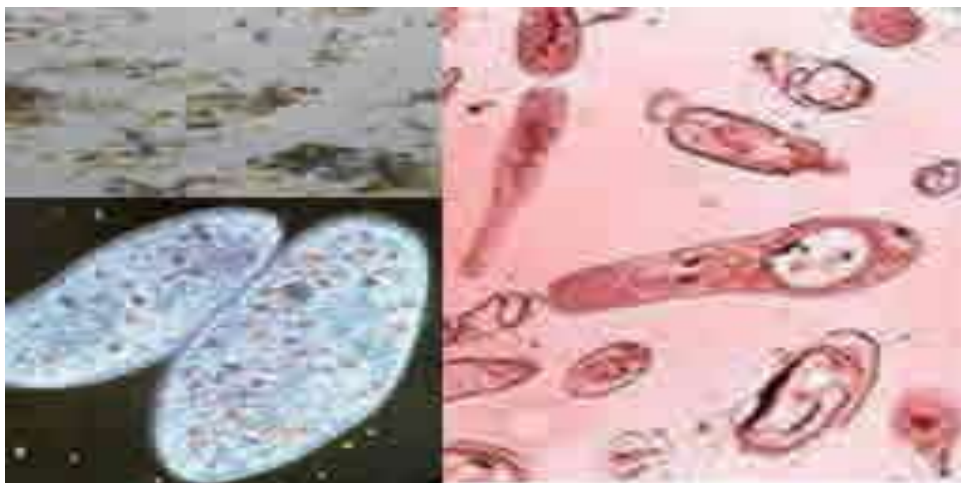
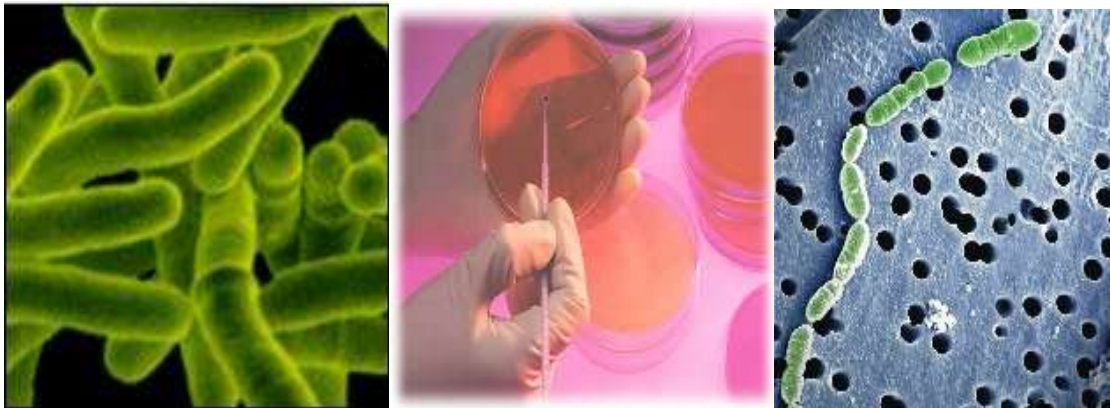
MICROBIOLOGÍA MÉDICA



Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN



CHACHAPOYAS - PERÚ

Derechos de autor reservados:

Dra. Flor Teresa García Huamán

- Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2011 - 04516
- Derechos de edición reservados:
COMPUGRAPH SRL
Jr. Amazonas N°824 – Chachapoyas

2011, Abril.
Chachapoyas, Perú

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra sin previa autorización escrita de la autora.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	4
HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA	6
BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	14
MICROSCOPIA	19
ANATOMÍA BACTERIANA	27
EXAMEN DIRECTO DE MUESTRAS	34
COLORACIÓN GRAM	37
TECNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS	41
TÉCNICAS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN	50
MEDIOS DE CULTIVO	57
UROCULTIVO	63
COPROCULTIVO	72
HEMOCULTIVO	78
RECuento DE MICROORGANISMOS EN UNA MUESTRA	81
ANTIBIOGRAMA	86
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HONGOS	92
SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE HONGOS	96
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE HONGOS	102
TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE VIRUS	113
PROTOZOARIOS DE IMPORTANCIA MÉDICA	121
TECNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA	127
HELMINTOS DE IMPORTANCIA MÉDICA	136
REACCIONES SEROLÓGICAS	147
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
ANEXOS	155
FUNDAMENTOS DE MEDIOS DE CULTIVO	156
COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	162
PREPARACIÓN DE REACTIVOS	165

INTRODUCCIÓN

Un microorganismo llamado también microbio u organismo microscópico, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio. La ciencia que estudia a los microorganismos es la Microbiología.

Los microorganismos son formas de vida muy pequeñas que sólo pueden ser observados a través del microscopio. En este grupo están incluidas las bacterias, los virus, los mohos y las levaduras.

Algunos microorganismos pueden causar el deterioro de los alimentos entre los cuales se encuentran los microorganismos patógenos, que a su vez pueden ocasionar enfermedades debido al consumo de alimentos contaminados.

Dentro de los microorganismos se encuentran organismos unicelulares, procariotas, como las bacterias y eucariotas como los protozoarios, una parte de las algas y los hongos e incluso los organismos de tamaño ultramicroscópico, como los virus.

Los microbios tienen múltiples formas y tamaños. Si un virus tuviera el tamaño de una pelota de tenis, una bacteria sería del tamaño de media cancha de tenis y una célula eucariota sería como un estadio entero de fútbol.

Las bacterias son organismos de una sola célula. Su forma puede ser esférica, alargada o en espiral. Pueden existir como organismos individuales o formando cadenas, grupos o pares. Las bacterias son las formas de vida más abundantes en la tierra. Tienen tamaños variados y se reproducen mediante la replicación del ADN y división en dos células independientes. En circunstancias normales este proceso dura entre 15 y 30 minutos.

Algunas bacterias pueden formar esporas. Estas esporas se caracterizan por presentar una capa protectora resistente al calor y que protege a la bacteria de la falta de humedad y nutrientes.

Los virus son organismos que pueden causar infecciones y que sólo se replican en células huésped. Los virus fuera de las células huésped están en forma inactiva. Los virus se caracterizan por presentar una capa protectora. Su forma puede ser espiral, esférica o como

células pequeñas, son de tamaño variable. Al tener un tamaño menor que las bacterias, pueden pasar filtros que permiten la retención de las bacterias.

Al contrario de las bacterias y protozoarios parásitos, los virus contienen un solo tipo de ácido nucleico (ARN o ADN). No se pueden reproducir por si solas, si no que necesitan el metabolismo de la célula huésped para asegurar que el ADN se copia en la célula huésped, para su replicación. No están presentes en el ser humano de manera natural. Cuando las personas quedan afectadas por un virus, estos generalmente se eliminan del cuerpo humano mediante secreciones.

Los protozoarios parásitos son organismos unicelulares. Estos se caracterizan por presentar un metabolismo complejo. Se alimentan a base de nutrientes sólidos, algas y bacterias presentes en organismos multicelulares como los humanos y animales. Se encuentran frecuentemente en forma de quistes o huevos. Por ejemplo los huevos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia lamblia* son comunes en aguas afectadas por contaminación fecal. En forma de quistes los patógenos son resistentes a la desinfección por cloro. Los parásitos protozoos se eliminan mediante la filtración y aplicación de hipoclorito de sodio.

Los problemas de las infecciones dependen del tipo de patógeno, el modo como se transfiere, dosis o concentraciones de patógenos, persistencia de los microorganismos y la resistencia de la persona infectada.

La dosis de infección significa el número de microorganismos que entra en el cuerpo antes de que se produzca la infección o enfermedad. Esta dosis es muy baja para los virus y protozoarios parásitos. La persistencia del microorganismo depende del tiempo viable de los microorganismos cuando no se encuentra en el huésped humano.

Los jóvenes, personas mayores y enfermos son los menos resistentes a las enfermedades y por lo tanto son más frágiles. Cuando una persona es infectada los patógenos se multiplican en el huésped y esto implica un riesgo de infección o enfermedad.

HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA

En el S. XVII, Antoine van Leeuwenhoek fue el primer científico que observó los microorganismos. Era un óptico holandés que construyó las primeras lentes de calidad. Observó la estructura de las semillas, hemáties, espermatozoides, pero su máximo descubrimiento fueron los *animáculos*; levaduras, algas, protozoos y algunas bacterias de gran tamaño.

Tuvo que pasar mucho tiempo hasta que la Microbiología se desarrolla como Ciencia. Esto sucede a finales del S. XIX, tras encontrar respuesta a dos preguntas básicas en Biología: ¿Existe la generación espontánea? ¿Cuál es la causa de las enfermedades infecciosas?

La teoría de la Generación espontánea fue propuesta por Francesco Redi, y decía que todos los organismos surgían espontáneamente. Esta teoría se rebatió para microorganismos macroscópicos (el filete y los gusanos) pero no para los animáculos.

En el S. XVIII, Needham observó que, si se preparaban infusiones vegetales y las depositaban en matraces, al observarlas al microscopio se veían animáculos, que crecían allí por generación espontánea.

En el mismo siglo, Spallanzani revoca la teoría de la generación espontánea. Hace lo mismo que Needham, llevando la infusión a ebullición. La sellaba y no aparecían microorganismos al microscopio.

En 1775, Lavoisier descubre el O₂ y su importancia para la vida. Los partidarios de la generación espontánea se aprovecharon de esto. Decían que si el matraz estaba cerrado no permitía el paso de O₂, y sin O₂ no se puede vivir.

Louis Pasteur (1822-1895) fue uno de los padres de la Microbiología. Demostró que en el aire existen estructuras similares a los animáculos. Además, propuso que se depositaban, por gravedad, sobre todos los objetos y materiales. Trabajó con zumos de uva y repitió los experimentos de Spallanzani y Needham. Observó que, si estos zumos eran llevados a ebullición e inmediatamente sellados, permanecían estériles. Para evitar las críticas, construye un matraz con cuello de cisne en el que introducía las infusiones estériles. Hay intercambio gaseoso, pero el líquido permanecía estéril. Sin embargo, al mover el matraz, rápidamente

proliferaban los microorganismos en la infusión. Su experimento es el fin de la teoría de la generación espontánea.

Pasteur estudió también las fermentaciones alcohólica, láctica y butírica. Demostró que son procesos biológicos que suceden como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos. Además, estudiando la fermentación butírica, descubrió la existencia de formas de vida capaces de vivir sin O₂; acuñó los términos de aerobio y anaerobio para describir la vida en presencia o ausencia de oxígeno.

John Tyndall y Ferdinand Cohn descubrieron que existen infusiones incapaces de esterilizar aunque se lleven a ebullición durante horas. Estas infusiones eran de heno, y contenían una bacteria perteneciente al género *Bacillus*, con forma de bastón y con otras formas más redondeadas muy resistentes al calor (endósporas).

Tyndal desarrolló un método de esterilización (Tindalización), capaz de esterilizar cualquier tipo de infusión. Consiste en calentar discontinuamente, a 100°, 30 minutos, durante 3 días consecutivos. Aún se emplea este método. El primer día se destruyen las células vegetativas, pero no las endósporas. El calor activa la germinación de las endósporas y, estas células, ya vegetativas, mueren. Si todavía queda alguna por germinar, al tercer día muere.

En el S. XIX, Joseph Lister, teniendo en cuenta los trabajos de Pasteur, relacionó los microorganismos presentes en el aire con las infecciones en heridas o en las operaciones de cirugía, que producían sepsis quirúrgica, que implica la putrefacción de las heridas u órganos sometidos a cirugía. Introdujo sustancias bactericidas para curar heridas y esterilizar el material quirúrgico (alcohol), sentando las bases de la desinfección y la antisepsia o asepsia.

Robert Koch estudio una enfermedad (carbunco) causada por *Bacillus anthracis* (ántrax) que provoca la muerte. Trabajó con ratones y observó que los ratones enfermos presentaban la bacteria, a diferencia de los sanos. Si inoculaba sangre contaminada en ratones sanos, enfermaban y morían. Cultivó la bacteria en medios líquidos y durante varias generaciones. Si tomaba uno de estos cultivos y lo inoculaba en un ratón sano, producía la enfermedad y la muerte.

Koch estableció cuatro postulados que demuestran la teoría microbiana de las enfermedades infecciosas:

- ✚ El microorganismo causante de la enfermedad debe estar presente en el individuo enfermo y no en el individuo sano.
- ✚ El microorganismo debe ser aislado del individuo enfermo y cultivado en cultivo puro.
- ✚ La enfermedad debe producirse al inocular este cultivo puro en un hospedador sensible y sano.
- ✚ El microorganismo debe ser reaislado del individuo infectado artificialmente y mostrar las mismas propiedades del microorganismo de partida.

Koch identificó el agente causante de la tuberculosis; el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. También identificó *Vibrio colera*, agente etiológico del cólera.

Kitasato descubrió la bacteria causante del tétanos, *Clostridium tetani*.

Johan Schroeter observó que, si cortaba rebanadas de patata y las dejaba al aire, aparecían sobre ellas colonias de bacterias. Fue el primer cultivo en estado sólido, que todavía se usa.

Koch observó que, al dejar al aire rebanadas de patatas y las incubaba a 37°, aparecían diferentes colonias con distinto color y morfología por lo que intuyó que cada colonia procedía de un solo microorganismo de partida, que había proliferado. Esto hoy en día es una base de la Microbiología.

Al tomar una de estas colonias y extenderla sobre una nueva rodaja de patata, e incubarla a 37°, aparecían colonias idénticas a las de partida. Descubre, por tanto, que una colonia es un cultivo puro o axénico.

La formación de medios sólidos es también fruto de Koch. Utilizó agar, que es un polímero de las algas rojas, que se usaba para darle solidez a las mermeladas. Tomaba un medio cualquiera; extracto de carne, por ejemplo, lo introducía en un matraz, lo esterilizaba mediante cocción y le añadía agar. Llevaba la mezcla a 100° y, al bajar la temperatura, solidificaba. Esto, junto con la introducción de la placa petri, por Petri, fue el inicio de la metodología en Microbiología.

El reconocimiento mundial de la Microbiología como Ciencia se dio en Berlín, donde Koch creó un laboratorio donde estudió el cultivo de microorganismos patógenos para el hombre. En París, se creó el Instituto Pasteur, donde se estudió por qué aparecía la enfermedad en el hombre, cómo ocurre la curación y aparece la inmunidad.

Winogradski y Beijerinck son considerados como los padres de la Ecología microbiana. De forma independiente, demostraron la gran versatilidad metabólica de los microorganismos y que estas reacciones tan peculiares intervienen de forma muy importante en el reciclaje de los materiales que forman la Tierra. Cabe destacar el descubrimiento de Winogradski de las bacterias quimiolitotrofas, que obtienen energía de la oxidación de elementos inorgánicos como el azufre o el amoníaco. Beijerinck descubre la fijación del nitrógeno por parte de los microorganismos.

RELACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA CON OTRAS CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA Y VIROLOGÍA

El descubridor de los virus fue Ivanowski, en 1892. Descubrió el TMV (virus del mosaico del tabaco). Trabajó con plantas parasitadas por el virus. Hizo triturados de esas plantas y vio que producían la enfermedad al ponerlas en contacto con plantas sanas, incluso si los triturados habían sido filtrados por filtros bacteriológicos. Concluyó que existía un agente filtrante, más pequeño que las bacterias, causante de esta enfermedad. A este agente se le llamó virus (veneno).

Stanley cristalizó el TMV y estudió al microscopio electrónico su estructura. Comienza entonces el estudio masivo de virus animales. Se descubre que algunos virus son capaces de producir cáncer, como el virus del sarcoma de Rose, que produce cáncer en pollos.

Diener descubre agentes más simples que los virus, los viroides, relacionados con enfermedades vegetales.

Prusiner descubre los priones, que son agentes infecciosos de animales.

En 1983, Luc Montaigner descubre el VIH.

MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

En el S. XVIII, Jenner fue capaz de relacionar por qué las personas que trabajaban con vacas no contraían la viruela. Vio que en algunas vacas enfermas aparecían granos similares a los de los humanos enfermos. Estas pústulas estaban formadas por un virus muy similar al de los

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

humanos. Inoculó las pústulas de vaca en personas sanas, consiguiendo su inmunidad a la enfermedad.

El padre de la Inmunología, Louis Pasteur, descubre la vacuna del cólera de las aves y el carbunco. Usó microorganismos atenuados que, tras ser inoculados, son reconocidos por el sistema inmune, pero no son lo suficientemente virulentos para atacar.

En una segunda etapa se usaron microorganismos muertos. Ej: Vacuna de la tos ferina.

Posteriormente se utilizaron toxoides. Algunos microorganismos producen enfermedad porque generan una toxina. Ej. Tétanos (toxina tetánica). Se vio que si la toxina era inactivada por formol o calor, y se inoculaba, el sistema inmune era capaz de reconocerlas. Estas toxinas inactivas se llaman toxoides.

Recientemente se desarrolló la producción de nuevas vacunas como las vacunas recombinantes, que emplean técnicas del DNA recombinante. Ej. Hepatitis B.

MICROBIOLOGÍA Y QUIMIOTERAPIA

La Quimioterapia surge a partir de los trabajos de Lister (cirugía aséptica) y Ehrlich y su bala mágica, que es aquel compuesto letal para el germen e inocuo para el hombre. El 606 o salvarsán fue utilizado contra la sífilis.

El padre de la Quimioterapia fue Flemming, quien, en 1928 interpretó acertadamente una interacción entre *penicilium notatum* y *Staphylococcus*, descubriendo la penicilina. Parte del cultivo de *Staphylococcus* se le contaminó por *penicillium*, y en la zona contaminada no crecía la bacteria.

LA MICROBIOLOGÍA ACTUAL

La microbiología actual es una de las disciplinas con mayor impacto y futuro. Puede dividirse en dos áreas de trabajo:

- Microbiología básica. Estudia la naturaleza y propiedades de los microorganismos: morfología, fisiología, bioquímica, genética, ecología y taxonomía.

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

- Microbiología aplicada. Utiliza los conocimientos generados por la Microbiología básica para resolver problemas y obtener beneficios en Medicina, medio ambiente y otros. Podemos diferenciar 4 ramas:
 - Microbiología sanitaria. Es la más desarrollada, ya que su avance implica una mejora de la calidad de vida.
 - Microbiología de los alimentos. Estudia dos aspectos de los microorganismos relacionados con los alimentos
 - ✚ Utilización de microorganismos para generar alimentos (vino, cerveza, pan, yogurt...).
 - ✚ Papel que juegan los microorganismos en el deterioro de determinados alimentos, y la implicación de determinados microorganismos como productores de intoxicaciones alimentarias.
 - Microbiología ambiental. Estudia las relaciones de las distintas poblaciones de microorganismos que conviven en los distintos hábitats de un ecosistema. También estudia el papel de los microorganismos en los ciclos bioquímicos de la materia. Ej. Remediación de los suelos contaminados, mareas negras.
 - Microbiología industrial y Biotecnología. Emplea los microorganismos para generar sustancias de interés industrial: antibióticos, vitaminas, enzimas, hormonas, etc.

CUESTIONARIO

¿Cuál es la importancia de la microbiología en el campo de la salud?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

En el desarrollo histórico de la microbiología que hechos considera Ud. los más importantes

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Cuál fue el aporte de Louis Pasteur en el desarrollo de la Microbiología?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

DEFINICIÓN:

Bioseguridad se refiere a un conjunto de medidas preventivas mínimas, que tienen como objetivo el proteger la salud del personal que trabaja en el laboratorio frente a diferentes riesgos producidos por bacterias, parásitos, hongos, agentes físicos, mecánicos y químicos.

1.1 AGENTES DE RIESGO

El laboratorista diariamente realiza muchas actividades que pueden causar enfermedad en él o en las personas que trabajan en ambientes cercanos e incluso a sus familiares.

Estas enfermedades pueden ser causadas por:

- Agentes biológicos debido a la ingestión de alimento o agua contaminados, por inhalación o por inyección a través de la piel o mediante la formación de aerosoles al destapar las muestras o hacer extendidos.
- Agentes físicos y mecánicos como las temperaturas externas, contactos eléctricos o conexiones defectuosas, vidrios resquebrajados de recipientes dañados o tubos rotos.
- Agentes químicos que pueden ser corrosivos que causan destrucción o alteración a los tejidos (ácido acético, lejía, ácido clorhídrico, etc.), tóxicos cuyos efectos se manifiestan según la vía de exposición por inhalación, ingestión o contacto directo con mucosas o piel (acetona, ácido clorhídrico, éter, etc.), carcinogénicos (Bencidina), inflamables o explosivos (acetona, metanol, tolueno, éter etílico, etc.).

1.2 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

Las señales de aviso deben emplearse continuamente para indicar la presencia de riesgos.

DEL AMBIENTE:

El ambiente del laboratorio debe contar por lo menos con un caño con su lavadero y estar bien ventilado e iluminado.

Las mesas de trabajo deben confeccionarse de material sólido con superficies lisas e impermeables, ser resistentes a las sustancias corrosivas y de fácil limpieza.

El espacio de la mesa de laboratorio donde se manipula el material infeccioso se denomina Área Contaminada, debe tomarse las siguientes precauciones:

- Debe estar ubicada en un punto alejado de la puerta de entrada al laboratorio y de los lugares en los que habitualmente se producen corrientes de aire.
- Se evitará la entrada de personas ajenas al servicio.
- Se evitará el movimiento de las personas que trabajan en esa área mientras se realizan extendidos.
- Se dispondrá en ella sólo de los equipos y materiales necesarios para el trabajo (cuadernos y libros de trabajo que deben estar allí y no se llevarán a otro sector).
- El teléfono no debe instalarse en el área de trabajo.
- Los pisos del laboratorio deben limpiarse todos los días con soluciones desinfectantes (ejemplo el cresol) al final de la jornada de trabajo. No se debe barrer ni encerar el piso en seco.
- El operador es el responsable de desinfectar el área contaminada antes y después de cada sesión de trabajo, con fenol al 5% o cresol al 3% dejando actuar el desinfectante durante 30 minutos.
- Las paredes y pisos deben ser lisos para facilitar la limpieza con soluciones desinfectantes.
- Al sistema de desagüe sólo se debe eliminar agentes biológicos o químicos previamente descontaminados, neutralizados y autoclavados o inactivados.
- Debe haber recipientes apropiados para desechar el material contaminado.

DEL PERSONAL:

- Debe usar un mandil de mangas largas y preferentemente cerrada por delante, estos deben quedar en el laboratorio.
- Debe lavarse las manos con jabón al inicio de cada jornada de trabajo y cuantas veces sea necesario.
- El personal de salud debe presentar una reacción positiva a la prueba de la tuberculina intradérmica o PPD con 2 U.T. Quienes tengan reacción negativa, no deben prestar sus servicios en el laboratorio hasta que hayan sido vacunados con BCG.
- Todo el personal de laboratorio que trabaja con agentes microbiológicos debe someterse a un programa de vacunación contra tétanos, BCG y si está en zona endémica, contra la fiebre amarilla y la hepatitis.

- Debe estar prohibido en todas las zonas de trabajo el fumar, comer y/o beber. Estas actividades deben realizarse sólo en lugares destinados para ello y estar separados físicamente de las áreas de trabajo.
- Debe asegurarse que los cabellos largos no entren en contacto con los especímenes, áreas de trabajo, reactivos o medios o se enganchen con los materiales del laboratorio. Para esto es recomendable protegerse con gorros o sujetarse el cabello hacia atrás.
- No debe maquillarse (aplicar cosméticos) en las áreas de trabajo, independientemente del tipo de trabajo que se realiza en el laboratorio.
- Debe someterse a un chequeo anual del tórax por rayos X y a un examen médico una vez al año.

DE LAS MUESTRAS Y SU PROCESAMIENTO

- Todas las muestras deben ser tratadas como altamente infecciosas para evitar el posible contagio.
- Antes de desechar las muestras o sus recipientes efectuar la descontaminación del material que estuvo en contacto con la muestra y de la muestra misma en el propio laboratorio. En caso que no se cuente con autoclave, hervir en una vasija de metal u olla para matar los agentes infecciosos o utilizar un incinerador casero. Si no se tuviera estos aditamentos se puede usar lejía (hipoclorito de sodio) diluida.
- El material contaminado debe colocarse en una vasija de metal y luego cerrarla herméticamente.
- No se debe acumular inadecuadamente material contaminado.
- Evitar la entrada de personas ajenas al laboratorio.
- Usar mascarilla y guantes, al destapar frascos o tubos o destapar en dirección opuesta al operador.
- No pipetear las muestras con la boca, usar pipetas automáticas o bulbos de jebes o trasvasar directamente.
- El material contaminado debe ser sumergido por lo menos 30 minutos en solución desinfectante (lejía).
- En lugares donde hay materiales o equipos de laboratorio (horno, estufa, refrigeradora) no se debe almacenar alimentos ni vajilla.
- Las manos deben lavarse con abundante agua y jabón cada vez que se interrumpa el trabajo. Para secarse las manos deben usarse toallas desechables.

- Es conveniente utilizar mascarillas descartables.
- Se debe dejar el área limpia luego de cada jornada de trabajo.

MEDIDAS EN CASO DE ACCIDENTE

- ❖ En caso de accidentes por derrame de una muestra en el piso o la mesa, cubrir con papel periódico, empapar éste cuidadosamente con fenol al 5% y dejar que éste actúe durante 30 minutos como mínimo antes de limpiar el área.
- ❖ Todos los líquidos derramados deben ser limpiados inmediatamente. Si el material es tóxico o corrosivo, antes de realizar la limpieza debe colocarse guantes de goma y delantal de plástico.
- ❖ Las soluciones diluidas de ácidos o bases pueden neutralizarse con bicarbonato sódico sólido. Para ácidos fuertes, después de una disolución con agua, puede usarse con precaución carbonato sódico sólido. Para soluciones alcalinas fuertes puede usarse una dilución de ácido acético 1:5 en agua.

CUESTIONARIO

¿Cuál es la importancia de respetar las normas de bioseguridad?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Si usted está manipulando una muestra de sangre de un paciente y por error involuntario derrama parte de ella sobre la mesa de trabajo ¿Qué acciones tomaría?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué normas de bioseguridad usted tendrá presente al realizar sus actividades en el laboratorio?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

MICROSCOPIA

OBJETIVOS:

- Ubicar correctamente las partes del microscopio óptico.
- Manejar usar correctamente el microscopio óptico en la observación de diferentes preparados.

FUNDAMENTO TEORICO

La **microscopía** es la que investiga los objetos pequeños utilizando el microscopio. Es la técnica de producir imágenes visibles de estructuras o detalles demasiado pequeños para ser percibidos a simple vista. En la microscopía se evidencia los grandes aportes que la física ha hecho a la biología.

Exceptuando técnicas como el microscopio de fuerza atómica, el microscopio de iones en campo y el microscopio de efecto túnel, la microscopía generalmente implica la difracción, reflexión o refracción de radiación incidente en el sujeto de estudio. En la microscopía de luz clásica, esto implica el paso de luz transmitida a través o reflejada desde el sujeto mediante una serie de lentes, para poder ser detectada directamente por el ojo o impresa en una placa fotográfica.

En el microscopio compuesto, para tener una imagen detallada y fiel en cuanto a calidad, de los microorganismos y sus fenómenos, se debe tener correspondiente a la parte óptica: la luz, la cantidad de esta y su concentración en la muestra, además de que proviene de forma directa por medio de un bombillo incorporado (electricidad) o un espejo en donde se dé la reflexión de la luz. Están los lentes, con los poderes de aumento y resolución, y en tercer lugar esta el índice de refracción con los distintos líquidos que se utilizan para las observaciones. En cuanto a la parte mecánica tenemos los tornillos y sus engranajes.

También hay una forma de microscopía basada en una sonda muy pequeña que reconoce las perturbaciones que ocurren al extremo de la sonda debida a efectos eléctricos.

Anton van Leeuwenhoek (Holanda, 1632-1723), un vendedor de telas, aficionado a pulir lentes, logró fabricar lentes lo suficientemente poderosas como para observar bacterias, hongos y protozoos, a los que llamó "animálculos"

El primer microscopio compuesto fue desarrollado por Robert Hooke. A partir de éste, los avances tecnológicos permitieron llegar a los modernos microscopios de nuestro tiempo, los que existen de varios tipos y son usados con diferentes fines.

Para impedir desviaciones de la luz, se utiliza el aceite de cedro o inmersión en la muestra.

El microscopio (de *micro-*, μικρο, pequeño, y *scopio*, σκοπεω, observar) es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista. El tipo más común y el primero que se inventó es el microscopio óptico. Se trata de un instrumento óptico que contiene una o varias lentes que permiten obtener una imagen aumentada del objeto y que funciona por refracción.

Partes del Microscópio







Sistema óptico

- 1) OCULAR: Lente situado cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.
- 2) OBJETIVO: Lente situado cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.
- 3) CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.
- 4) DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.
- 5) FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

- 1) SOPORTE: Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.
- 2) PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.
- 3) CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular y fundamentalmente.
- 4) REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.
- 5) TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

Tipos de Microscopio:

-  Microscopio óptico
-  Microscopio simple
-  Microscopio compuesto
-  Microscopio de luz ultravioleta
-  Microscopio de fluorescencia
-  Microscopio petrográfico

- ✚ Microscopio en campo oscuro
- ✚ Microscopio de contraste de fase
- ✚ Microscopio de luz polarizada
- ✚ Microscopio confocal
- ✚ Microscopio electrónico
- ✚ Microscopio electrónico de transmisión
- ✚ Microscopio electrónico de barrido
- ✚ Microscopio de iones en campo
- ✚ Microscopio de sonda de barrido
- ✚ Microscopio de efecto túnel
- ✚ Microscopio de fuerza atómica
- ✚ Microscopio virtual
- ✚ Microscopio de antimateria
- ✚ Microscopio reflector

Conceptos Importantes en Microscopía

- Escala de reproducción: es la relación lineal que existe entre el tamaño del objeto y su imagen. Por ejemplo, 4:1, 10:1, 40:1.
- Aumento: es la proporción entre el tamaño de la imagen observada al microscopio y el tamaño real del objeto. Aumento total se calcula multiplicando aumento de ocular por el del objetivo.
- Distancia frontal: distancia entre el objeto observado y la lente del objetivo utilizado, cuando se encuentra bien enfocada la muestra. Es inversamente proporcional al aumento.
- Profundidad de campo o de foco, o poder de penetración: espesor del preparado que se observa con nitidez, o profundidad de planos que están en foco en un momento dado. Con aumentos más grandes se observa sólo pequeños espesores con nitidez, mientras que por arriba y debajo de estos la imagen se desvanece; por lo tanto también es inversa al aumento.
- Campo observado: porción del preparado incluida en la imagen. Su tamaño también es inverso al aumento utilizado y va determinado por el área de campo visual de cada objetivo.

- Poder de resolución (PR): capacidad de los lentes de mostrar separados con nitidez dos puntos. Si el PR es mayor quiere decir que la distancia que separa estos dos puntos es menor. Por lo tanto da una imagen más detallada.
- Límite de resolución: distancia mínima que debe existir para que dos puntos del objeto se visualicen por separado.
- Apertura numérica: medida de la capacidad del microscopio de agrupar las refracciones de la luz producidas por los finos detalles del objeto. Es propia de cada objetivo.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
3. Comenzar la observación con el objetivo de 4x (ya está en posición) o colocar el de 10 aumentos (10x) si la preparación es de bacterias.
4. Para realizar el enfoque:
 - a. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - b. Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
5. Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

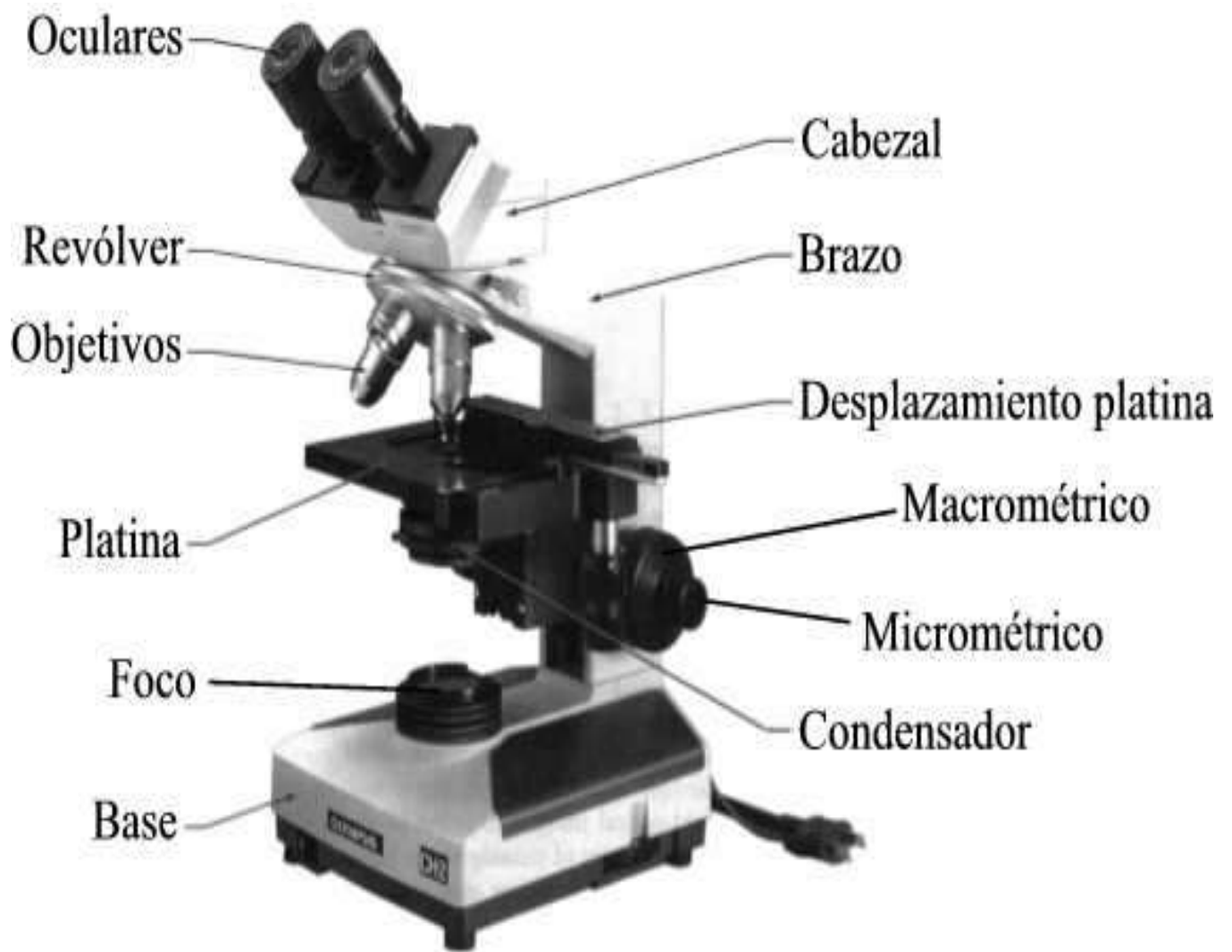
6. Empleo del objetivo de inmersión:

- a. Bajar totalmente la platina.
- b. Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
- c. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40.
- d. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
- e. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
- f. Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
- g. Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
- h. Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.
- i. Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- j. Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES

1. Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
2. Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.

3. Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
4. No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
5. Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
6. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
7. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
8. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
9. Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos.



Partes de un microscopio óptico

CUESTIONARIO

¿Cuál es la importancia de utilizar el microscopio óptico?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Qué consideraciones técnicas tendría en cuenta al utilizar un microscopio óptico ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Cuál es el mayor aumento del microscopio óptico y cuales son los objetivos de menor aumento?

.....

.....

.....

.....

ANATOMÍA BACTERIANA

OBJETIVOS:

- Observar las diferentes formas bacterianas.
- Reconocer y diferenciarlas en diferentes muestras biológicas.

FUNDAMENTO TEORICO:

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño variable (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo cocos, bacilos y espirilos. Las bacterias son procariontes y por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, etc.), no tienen el núcleo definido y presenta orgánulos internos de locomoción. Generalmente poseen una pared celular compuesta de péptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles. Del estudio de las bacterias se encarga la bacteriología, una rama de la microbiología.

Los cocos son células bacterianas esféricas. Pueden existir como células individuales pero también se pueden agrupar en diplococos, tétradas, sarcinas, estafilococos, estreptococos. Los diplococos se forman cuando los cocos se dividen y permanecen juntos para constituir pares (*Neisseria*). Cuando las células permanecen adheridas después de dividirse repetidamente en un plano, se forman largas cadenas de cocos; este modelo se observa en los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*.

Las bacterias del género *Staphylococcus* se dividen en planos aleatorios para generar irregulares agrupaciones en forma de racimos de uvas. Las divisiones en dos o tres planos pueden producir grupos simétricos de cocos. Los miembros del género *Micrococcus* se dividen a menudo en dos planos para formar grupos cuadrados de cuatro células denominados tétradas. En el género sarcina los cocos se dividen en tres planos, formando paquetes cúbicos de ocho células.

La otra forma bacteriana común es la de bastoncillo denominada bacilo. *Bacillus magaterium*, es el ejemplo clásico de una bacteria con forma de bacilo. Los bacilos varían considerablemente en la proporción entre la longitud y anchura, siendo los cocobacilos tan cortos y anchos que parecen cocos. La forma del extremo del bacilo a menudo varía entre especies; puede ser plana, redondeada, en forma de puro o bifurcada.

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres; crecen hasta en los más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos, en las profundidades tanto del mar y como de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que se pueden encontrar en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce.

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces tantas células bacterianas como células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la piel y en el tracto digestivo. Aunque el efecto protector del sistema inmune hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas, incluyendo cólera, sífilis, lepra, tifus, difteria, escarlatina, etc. Las enfermedades bacterianas mortales más comunes son las infecciones respiratorias, con una mortalidad sólo para la tuberculosis de cerca de dos millones de personas al año.

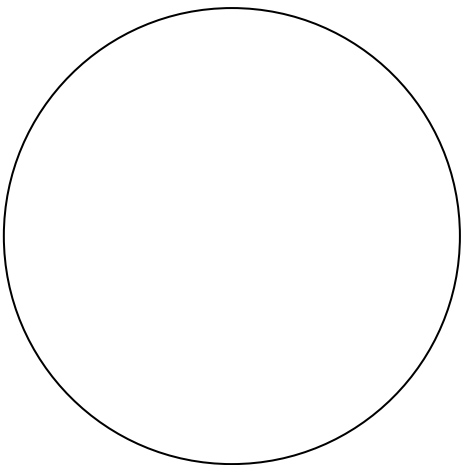
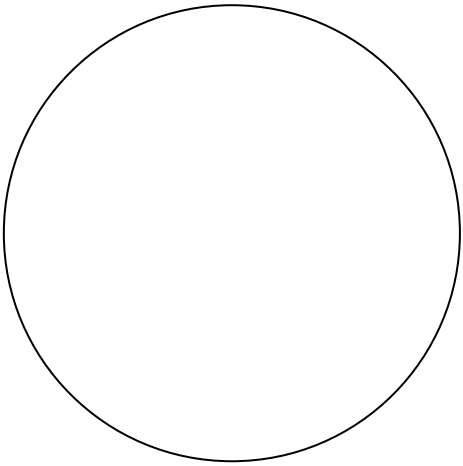
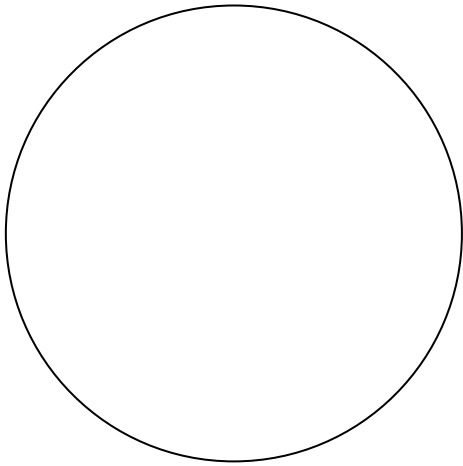
En todo el mundo se utilizan antibióticos para tratar las infecciones bacterianas. Los antibióticos son efectivos contra las bacterias ya que inhiben la formación de la pared celular o detienen otros procesos de su ciclo de vida.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en el microscopio una lámina porta objeto previamente coloreada con coloración Gram.
2. Observar al microscopio con objetivo de 100X.
3. Identificar en los diferentes campos microscópicos: Cocos, bacilos, espirilos, estreptococos, estafilococos, etc.
4. Dibujar las diferentes observaciones microscópicas.

DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.



CUESTIONARIO

Explique que formas tienen las bacterias y como se agrupan

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Mencione cinco géneros o especies bacterianas que afectan la salud de las personas.

.....
.....
.....
.....
.....

Defina que es:

Coco:

.....
.....

Bacilo:

.....
.....

Espirilo:

.....
.....

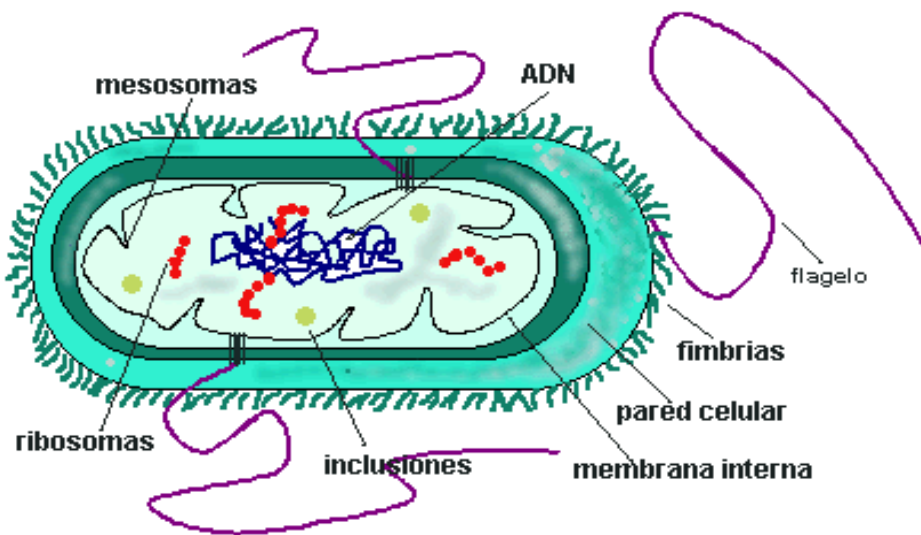
Estafilococo:

.....
.....

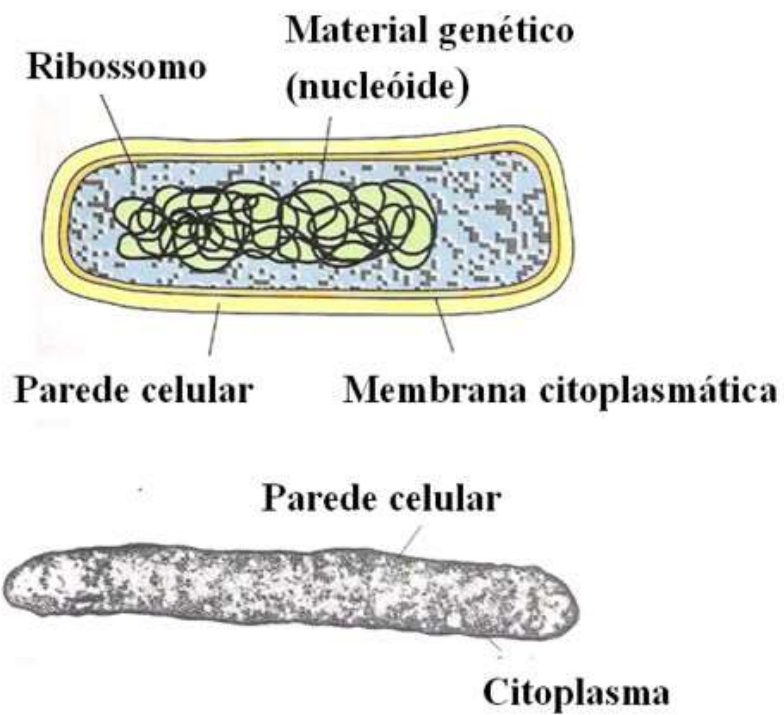
Estreptococo:

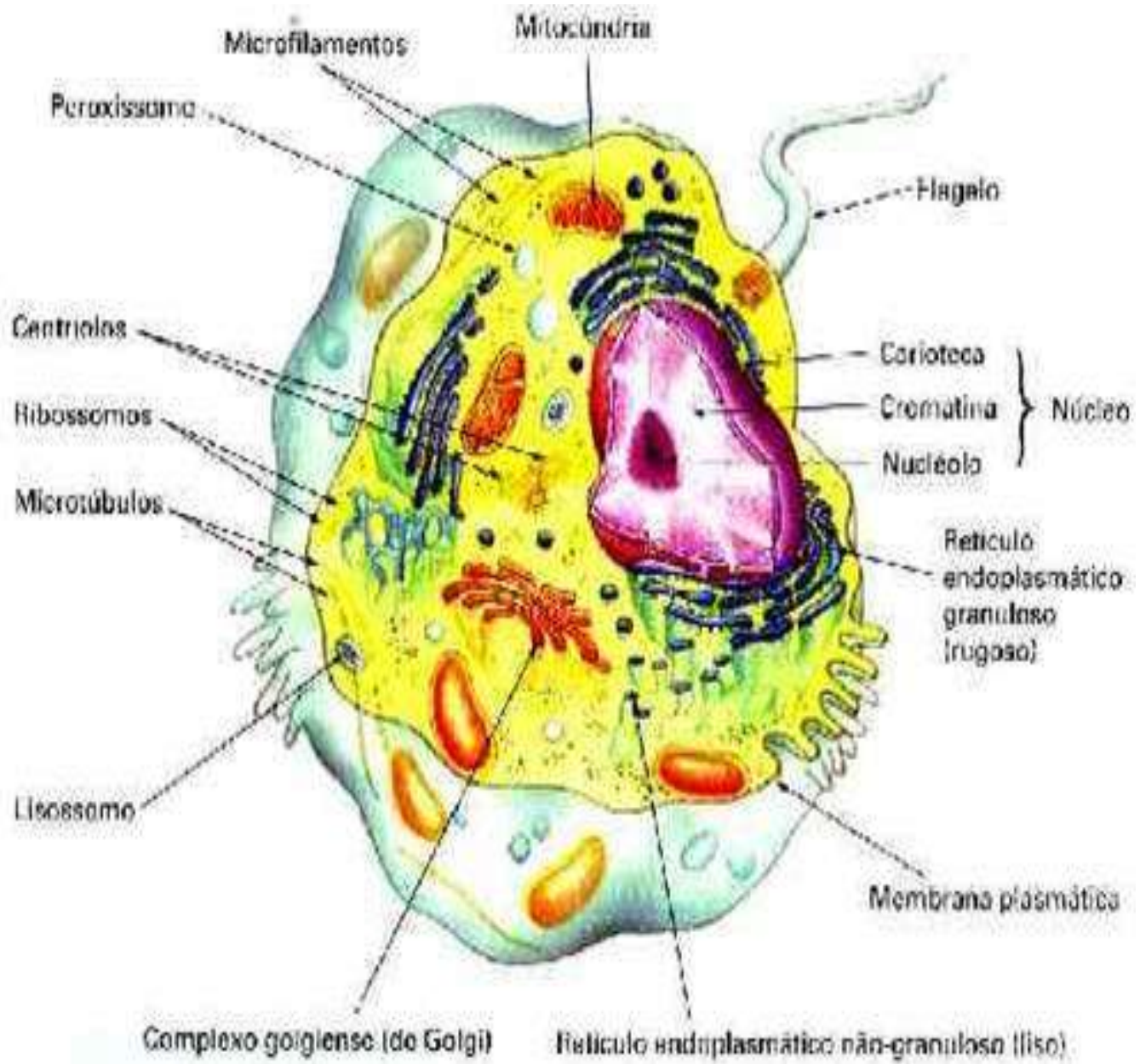
.....
.....

MORFOLOGÍA BACTERIANA

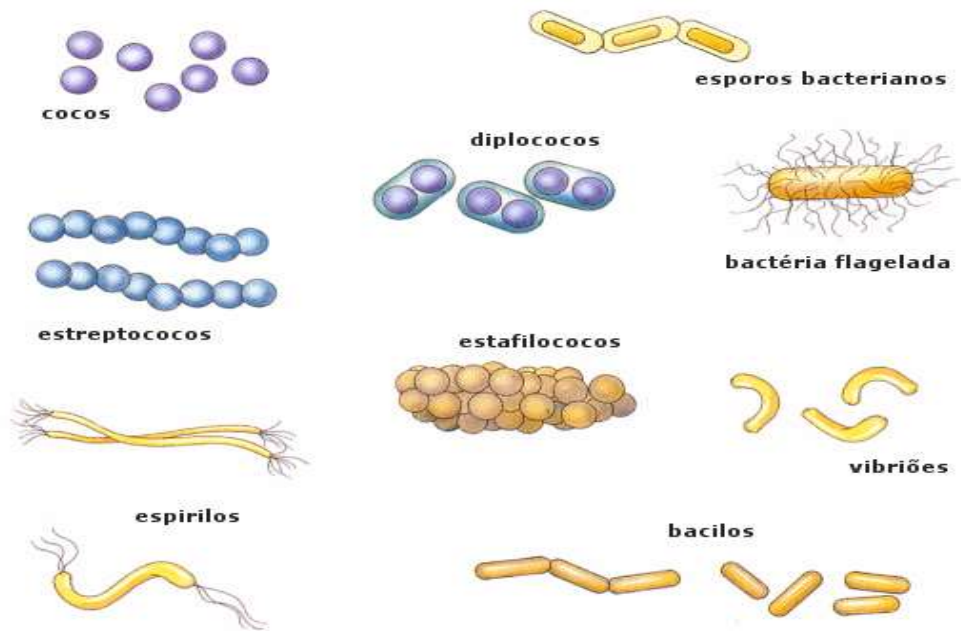


CÉLULA PROCARIONTE

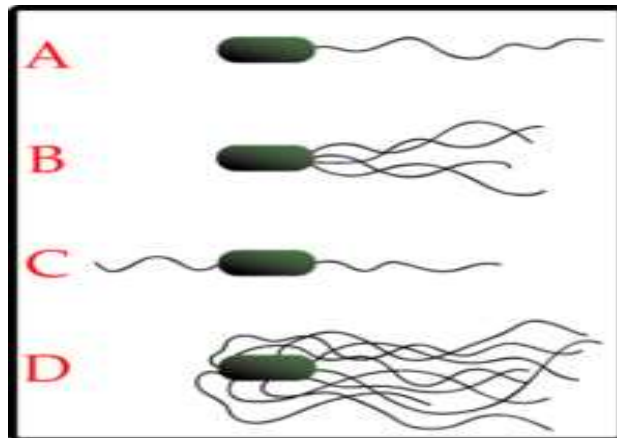




CÉLULA EUKARIOTE



FORMA Y AGRUPACIONES BACTERIANAS



- A. Monótrico.
- B. Lofótrico.
- C. Anfítrico.
- D. Perítrico.

FLAGELOS BACTERIANOS

EXAMEN DIRECTO DE MUESTRAS

OBJETIVOS:

- Realizar e interpretar correctamente el procedimiento de exámenes directo de muestras.
- Observar los preparados realizados a partir de muestras biológicas.

FUNDAMENTO TEORICO:

Un microorganismo, también llamado microbio u organismo microscópico, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio. En este grupo están incluidos las bacterias, los virus, los mohos y las levaduras.

Las bacterias son pequeñas y de estructura sencilla cuando se comparan con células eucariotas, sin embargo tienen forma y tamaño característicos. Aunque poseen una membrana plasmática, necesaria para todas las células vivas, las bacterias carecen normalmente de sistemas extensos y complejos de membrana interna.

Algunos microorganismos pueden causar deterioro de los alimentos entre los cuales se encuentran los microorganismos patógenos, que a su vez pueden ocasionar enfermedades debido al consumo de alimentos contaminados. Adicionalmente existen ciertos microorganismos patógenos que no causan un deterioro visible en el alimento. Sin embargo, por otro lado existen también microorganismos que son beneficiosos y que pueden ser usados en el procesamiento de alimentos con la finalidad de prolongar su tiempo de vida o de cambiar las propiedades de los mismos.

PROCEDIMIENTO

1. Rotular dos láminas y colocar una gota de suero fisiológico en una de ellas y en la otra una gota de lugol.
2. Añadir a cada lámina, por separado, una pequeña cantidad de la muestra, utilizando para ello un asa bacteriológica o palillos de madera de 1-3 mm³ y mezclar o emulsificar.
3. Colocar a cada lámina su laminilla cubre objeto y observar al microscopio con objetivo de 10X y 40X.

CUESTIONARIO

¿Por qué es necesario realizar un examen directo a las muestras que llegan al laboratorio?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Para realizar un examen directo se necesitan los siguientes materiales (considerar reactivos, instrumentos y equipos)?

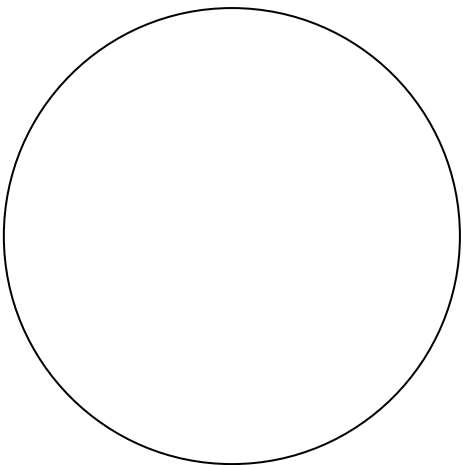
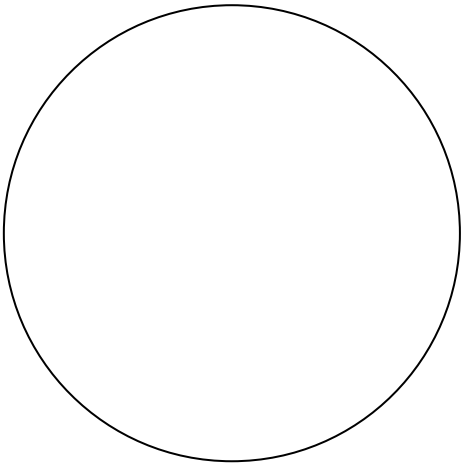
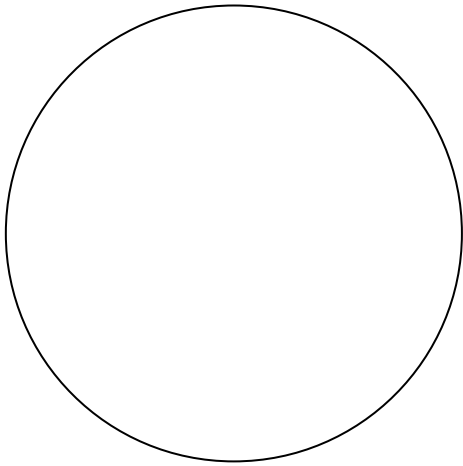
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Ud considera que el examen directo es sólo para muestras líquidas? ¿Por qué?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.



COLORACIÓN GRAM

OBJETIVOS:

- Realizar eficientemente la Coloración Gram y diferenciar morfológicamente bacterias Gram Positivas y bacterias Gram Negativas.

FUNDAMENTO TEORICO:

El estudio microscópico de las bacterias se facilita notablemente al tratarlas con colorantes. Con más facilidad se aprecian la forma y tamaño relativo de los microorganismos teñidos; el colorante también permite la observación de ciertas estructuras celulares.

Los colorantes son compuestos orgánicos que contienen radicales cromóforos, esto es, que producen color y grupos de auxocromos que forman sales. Los grupo nitro ($-\text{NO}_2$) y azo ($-\text{N}=\text{N}$) son cromóforos; los radicales hidroxilo ($-\text{OH}$) y amino ($-\text{NH}_2$) son grupos auxocromos. Los cromóforos imparten la propiedad cromógena al colorante, y los grupos auxocromo permiten que el colorante se una con las fibras o tejidos.

Muchos colorantes del comercio son sales, pero se les denominan colorantes básicos si la porción del colorante actúa como base, o ácidos si actúa como ácido. Pueden obtenerse colorantes básicos en forma de cloruros y colorantes ácidos en forma de sales de sodio. Los colorantes ácidos se emplean para teñir material básico, ejemplo: citoplasma en tanto los colorantes básicos colorean núcleo, algunos gránulos y otras sustancias ácidas.

La coloración de células y tejidos quizá sea una combinación de fenómenos físicos y químicos. Los fenómenos físicos de adsorción, absorción, capilaridad y ósmosis participan en cierto grado. Por otra parte, la afinidad de colorantes básicos por los tejidos ácidos y viceversa indican que hay reacciones químicas que conducen a la formación de nuevos compuestos.

La coloración más empleada en Bacteriología es la coloración Gram, realizada por Gram en 1884 y hasta hoy no ha sido remplazada. Este método permite diferenciar las especies bacterianas en Gram Positivas y Gram Negativas, según tomen o no el colorante. Se han hecho muchas modificaciones, pero todas ellas requieren el uso de cuatro reactivos:

Colorante básico: Generalmente cristal violeta o violeta de genciana o metilo en solución alcohólica o hidroalcohólica.

Solución yodo-yodurada de lugol: Que actúa como mordiente.

Alcohol cetona: Actúa como un decolorante.

Colorante de Contraste: Que puede ser safranina o fucsina básica.

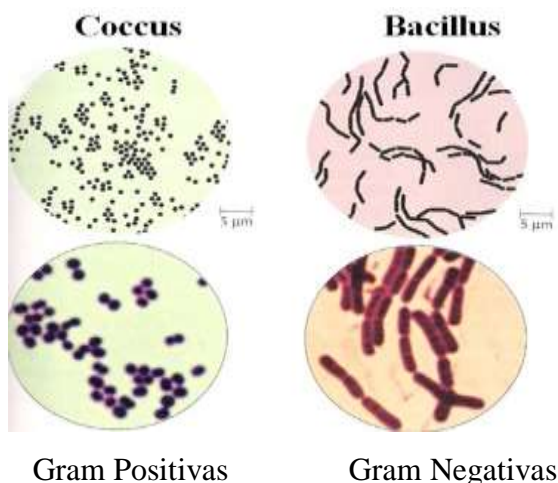
PROCEDIMIENTO:

1. Fijar el frotis y verter el cristal violeta en el portaobjetos (que cubra la muestra). Déjelo reposar de 1 a 3 minutos. Enjuáguelo con agua corriente y elimine el exceso de agua.
2. Agregue al portaobjetos lugol y déjelo reposar de 1 a 3 minutos. Enjuáguelo con agua corriente y elimine el exceso de agua.
3. Agregue al portaobjetos alcohol cetona y déjelo reposar de 1 a 3 minutos. Enjuáguelo con agua corriente y elimine el exceso de agua. Examine el frotis, si quedan algunas zonas de color violeta aplique nuevamente alcohol cetona durante 15 a 30 segundos y nuevamente enjuáguelo con agua corriente y elimine el exceso de agua.
4. Agregue al portaobjetos safranina y déjelo reposar de 1 a 3 minutos. Enjuáguelo con agua corriente y elimine el exceso de agua.
5. Dejar secar a temperatura ambiente, colocar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio con objetivo de 100x .

Lectura:

Bacterias Gram Positivas: Se tiñen de color violeta oscuro como: *Estafilococos*, *micrococos*, *neumococos*, *enterococos*, *Corynebacterium difteriae*, *Clostridium tetani*, *Bacillus anthracis*.

Bacterias Gram Negativas: Se tiñen de color rosado como: *Gonococos*, *meningococos*, *Escherichia coli*, *Shiguella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, etc.



CUESTIONARIO

¿Cuál es la diferencia morfológica o estructural de una bacteria Gram Positiva y una bacteria Gram Negativa?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Qué errores podría ocurrir cuando usted realiza la coloración Gram?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Cuál es la importancia de realizar una coloración Gram?

.....

.....

.....

.....

.....

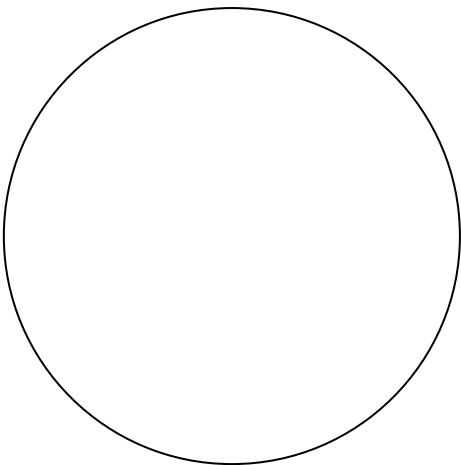
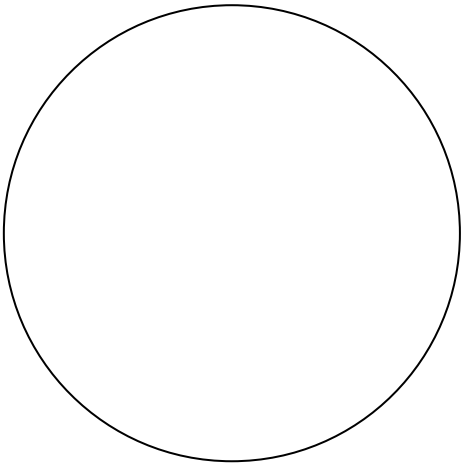
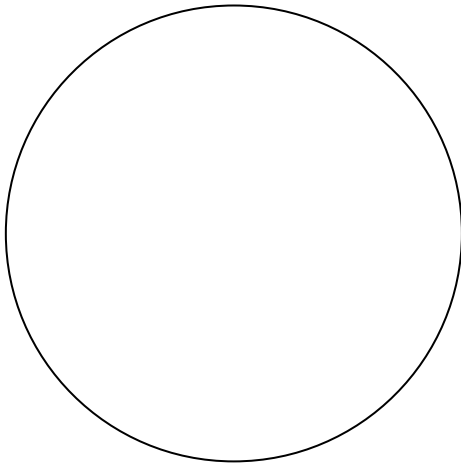
.....

.....

.....

DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.



TECNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

OBJETIVO:

- Realizar correctamente la coloración Ziehl y Neelsen e interpretar la lectura de las láminas coloreadas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por un bacilo denominado *Mycobacterium tuberculosis*, que se transmite a través de las gotitas de saliva que los enfermos eliminan al exterior al hablar, toser o escupir. Esta enfermedad ataca preferentemente a los pulmones, pero puede afectar también a otros órganos del cuerpo humano.

Generalmente se manifiesta por signos y síntomas generales que van aumentando progresivamente, los que incluyen pérdida de peso y de apetito, tos persistente y fiebre nocturna, entre otras. El diagnóstico se realiza por medio de la observación del bacilo teñido, en el examen directo (baciloscopía) o mediante cultivos de la muestra.

La baciloscopía es un examen básico para el diagnóstico de la tuberculosis, útil para el control de la evolución del tratamiento administrado al paciente, por lo que su conocimiento debe alcanzar a los servicios de salud del país de todos los niveles.

PROCEDIMIENTO:

1. Obtención de la muestra:

Una buena muestra es aquella que proviene del árbol bronquial y es obtenida después de un esfuerzo de tos. Sin embargo, una muestra con apariencia de saliva puede ser positiva.

Para ser considerada como suficiente, la muestra debe tener un volumen aproximado de 5 a 10 ml.

Si el enfermo tiene escasa secreción, la muestra no debe ser inferior al esputo obtenido de tres expectoraciones sucesivas, salvo justificadas excepciones.

Se recomienda analizar una o tres muestras de cada sintomático respiratorio. La primera muestra debe obtenerse en el momento de la consulta y la segunda al día siguiente, al despertar por la mañana. Sin embargo, puede ser necesario una tercera muestra obtenida al momento de entregar al laboratorio la segunda muestra.

Para el control del tratamiento examinar una muestra mensualmente mientras dure la terapia antituberculosa.

El envase para recolectar la muestra de esputo debe tener las siguientes características:

- Boca ancha (aproximadamente 5 cm. de diámetro) y 5 cm. de altura. Así, el paciente puede expectorar con facilidad dentro del envase y el laboratorista al momento de efectuar el examen directo puede extraer la partícula útil fácilmente.
- Tapa rosca: Para disminuir el riesgo de que la muestra se derrame durante el transporte y también para evitar la producción de aerosoles al abrirla en el laboratorio. No debe rotularse la tapa.
- Cuerpo del envase con pared lisa para favorecer su rotulación y la correcta identificación del envase.
- Material desechable, pues favorece su incineración y evita la reutilización. De no contar con envase desechable con las características referidas anteriormente, puede utilizar frascos de vidrio de boca ancha con tapa rosca; pero antes de desecharlos someterlos a esterilización en autoclave o incinerarlos. Debe evitarse la reutilización de los frascos.

Cuando el paciente no logra expectorar y es necesario el examen de esputo, puede inducirse la obtención de muestra de la siguiente forma:

Obtención Postural:

Acostar al paciente boca abajo sobre una camilla o cama, haciendo que su cabeza rebase el borde; colocar una almohada doblada debajo del tórax para lograr un plano inclinado que facilite el descenso de la secreción. El paciente coloca la base del tórax sobre la almohada, deja caer ambos brazos y la cabeza hacia el piso, de modo que la base tórax quede más alta que la boca.

Estando en la posición apropiada, se dice al paciente que inspire, retenga el aire y expire violentamente hasta conseguir la expectoración; el envase deberá estar sobre un recipiente o papel periódico en el piso. El ambiente donde se obtiene la muestra debe tener buena ventilación y debe prohibirse la presencia de otras personas con el paciente en el momento de la toma de muestra.

Nebulizaciones:

Se nebuliza en la garganta con agua destilada. Se recoge la primera expectoración producida después de la nebulización y se entrega otro envase al paciente para que recoja los esputos de las 24 horas siguientes.

Lavado bronquial:

Es un procedimiento invasivo y está reservado al médico especialista neumólogo; además de obtener muestras para baciloscopía es preciso cultivarlas.

También debe instruirse al paciente para que recoja la expectoración de las 24 horas siguientes al procedimiento.

Hisopado laringeo:

La toma de muestra debe estar reservada al especialista. Su proceso es obligatoriamente por cultivo, debido al escaso número de bacilos. Debe tomarse dos hisopados diarios en tres días consecutivos.

La muestra debe procesarse de inmediato y en caso contrario, conservar en refrigeración no más de 24 horas. El procedimiento puede estimular la expectoración, por lo que es necesario tener siempre a mano, un envase recolector. El personal que recoge la muestra debe adoptar las medidas de bioseguridad y las precauciones correspondientes.

MUESTRAS EXTRAPULMONARES:

Deben procesarse por cultivo, pues la escasa cantidad de bacilos así como la presencia de *Mycobacterias* saprofitas, hacen que la baciloscopía no sea concluyente.

Orina:

La muestra más recomendada es la muestra de orina obtenida en la primera micción de la mañana, previa higiene externa con agua y jabón. Es preferible recolectar entre 300-500 ml. en un envase limpio y estéril de boca ancha, que facilite la recolección directa.

La muestra debe ser procesada inmediatamente siempre por cultivo. Se sugiere cultivar por lo menos tres muestras seriadas.

Debe recordarse que la prueba de baciloscopía efectuado al sedimento urinario no necesariamente es diagnóstico concluyente de tuberculosis, por cuanto existe *Mycobacterias* saprofitas en orina, que pueden producir resultados falsos positivos en el examen de baciloscopía.

Jugo gástrico:

La recolección se hace por la mañana con el paciente en ayunas, utilizando una sonda nasogástrica por la que se aspira el jugo gástrico. Utilizar una jeringa de 20 a 50 ml. Vaciar la muestra en un envase limpio de 50 a 100 ml. de capacidad. Cultivar de inmediato o conservar en refrigeración no más de 6 horas. Mínimo debe tomarse 3 muestras. Su utilización es más frecuente en niños.

Líquido de serosas (pleura-peritoneo):

La muestra debe ser obtenida por el personal médico. El cultivo debe hacerse lo más rápido posible, así como el estudio baciloscópico. Debe procesarse todo el líquido extraído por aspirado en jeringas de 50 a 100 ml.

Líquido cefalorraquídeo:

La obtención de la muestra está reservada al personal médico. Obtenida la muestra en un volumen de aproximadamente 5 ml. ésta se dividirá en dos partes iguales, una de las cuales se centrifugará y cultivará inmediatamente, no precisando descontaminación previa. La segunda se conservará en refrigeración a 4 °C. Si la primera parte de la muestra está contaminada, la otra parte se siembra luego de su descontaminación. Si el volumen de la muestra es pequeño, se siembra toda la muestra. En todos los casos se hará baciloscopía del sedimento luego de centrifugar la muestra.

Biopsias:

Se utiliza un envase estéril. La muestra se divide en dos partes: Una parte se envía de inmediato al laboratorio para el cultivo y la otra se conserva o envía para el estudio histopatológico en un frasco con formol al 10%.

2. Preparación del extendido:

Antes de empezar el trabajo el personal encargado debe lavarse las manos y ponerse un guardapolvo de protección lo más largo posible. Luego cerciorarse que no le falte ningún reactivo ni material. Todas las fases de preparación del extendido deben ser completamente sistematizados, así como la conservación del orden de las muestras. Procesar las muestras por series, cada serie no debe ser mayor de doce muestras.

Al hacer el extendido cuidar que las láminas sean nuevas y hayan sido desengrasadas con alcohol; en lo posible no reutilizar las láminas positivas.

Las etapas de la preparación del extendido son las siguientes:

- Colocar sobre la mesa de trabajo una hoja doble de papel periódico o una bandeja de fierro enlozado o acero inoxidable (dimensiones recomendadas: 60x40x10 cm.) con papel periódico humedecido con fenol al 5%.
- Colocar los envases conteniendo las muestras de esputo previamente rotulados sobre la mesa de trabajo. De la misma forma colocar las láminas portaobjetos sobre el soporte de madera, en orden correlativo.
- Numerar los envases. Numerar las láminas portaobjetos empleando un lápiz graso, en forma correlativa. Deberá trazarse una línea en cada lámina portaobjeto empleando el lápiz graso, la que dividirá la superficie en una tercera parte destinada a la numeración y dos terceras partes para el extendido. Esta línea debe trazarse en la cara inferior de la lámina a fin de evitar que se borre la numeración al momento de efectuar la coloración.
- Destapar cuidadosamente el envase de la muestra que se va a procesar, manteniendo la boca del envase cerca del mechero encendido.
- Dividir un aplicador de madera (bajalengua) en dos o tres partes y tomarlo entre el pulgar y el índice de la mano, para luego seleccionar y extraer la partícula útil, que es

la porción muco-purulenta de color amarillento verdoso del esputo, enrollándola en el aplicador.

- Colocar la partícula útil sobre el portaobjeto y extenderla, haciendo movimientos de vaivén, hasta lograr que el extendido sea homogéneo (ni muy fino ni muy grueso), que no llegue a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla. Por ningún motivo debe calentarse la lámina mientras se haga el extendido, debido a que por el calor se forman círculos concéntricos y precipitados granulados.
- Pasar por la llama del mechero los bordes de la lámina extendida, colocar sobre el soporte de madera y dejar secar a temperatura ambiente.
- Terminado el extendido, descartar los aplicadores en el receptáculo de incineración, cerrar el envase y proseguir en igual forma para las demás muestras.
- Fijar cada lámina, una vez seca, mediante dos o tres pasajes rápidos sobre la llama del mechero con el extendido hacia arriba.

3. Coloración (Técnica de Ziehl Neelsen):

1. Colocar sobre el soporte de coloración la serie de láminas fijadas con el extendido hacia arriba, el número hacia el operador y la varilla próxima al operador ligeramente más alta que la otra.
2. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con el colorante fucsina básica fenicada, filtrada en el momento de efectuar la tinción. No use colorante sin filtrar.
3. Calentar suavemente con la llama del mechero de alcohol o un hisopo de algodón humedecido con alcohol hasta la emisión de vapores, repetir el proceso por tres veces, no debe hervir la preparación. Si el volumen del colorante disminuye por evaporación debe agregarse más hasta cubrir totalmente el extendido y dejar enfriar. El tiempo mínimo de coloración con fucsina es de 5 minutos.
4. Eliminar la fucsina tomando la lámina por el extremo numerado, entre el dedo pulgar y el índice o con una pinza, inclinándola hacia adelante y dejando caer agua corriente a baja presión sobre la parte que no tiene el extendido.
5. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con la solución de alcohol ácido durante dos minutos, hasta obtener una coloración rosa pálido. De ser necesario decolorar nuevamente, efectuando movimientos en vaivén de la lámina.

6. Una vez eliminado el alcohol ácido lavar nuevamente la lámina con agua a baja presión, cuidando de no desprender la película que formó el extendido.
7. Cubrir la superficie del extendido con el colorante azul de metileno, previamente filtrado, durante 30 segundos a un minuto.
8. Eliminar el azul de metileno y lavar cada lámina con agua a baja presión, por ambos lados.
9. Colocar las láminas coloreadas en orden numérico sobre el soporte de madera y dejar secar al medio ambiente.
10. Verificar la numeración de la lámina antes de su observación al microscopio.

4. Observación de la muestra coloreada:

La observación microscópica, tiene dos objetivos importantes:

- a. Determinar si en el extendido hay Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR).
- b. Establecer su número aproximado.

Para la observación se debe emplear un microscopio que esté en buenas condiciones y cuente con el objetivo de inmersión 100x y un ocular de 10x. Antes de usar el objetivo de 100x se debe colocar una gota de aceite de inmersión sobre el extendido.

Cada campo microscópico, se debe observar en superficie y en profundidad, para lo cual se utilizará permanentemente el tornillo micrométrico.

Los bacilos aparecerán como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo, generalmente con gránulos más coloreados en su interior, aislados, en parejas o en grupos sobre un fondo azul claro.

Es aconsejable seguir una pauta uniforme de observación, avanzando de izquierda a derecha del extendido y observando un mínimo de 100 campos útiles. Se considera campo microscópico útil aquel en el cual se observa elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células ciliadas). Los campos en que no aparezcan dichos elementos no deben contabilizarse en la lectura.

El observador irá tomando nota del número de bacilos observados y del número de campos microscópicos a observarse, que variará según la cantidad de bacilos que contenga la muestra.

Si en una lámina se encuentra sólo de 1 a 9 bacilos en 100 campos microscópicos observados, debe ampliarse la lectura a otros 100 campos más. Si persistiese el resultado, realizar otro extendido de la misma muestra e informar lo encontrado y solicitar nueva muestra.

Al término de la lectura retirar la lámina de la platina del microscopio, limpiar el aceite de inmersión de la lámina con tolueno y guardar la lámina.

5. Informe de resultados:

Se recomienda la siguiente escala semi cuantitativa:

- No se encuentran BAAR en 100 campos microscópicos observados.
- + Menos de un BAAR por campo en 100 campos observados (de 10 a 99 BAAR)
- ++ Uno a diez BAAR por campo, en 50 campos observados.
- +++ Más de diez BAAR por campo en 20 campos observados.

CUESTIONARIO

¿Cuáles son los síntomas de la tuberculosis?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cómo diagnosticaría que un paciente presenta tuberculosis?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Por qué realiza la coloración Ziehl y Neelsen?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cómo se llama el agente etiológico que causa la tuberculosis y cuáles son sus características morfológicas?

.....
.....
.....
.....

TÉCNICAS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN

OBJETIVOS:

- Conocer los diferentes métodos de desinfección y esterilización.
- Preparar correctamente el material a esterilizar en el horno y autoclave.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Tanto la esterilización como la desinfección son métodos para el control o eliminación de microorganismos. Con la Esterilización se consigue eliminar toda forma microbiana y la desinfección consigue eliminar sólo las formas vegetativas, no supone eliminación de formas de resistencia.

Sin embargo la Antisepsia es un tipo de desinfección que se da sobre tejidos vivos. El efecto de un agente antimicrobiano puede ser: Germicida si muere el microorganismo de forma irreversible o microbistático si se detiene el crecimiento de los microorganismos.

Con estas técnicas lo que se desea es dañar la pared celular (lisis) bacteriana. Esto da lugar a células llamadas protoplastos, que no soportan la presión osmótica del medio y se produce la lisis de las células, actuando o dañando la permeabilidad de la membrana celular, inhibiendo enzimas específicas, desnaturalizando proteínas o ácidos nucleicos.

Hay células más sensibles, dependiendo del tipo celular (la célula vegetativa es más sensible que en forma de spora) y del estado fisiológico de las células (son más sensibles a agentes que atacan el metabolismo cuando están creciendo, las células viejas son más sensibles a aquellos ; los ambientes ácidos dan mayor eficacia con un tratamiento por calor. A mayor concentración de hidratos de carbonos mayor resistencia térmica. A mayor concentración de materia orgánica, existe una mayor resistencia a agentes desinfectantes. Existen determinados compuestos que pueden ser microbistáticos a baja concentración y germicidas a una concentración mayor.

A. Agentes Físicos

Tienen gran influencia en la fisiología de los microorganismos y son la temperatura, la humedad, las radiaciones y agentes mecánicos.

Los sistemas enzimáticos de las bacterias tienen una temperatura ideal de funcionamiento y es la temperatura óptima.

a. Esterilización por medio de calor:

El efecto destructivo del calor sobre las bacterias está en íntima relación con el grado de humedad del ambiente, por lo que hay que distinguir entre la acción del calor húmedo y la del calor seco.

El calor se propaga por conducción, por convección y por radiación.

- Calor Húmedo:

Tiene un mayor efecto y más rápido sobre las bacterias, por que el agua es un buen conductor, por lo cual el calor penetra mejor y se distribuye más uniformemente. El calor húmedo se puede aplicar en forma de agua caliente o como vapor de agua. Destruye los microorganismos por coagulación y desnaturalización de las estructuras proteicas y enzimáticas.

Ebullición

El agua hirviendo a 100°C aplicada durante 10 a 40 min. Destruye todas las formas vegetativas de las bacterias. Se pueden esterilizar jeringas, guantes de jebe, sondas, ropa, etc.

El aparato más práctico es un hervidor metálico o a gas.

Pasteurización

Aplica el calor por 30 min. A 63 °C, consiguiendo la destrucción de todas las formas vegetativas a excepción de las termófilas. Se usa en el saneamiento de leche.

Tindalización o Calentamiento Intermitente

Consiste en someter el producto 3 días sucesivos a un calentamiento entre 56 y 100 °C (por lo general 65 °C) durante media hora, logrando destruir las formas vegetativas.

Este método es práctico para esterilizar sustancias orgánicas que sufren descomposición a altas temperaturas.

Vapor Fluente

Su acción es similar a la del agua a 100°C, se usa mucho en el laboratorio para esterilizar medios de cultivo que llevan sustancias que se pueden alterar a temperaturas superiores, por ejemplo determinados azúcares.

Se hace actuar sobre el material un chorro continuo de vapor de agua por 30 a 60 min.

Vapor a Presión

Con este método se alcanza altas temperaturas. Se puede usar ollas a presión o autoclave.

El mecanismo de acción del funcionamiento del autoclave se funda en la ebullición de agua a una presión superior a la normal y al subir la presión atmosférica aumenta la temperatura. En consecuencia si la presión del vapor en el recipiente cerrado aumenta, la temperatura también sube y así el vapor penetra por ósmosis a la célula, coagulando su citoplasma. Se destruyen las formas vegetativas y esporuladas en una sola operación.

- Calor Seco

Los sistemas de aplicación del calor seco para la destrucción de los microorganismos por una oxidación de los constituyentes esenciales son 3:

Flameado

Muy usado en el laboratorio para esterilizar el asa de siembra, las bocas de tubos y placas petri al realizar una siembra o transplante, material de disección previo baño de alcohol, etc.

Consiste en someter al material a la acción directa de la llama del mechero, sin que se altere ni sufra deterioro alguno.

Incineración

Procedimiento de esterilización ideal para aquellos productos contaminados que no importa su destrucción. Por este sistema se destruye apósitos, ropas cadáveres de animales, etc.

Calor seco por aire caliente

Tiene un menor efecto sobre microorganismos, por lo que necesita aplicarse durante mayor tiempo que el húmedo; se usa el horno Pasteur y estufas donde

se logra la esterilización en una 1h a 160 °C y 40 min. a 170 °C o 20 min. a 180 °C. El calor se inicia por conducción y se propaga por convección.

b. Esterilización por filtración

El mecanismo de filtración se debe al hecho de que los microorganismos por tener carga eléctrica negativa y los filtros positiva, quedan adsorbidos al actuar la presión o vacío.

Se pueden esterilizar medios de cultivo líquidos, suero sanguíneo, soluciones de albúmina, solución de antibióticos, que sufren alteraciones al ser sometidas al calor.

c. Esterilización por Humedad y Desección

El crear un ambiente hipotónico o hipertónico es usado para evitar la contaminación y desarrollo bacteriano en determinados alimentos, ejm: carnes saladas (10 – 15 %) o frutas azucaradas (50 – 70%).

Por la desecación se inhibe el desarrollo de las bacterias y puede producirse la muerte de un gran número de ellas quedando sólo las esporas y las más resistentes (estafilococos. *M. tuberculosis*, virus, quistes de protozoos y los huevos de parásitos).

La supervivencia de las bacterias dependerá del grado de humedad, pero también de otros factores, como temperatura, pH, oxígeno ambiental, naturaleza del medio, etc.

b. Esterilización por Radiaciones

Las radiaciones que tienen efectos sobre el crecimiento y desarrollo bacteriano son de 3 tipos:

- Radiaciones por Rayos Infrarrojos

Dentro de la radiación de la luz solar, los rayos infrarrojos tienen efecto más o menos directo sobre los microorganismos por su acción calorífica.

- Radiaciones por Rayos Ultravioletas (UV)

Su efecto sobre las bacterias depende, entre otros factores, de la longitud de onda, de la intensidad de radiación y de la distancia al foco. El mecanismo

de acción de las radiaciones UV es múltiple así, se une a las proteínas y bases púricas y pirimídicas alternándolas, por otra parte, produce ozono en contacto con el aire y este actúa sobre las bacterias ; y por último transforma en parte el agua en agua oxigenada.

Se usan radiaciones UV producidas por lámparas de mercurio en la preparación de vacunas bacterianas y víricas inactivadas, cabinas de siembra en laboratorios, envasado de antibióticos y potabilización de agua de mesa, etc.

- Radiaciones Ionizantes

Las radiaciones de mayor poder de penetración son los rayos X y radiaciones Y que tienen una energía muy superior a la UV, penetran a la bacteria y producen una ionización en los átomos de ésta produciendo una inactivación del genoma bacteriano y de las enzimas; y en consecuencia la muerte de la bacteria.

B. Agentes Químicos

La actividad sobre éstos es de dos tipos: Los agentes BACTERICIDAS, fungicidas o viricidas que destruyen las bacterias, hongos y virus y los BACTERIOSTÁTICOS, fungistátos o virustáticos que dificultan o inhiben su crecimiento (proceso reversible, cuando cesa la causa se multiplica de nuevo).

Toda sustancia a concentraciones mínimas tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento bacteriano y a mayores concentraciones es bacteriostático y a concentraciones más altas es bactericida (proceso irreversible).

Los principales agentes químicos que actúan sobre las bacterias pueden ser inorgánicos (ácidos y álcalis, sales minerales, oxidantes, etc) y orgánicos (alcoholes, fenoles, etc.)

Los métodos más importantes de esterilización son:

CALOR SECO:

- a. Flameado: es un procedimiento simple y eficaz, consiste en la exposición de un objeto a efecto de la llama hasta la incandescencia. Se esteriliza de esta forma, p. ej. asas de cultivo de siembra.

- b. Incineración: es el mejor sistema para esterilizar todas aquellos productos en los que no importe su destrucción, p. ej. material biológico
- c. Estufa: calor seco a alta temperatura, 20 minutos durante 180°, 60 minutos a 160°, siendo suficiente la esterilización durante 60 minutos a 100-140°, se utiliza para esterilizar material de vidrio debidamente envuelto en papel, metal. etc.

CALOR HUMEDO:

- a. Autoclave: horno a presión, consiste en una cámara en la que el aire puede ser sustituido por vapor de agua sometida a presión. Se opera a 121°C y 1 atm. de presión durante 20 minutos. De esta forma se consigue destruir todas las formas vegetativas y esporas. Se lo utiliza para esterilizar todo material resistente a esa temperatura y es muy utilizado para la esterilización de medios de cultivos
- b. Tindalización: (esterilización intermitente) consiste en someter el producto a calentamientos intermitentes entre 56 y 100°C durante 30 minutos con lo que se asegura destruir las formas vegetativas. En los intervalos se mantiene a temperatura ambiente o a 37°C, las esporas germinan y las bacterias resultantes se hacen más sensibles al calentamiento posterior.

PROCEDIMIENTO:

CALOR SECO:

1. Seleccionar material de vidrio que se usa frecuentemente en el trabajo de laboratorio (Placas petri, matraces, pipetas, tubos de ensayo, etc) y envolver de acuerdo a las indicaciones del profesor con papel Kraff.
2. Colocar en el horno a 180°C por 20 minutos. Enfriar y retirar.

CALOR HUMEDO:

1. Seleccionar el material que se va a colocar en el autoclave (medios de cultivo, placas petri, tubos de ensayo y material biológico de descarte, etc).
2. Envolver y adecuar el material seleccionado en recipientes y colocar en la canastilla.
3. Colocar la canastilla en el autoclave y autoclavar a 121°C por 15 minutos a 1 atm. De presión.

CUESTIONARIO

Explique como funciona el autoclave

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Cuál es el objetivo de esterilizar el material de vidrio en el Horno?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Cómo actúan los desinfectantes?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

¿Cuál es la diferencia entre esterilización y desinfección?

.....

.....

.....

.....

MEDIOS DE CULTIVO

OBJETIVOS:

- Preparar correctamente medios de cultivo sólidos, líquidos y semisólidos.
- Utilizar correctamente los medios de cultivo en el diagnóstico de diferentes enfermedades.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los medios de cultivo son sustancias nutritivas estériles, líquidos, sólidos o semisólidos, que se utilizan en el laboratorio para el crecimiento de los microorganismos, pudiendo ser similares a sustratos naturales, en los cuales estos crecen normalmente. Sus componentes básicos deben satisfacer las mínimas exigencias nutricionales para el desarrollo microbiano y varían según el tipo de bacteria.

Los medios de cultivo incluyen agua, nutrientes como fuentes de Nitrógeno, de carbono y energía y en ciertos casos factores de crecimiento. Se consideran además para el crecimiento necesidades de O₂ (aerobios), CO₂ parcial o total (microaerófilos o anaeróbicos) y condiciones óptimas de pH y temperaturas de incubación.

Los medios de cultivo pueden tener como finalidad: Aislamiento de gérmenes, identificación, conservación, clasificación, obtención de toxinas, recolección o cosecha para preparación de vacunas, etc.

La mayoría de los medios empleados para el desarrollo inicial y aislamiento de microorganismos heterotróficos, son ricos en componentes proteicos derivados de carnes de animales, corazón, cerebro, caseína, fibrina, soya, por digestión con enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina). Estos derivados son principalmente péptidos, peptonas, proteosas, aminoácidos, sales inorgánicas como fosfatos y trazas de Potasio y Magnesio que los microorganismos lo utilizan como compuestos parcialmente degradados, al ser incapaces la mayoría de hidrolizar proteínas completas.

Los extractos de carne son nutrientes básicos de muchos medios de cultivo, a los cuales suelen añadirse carbohidratos y sales inorgánicas, para constituir medios basales. Contienen los productos de degradación proteica: gelatina, peptonas, proteosas, aminoácidos y otras fuentes

de nitrógeno como creatinina, purina y glutatión. También contiene sales minerales, factores de crecimiento (tiamina, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico y colina) y algunos carbohidratos.

Los medios de cultivo pueden clasificarse:

a. De acuerdo a su naturaleza

- De origen animal.
- De origen vegetal (orgánicos).
- De origen mineral (inorgánicos).

b. Según su composición y objetivos

1. Medios Comunes:

Son aquellos que tienen los mínimos requerimientos nutricionales para organismos heterotróficos no exigentes.

Además, según su aspecto físico estos medios comunes pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos.

Medios Líquidos: Caldo nutritivo, caldo peptonado, caldo triptosa, caldo de carne, otros.

Medios Sólidos: Nutrientes compuestos de un medio líquido base, al que se le agrega sustancias orgánicas de poco o nulo valor nutritivo como el agar o gelatina para dar al medio consistencia de gel. Ejm: Agar nutritivo, agar peptonado, agar almidón, medio de gelatina y otros.

Medios Semisólidos: Compuesto por cualquiera de los medios líquidos antes mencionados, a los que se les adiciona una concentración de agar suficiente para obtener un estado de gel blando (0.75%).

2. Medios Enriquecidos o Suplementado:

Preparados para reunir los requerimientos nutricionales de bacterias más exigentes. Se componen de un medio basal ordinario suplementados con factores de crecimiento como sangre, suero sanguíneo, líquido ascítico, líquido pleural, vitaminas, extracto de levadura, bases nitrogenadas, carbohidratos y sales minerales.

Medios Líquidos: Caldo Cerebro Corazón(BIH), caldo extracto de levadura (CL), caldo suero, caldo ascítico, caldo tripticasa soya, etc.

Medios Sólidos: Agar cerebro corazón, agar extracto de levadura, agar sangre, agar chocolate, suero coagulado de Löefler y otros.

3. Medios Sintéticos Definidos o Químicamente Definidos:

Preparados exclusivamente de sustancias químicas.

Medios sintéticos simples: Contienen carbono como fuente de energía (glucosa o lactosa); una fuente inorgánica de nitrógeno; fosfato o sulfato y varias otras sales inorgánicas; sustancia tampón y agentes quelantes como el citrato.

Medios sintéticos complejos: Incorporan aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros factores de crecimiento, para cepas exigentes.

4. Medios Especiales:

Son aquellos que además de contener los requerimientos nutricionales básicos, llevan en su composición sustancias inhibitoras con carácter selectivo y compuestos específicos o indicadores para poner de manifiesto los principales caracteres bioquímicos esenciales para el diagnóstico específico.

Entre las sustancias inhibitoras, los medios pueden contener sales biliares, antibióticos, colorantes u otros; que pueden afectar el metabolismo o sistema enzimático con carácter de selección. Comprenden:

a) Medios de enriquecimiento.

Son los que favorecen el crecimiento de uno o un grupo de microorganismos en particular, e inhiben en lo posible a otros de la flora microflora acompañante. Ejm: Agua peptonada alcalina para *Vibrio parahemolyticus*, caldo selenito de Leifson, caldo tetracionato de Kauffman (entéricos patógenos), medio Lowenstein Jensen (TBC), etc.

b) Medios selectivos.

Son los que favorecen el aislamiento de un determinado grupo de microorganismos mediante la obtención de colonias (cepas puras). Todos son utilizados en condiciones sólidas. Ejm: Agar Staphylococcus (para el aislamiento de estafilococos patógenos); agar citrimide (aislamiento de *Pseudomonas*); agar Mac Conkey, agar EMB, agar en ENDO (medios moderadamente selectivos para aislamiento de coliformes y entéricos patógenos), Agar SS (Salmonella – Shigella), Agar verde brillante.

c) Medios Diferenciales.

Estos medios son empleados para detectar reacciones bioquímicas, con carácter diferencial de grupos de géneros o especies microbianas. Para algunos en un

solo medio diferencial se pueden interpretar dos o más pruebas bioquímicas.
Ejm: TSI (Triple Sugar Iron), LIA (Lisina Iron Agar), KIA (Kliger Iron Agar).

PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar las sustancias indicadas en las formulas respectivas, calculando las cantidades en relación con los volúmenes requeridos.
- 2) Disolverlas en la cantidad de agua destilada necesaria llevando a ebullición.
- 3) Enfriar moderadamente y ajustar el pH entre 6.8 y 7.4 u otro que fuere indicado.
- 4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- 5) Repartir: Los medios líquidos se reparten en tubos en ambiente estéril y siempre frente a una llama (mechero Bunsen o alcohol). En el caso de los medios sólidos se le dará antes que enfríen o solidifiquen la inclinación que deben tomar antes de ser empleados; la finalidad de esta inclinación es la de conseguir una mayor superficie de siembra.
Otra modalidad consiste en repartir el medio en los tubos y esterilizar después, es decir, invertir el orden señalado en las indicaciones 4 y 5.
También es usual esterilizar en frascos grandes y almacenar. En este caso, el reparto en tubos y placas petri se hace cuando el medio se va a utilizar. Tratándose de medios sólidos se procede a licuarlos previamente.
- 6) Comprobar la esterilidad en una estufa a 37 °C durante 24 horas.

A final el medio queda listo para su empleo y se almacenará de preferencia en la nevera. También pueden almacenarse al ambiente. Es recomendable guardar los medios preparados en bolsas herméticamente cerradas para evitar un deterioro muy rápido por desecación.



CUESTIONARIO

Defina que es un medio de cultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cuál es la finalidad de utilizar los medios de cultivo?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Mencione algunos ejemplos de medios de cultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Esquematice el procedimiento de la preparación de los medios de cultivo:

UROCULTIVO

OBJETIVOS:

- Realizar eficientemente el procedimiento indicado para la realización de un urocultivo.
- Interpretar correctamente los resultados obtenidos del urocultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La infección urinaria (IU) es una de las infecciones más frecuentes, que puede afectar tanto a pacientes internados, como ambulatorios.

Esta patología se presenta en niños y adultos, alcanzando su mayor prevalencia en las mujeres, aunque aumenta su incidencia en hombres mayores de 45 años y en cualquier enfermo con factores urológicos predisponentes. En pediatría, la IU tiene una connotación muy especial, puesto que es un factor desencadenante de cicatrices renales que pueden conducir a insuficiencia renal. El riesgo de formación de dichas cicatrices en niños con tracto urinario estructuralmente normal tiene que ver con:

- i. El primer episodio de pielonefritis antes de los 3 años;
- ii. Reflujo vesicoureteral de grados IV o V, conjuntamente con bacteriuria
- iii. Retardo en la instauración de la antibiòticoterapia después de establecida la pielonefritis.

Por lo tanto, el subdiagnóstico o la demora en el diagnóstico de una IU en un niño puede ser determinante del futuro de su función renal. Por otra parte, el sobrediagnóstico induce a la utilización de procedimientos diagnósticos invasivos, como la cistouretrografía. Dentro de este contexto, se debe evitar pasar por alto la documentación de una IU, sin que esto signifique "fabricar" esta patología mediante la interpretación errònea de un cultivo contaminado.

El urocultivo determina si existe una infección de las vías urinarias (IU), en esta prueba se investiga la presencia de bacterias en orina, su cantidad, especie, y sensibilidad a los antibiòticos. Es necesaria para instaurar un tratamiento adecuado, evitando la administración de antibiòticos cuando no es necesario, y administrando el correcto cuando corresponde.

El urocultivo se recomienda cuando los síntomas indican una posible infección urinaria como: dolor y sensación de calor al orinar, así como urgencia frecuente de orinar; también cuando un paciente esta canalizado por largo tiempo, aunque no muestre síntomas de infección y en mujeres embarazadas para monitorear cualquier bacteria en la orina que pueda causar algún problema al bebé.

Algunos microorganismos responsables de infecciones urinarias:

- *Staphylococcus saprophyticus* es el segundo microorganismo causante de IU en mujeres jóvenes. El microbiólogo debe estar alerta para no descartarlo como contaminante cuando se encuentra en recuentos bajos, ya que si no se identifica a nivel de especie puede confundirse con cualquiera de las otras especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativa contaminantes de piel. *S. saprophyticus* es resistente a la novobiocina. Si bien existen varias especies de estafilococos con estas características, ellas son infrecuentemente aisladas de materiales clínicos, especialmente de orina. Ellas se diferencian de *S. saprophyticus* por las pruebas de ureasa, fermentación de xilosa y sacarosa. *S. saprophyticus* es xilosa (Ü), sacarosa (+) y ureasa (+).

- *Proteus mirabilis* puede ser tan frecuente como *E. coli* en niños mayores. En hombres adultos también aumenta su prevalencia y se asocia a complicaciones urolitiásicas debido a su capacidad de hidrolizar la urea, aumentando el pH y favoreciendo así, la formación de cálculos de estruvita y apatita. Por otra parte, existen evidencias de su capacidad de colonizar el tracto urinario y la superficie de los catéteres mediante su propiedad conocida como "swarming".

- *Klebsiella pneumoniae* suele ser más prevalente en las recurrencias que en los primeros episodios de IU.

- *Providencia spp.* y *Morganella morganii* se aíslan frecuentemente de pacientes con sonda de larga permanencia y con tratamiento antibiótico previo.

- *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella spp.* se aíslan frecuentemente de pacientes internados, sondados, o con algún otro factor urológico predisponente, como insuficiencia o trasplante renal, o enfermos sometidos a instrumentación del tracto urinario.

- Los *enterococos* se aíslan de pacientes internados, de pacientes ambulatorios mayores de 60 años (sobre todo hombres), de pacientes con trasplante renal y en el 10% de niños con una patología de base predisponente.

- *Haemophilus spp.* ha sido aislado ocasionalmente de hombres adultos y algunos niños con alteraciones de las vías urinarias.

- *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* y *Ureaplasma urealyticum* han sido identificados como agentes etiológicos de IU en ambos sexos, pero con mayor prevalencia en mujeres embarazadas. Sin embargo, es necesario aclarar que *G. vaginalis* y *U. urealyticum* suelen encontrarse en recuentos bajos, tal como lo demuestran los estudios realizados por Fairley y col. con muestras obtenidas por punción suprapúbica.

- *Corynebacterium urealyticum* es un reconocido patógeno del tracto urinario, que debido a su intensa actividad ureásica, es capaz de alcalinizar rápidamente la orina produciendo la precipitación de cristales de fosfato amónico magnésico, con posterior formación de cálculos y su eventual incrustación en la vejiga. Aunque este hecho ocurre generalmente en pacientes mayores de 65 años, se ha observado también en adultos jóvenes y aún en niños con anomalías del tracto urinario. *C. urealyticum* es una bacteria de desarrollo lento (48-72h), cuya morfología responde a las características generales del género, aunque a veces adopta formas cocoides. Es ureasa-positiva (a los pocos minutos de incubación) y glucosa-negativa. Es característica su multiresistencia a los antimicrobianos.

- Las levaduras pueden existir como saprófitas en genitales externos y zona periuretral. No obstante, su presencia en la orina, independientemente del recuento, siempre requiere una minuciosa evaluación clínico-microbiológica para determinar su significación clínica. Las levaduras son frecuentes en IU hospitalaria, principalmente en enfermos sondados, en pacientes diabéticos y en personas que reciben antibióticos o drogas inmunosupresoras. *Candida albicans* es la especie más frecuentemente aislada, pero otras especies de *Candida* y otras levaduras han sido descritas.

PROCEDIMIENTO

1. Llenar un formulario consignando los siguientes datos (necesarios para la interpretación del urocultivo):

Del Paciente:

- Edad.
- Sexo.
- Síntomas
- Factor predisponente.
- Antecedentes de infección urinaria.
- Medicación actual o previa (antibiótico)

De la muestra:

- Tipo:
- Chorro medio (retención)
- Punción suprapúbica.
- Sonda
- Conservación:

2. Recolección de la muestra:

- Se recomienda no ingerir líquidos en exceso las 5 o 6 horas previas a la obtención de la muestra
- Previa retención de orina por tres horas aproximadamente, higienizarse con agua y jabón.
- Se descarta el primer chorro miccional y se recoge el CHORRO MEDIO en frasco estéril.
- Conservar en heladera hasta su remisión al laboratorio.
- En niños no usar bolsa recolectora.
- El paciente debe estar sin tratamiento antibiótico al menos 48 horas antes.

3. Observación microscópica del sedimento.

- Recolectada la muestra centrifugar en un tubo de ensayo estéril.
- Colocar una gota del sedimento en una lámina porta objeto y cubrir la muestra con una laminilla.
- Observar al microscopio con objetivo de 40X

4. Observación microscópica de la coloración Gram:

- De la muestra (orina sin centrifugar), realizar una coloración GRAM.

- A la lámina coloreada y seca agregar una gota de aceite de inmersión.
- Observar al microscopio con objetivo de 100X

Los procedimientos 3 y 4 nos ofrecen la ventaja de cultivar el microorganismo en el medio más apropiado, tanto para su desarrollo, como para su caracterización macroscópica (aspecto de la colonia, fermentación de lactosa, tipo de hemólisis, etc), por lo que posibilita orientar con mayor certeza el esquema inicial de identificación. La desventaja es que demanda más tiempo que la siembra "a ciegas".

5. Siembra:

- Sembrar la muestra (orina sin centrifugar) en una placa petri conteniendo agar Mac Conkey, mediante la técnica de estría.
- Incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
- Realizar las pruebas bioquímicas en medios de cultivo TSI, LIA, Citrato, etc.; mediante la técnica de puntura.
- Luego realizar el antibiograma.

Valores normales

- Menos 10,000 U.F.C/ml se considera contaminación
- Entre 10,000 y 100,000 U.F.C/ml se considera sospecha de infección
- Mayor a 100,000 U.F.C/ml se considera infección.

*U.F.C. Unidades Formadoras de Colonias.

CUESTIONARIO

Mencione que criterios considero para recolectar la muestra de orina para la realización del urocultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Defina que es un urocultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cuál es la finalidad de realizar un urocultivo?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

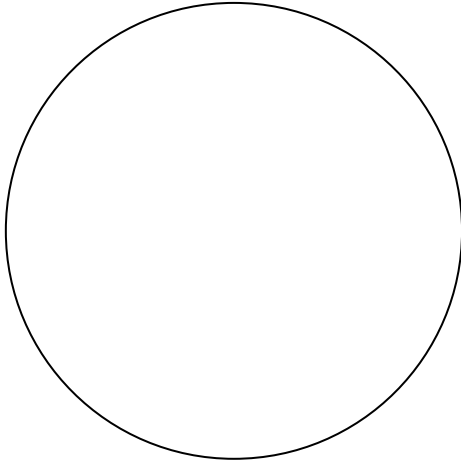
Considera usted que la orina que recolecto provenía de un paciente con infección de vías urinarias. ¿Por qué?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

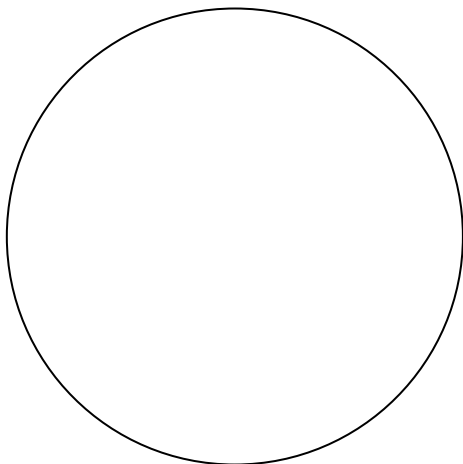
DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.

SEDIMENTO URINARIO



COLORACIÓN GRAM



MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

DIBUJE LOS RESULTADOS DE:

SIEMBRA DE LA MUESTRA (Escriba la interpretación al costado derecho del dibujo):

PRUEBAS BIOQUÍMICAS (Escriba la interpretación al costado derecho del dibujo):

Esquematice el procedimiento de la realización de un urocultivo:

COPROCULTIVO

OBJETIVOS:

- Realizar eficientemente el procedimiento indicado para la realización de un coprocultivo.
- Interpretar correctamente los resultados obtenidos del coprocultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El coprocultivo o examen coproparasitoscópico consiste en el cultivo de materia fecal. Es un método de diagnóstico microbiológico que permite identificar diferentes organismos causantes de enfermedades gastrointestinales.

Es indicado para el diagnóstico de ciertas afecciones del aparato gastrointestinal, especialmente aquellas infecciones provocadas por bacterias. Se utiliza para estudiar casos de diarrea severa, persistente o recurrente sin causas conocidas, y en caso de diarreas asociadas al consumo de antibióticos.

Nos podemos infectar bebiendo agua contaminada, consumiendo verduras frescas mal lavadas, consumiendo alimentos contaminados en lugares de poca higiene, comiendo con las manos sucias, etc. Cuando los parásitos se alojan en el aparato digestivo, una proporción de ellos, o las larvas, o los huevos, estos son eliminados con las heces. Como la cantidad que se elimina en cada defecación puede ser variable, y si hay poco número de parásitos en el intestino, lógicamente también serán escasos en las muestras que se tomen, no siempre que una muestra sale negativa se puede descartar la infección. Por eso, normalmente se toman tres muestras de heces, en tres días distintos. De esta forma se confirma la infección.

La materia fecal para coprocultivo debe estar libre de contaminantes como orina o papel higiénico. Se puede obtener la muestra recogiendo las heces en una bolsa plástica adosada a la taza del inodoro o utilizando equipos de recolección comerciales. En caso de bebés se puede adosar la bolsa al pañal. Una vez obtenida la muestra se debe colocarla en un recipiente estéril y derivarla al laboratorio lo más rápido posible.

El personal médico realizará una siembra de heces sobre una placa petri que contiene un medio de crecimiento. Se vigila el crecimiento, y en caso de existir microorganismos se identifica mediante microscopía o empleo de tinciones específicas.

Por lo general, se realizan los siguientes exámenes para complementar el cultivo:

- Tinción de Gram en heces
- Frotis fecal y examen de huevos y parásitos.

PROCEDIMIENTO

1. Recolección de muestra:

Niños: Se recoge una muestra de una sola deposición con un hisopo estéril y se introduce en un frasco de las mismas condiciones. Una vez recogida la muestra se mantiene a temperatura ambiente hasta el momento de entregarla al laboratorio. En el laboratorio pueden realizar este procedimiento en bebés o niños muy pequeños.

Adultos: Se recoge la muestra de una sola deposición en un **frasco estéril**. Una vez recogida la muestra, se mantiene a temperatura ambiente hasta el momento de entregarla. Una cantidad aproximada de 2 cucharadas es suficiente para realizar el estudio.

2. Observación microscópica:

- De la muestra realizar un preparado en fresco y observar al microscopio con objetivo de 40X.
- Realizar con la muestra una coloración Gram y observar a 100X

3. Siembra:

- Sembrar la muestra (heces) en una placa petri conteniendo agar Mac Conkey y Agar Salmonella-Shiguelia (SS agar), mediante la técnica de estría.
- Incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
- Realizar las pruebas bioquímicas en medios de cultivo TSI, LIA, Citrato, etc.; mediante la técnica de puntura.
- Luego realizar el antibiograma

CUESTIONARIO

Mencione que criterios considero para recolectar la muestra de heces para la realización del coprocultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Defina que es un coprocultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cuál es la finalidad de realizar un coprocultivo?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Considera usted que la muestra de heces que recolecto provenía de un paciente con infección gastrointestinal. ¿Por qué?

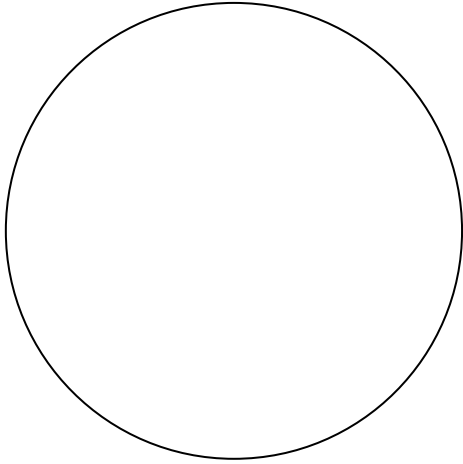
.....
.....
.....
.....
.....
.....

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

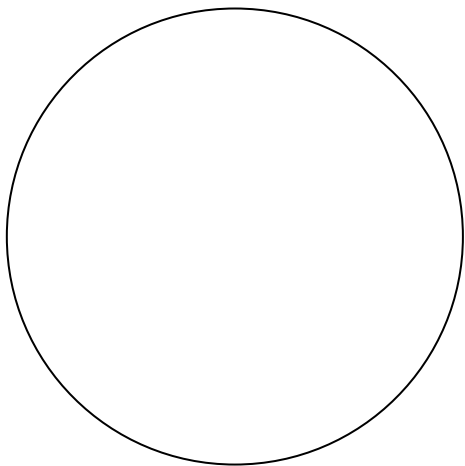
DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.

EXAMEN DIRECTO (Preparado en fresco)



COLORACIÓN GRAM



MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

DIBUJE LOS RESULTADOS DE:

SIEMBRA DE LA MUESTRA (Escriba la interpretación al costado derecho del dibujo):

PRUEBAS BIOQUÍMICAS (Escriba la interpretación al costado derecho del dibujo):

Esquematice el procedimiento de la realización de un coprocultivo:

HEMOCULTIVO

OBJETIVOS:

- Realizar eficientemente el procedimiento indicado para la realización de un hemocultivo.
- Interpretar correctamente los resultados obtenidos del hemocultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Un hemocultivo es un cultivo microbiológico de la sangre. Es un método diagnóstico en medicina empleado para detectar infecciones que se transmiten a través de torrente sanguíneo bacteriemia o septicemias.

Cualquier infección que esté causando fiebre puede llevar a los médicos del hospital a pedir un hemocultivo; al identificar al agente que causa el problema, podrán decir con más exactitud los antibióticos que se deberán usar, así como también, lo que podría estar causando el estado del paciente.

Es importante extraer al menos dos muestras para cultivo en dos lugares distintos, Si en uno se aíslan bacterias y en otro no, puede admitirse sin riesgo que la bacteria encontrada en el primer cultivo es un contaminante y no un agente infeccioso. Cuando en ambos cultivos se aísla el mismo agente infeccioso, la bacteriemia existe y se debe al microorganismo que se encuentra en ambos cultivos.

Los hemocultivos se pueden clasificar según el tipo de paciente, pues los microorganismos son distintos según si se trata de un paciente inmunosuprimido o inmunocompetente, también si se trata de pacientes adultos o pediátricos o si se trata de enfermos que estén o no bajo terapia antimicrobiana.

Según la toma de la muestra pueden ser hemocultivos periféricos o centrales (obtenidos a través de un catéter venoso central). También pueden clasificarse según el tipo de microorganismos que se esté investigando, ya que se requieren distintos sistemas de hemocultivos según si se sospechan bacterias aeróbicas, anaeróbicas, micobacterias u hongos.

Por último, se pueden clasificar según la metodología de los distintos sistemas de hemocultivos en métodos convencionales (manuales), en sistemas semiautomatizados como el

sistema Lisis-centrifugación o en sistemas automatizados como BACTEC, BacT/Alert, Septichek, etc.

PROCEDIMIENTO

1. Obtener la muestra por punción venosa previa asepsia de la piel con yodo y alcohol y en presencia de un mechero encendido.
2. Tomar unos 10 ml. de sangre que se vierten en el frasco de hemocultivo conteniendo unos 100 ml. de caldo ICC con anticoagulante Polianetol Sulfonato Sódico, en proporción de 0.5 por 100 ml. (excepto cuando se quiere aislar meningococo o gonococo por que los inhibe); además el frasco puede contener un medio inclinado como agar tripticasa soya.
3. El frasco se incuba 2 semanas a 35°C, observándose diariamente buscando la presencia de hemólisis, turbidez, gas o desarrollo de colonias que nos indique crecimiento bacteriano, entonces se realiza una coloración Gram para proseguir con la respectiva identificación y por último el antibiograma.



Medios de cultivo comerciales para hemocultivo

CUESTIONARIO

Mencione que criterios consideraría ud. para recolectar la muestra de sangre para la realización de un hemocultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Defina que es un hemocultivo

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cuál es la finalidad de realizar un hemocultivo?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿En que casos considera usted que el médico debe solicitar la realización de un hemocultivo?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

RECuento DE MICROORGANISMOS EN UNA MUESTRA

OBJETIVOS:

- Determinar el número de bacterias presentes en muestras biológicas mediante la Técnica de Recuento en Placa.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El método de recuento en placa para determinar el número de bacterias de una muestra se basa en la presunción de que cada célula bacteriana puede crecer en un medio de cultivo sólido formando colonias.

De acuerdo a este criterio el número de colonias desarrolladas en un medio de cultivo sólido puede corresponder al número de células bacterianas viables presentes en una cantidad determinada de muestra que haya sido inoculada.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar y/o diluir la muestra biológica por la técnica adecuada.
2. Pipetear por duplicado a las placas estériles alícuotas de 0.1 ml a partir de la dilución 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y sembrar mediante la técnica de incorporación. Se sugiere esta serie de diluciones si no se conoce el rango aproximado del número de bacterias.
3. Agregar rápidamente a las placas petri 15 ml de agar Plate Count o agar nutritivo, licuado y temperado. Entre la preparación y la adición del agar no debe transcurrir más de 10 minutos.
4. Mezclar inmediatamente las alícuotas con el agar mediante movimientos de vaivén y rotación de las placas petri se pueden seguir los siguientes pasos:
 - a) Mover la placa de arriba a bajo cinco veces en una dirección.
 - b) Rotar cinco veces la placa en sentido de las agujas del reloj.
 - c) Mover la placa cinco veces en la dirección que haga ángulo recto al usado en el primer tiempo.
 - d) Rotar cinco veces la placa en sentido inverso al de las agujas del reloj.
5. Una vez solidificado el agar, invertir las placas e incubarlas a 37°C durante 24 a 48 horas.

6. Cómputo del recuento estándar en placa:

- a) Seleccionar 2 placas correspondientes a una dilución que contenga entre 30 y 300 colonias utilizando un contador de colonias.
- b) Tomar la media aritmética de los recuentos y multiplicar por el factor de la dilución (recíproco de la dilución usada). Reportar el resultado como número de microorganismos aerobios mesófilos (Unidades Formadoras de Colonia) por gramo o mililitro según sea el caso.
- c) Si las placas de dos diluciones consecutivas presentan recuentos menores que 30 y mayores que 300, tomar el promedio de los dos recuentos.
- d) Si el número de colonias de las placas de dos diluciones consecutivas están dentro del rango de 30-300, computar el recuento para cada una de las diluciones y establecer la relación de los dos recuentos.
- e) Si el cociente es menor que 2, reportar el promedio de los dos valores; pero si el recuento mayor contiene 2 veces o más al menor, en este caso se reportará el recuento menor.

7. Computo del estimado del Recuento Standard en Placa.

- a) Si las placas de todas las diluciones muestran más de 300 colonias, dividir cada duplicado de placas de la dilución más alta en secciones radiales convenientes (2, 4, 8) y contar todas las colonias en una o más secciones. Multiplicar el total en cada caso por el factor apropiado para obtener el número de colonias por toda la placa. Promediar los estimados de las 2 placas duplicadas y multiplicar por la dilución correspondiente. Reportar el resultado como un estimado del número.
- b) Si hubiese más de 200 colonias por 1/8 de sección de la placa, multiplicar 1,600 (200x8) por la dilución y expresar el estimado como mayor que (\succ) el N° resultante. Ejemplo $1600 \times 10^3 = \succ 1600,000$ UFC/g o ml.
- c) Si no hubiese colonias en placa de la mayor concentración, reportar el estimado como menor que (\prec) y una vez la dilución.

Ejemplo: $10^{-1} = 0$ colonias. Se reporta como $\prec 10$ UFC/g o ml.

Si se hubiese sembrado 0.1 ml en este mismo caso se reporta $\prec 100$ /g o ml.

8. Expresión de Resultados

- a) Se deberá reportar únicamente 2 dígitos significativos, ellos son el primero y el segundo (comenzando por la izquierda) del promedio de los recuentos. Los demás dígitos se reemplazarán por ceros. Ejemplo: 523,000 se reportará como 520,000= 52×10^4 g o ml de alimento según sea el caso. Si el tercer dígito de la izquierda es 5 o mayor que 5, adicionar una unidad al segundo dígito (redondear). Ejemplo 83,600 se reportará como 84,000= 84×10^3 UFC/ g o ml de muestra.

CUESTIONARIO

¿Cuál es la finalidad de realizar un recuento de microorganismos en una muestra?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué medios y/o materiales necesita para realizar recuentos microbianos?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

El crecimiento bacteriano en dos placas petri fue 245 y 297, respectivamente. Si la dilución utilizada fue 10^{-2} y la técnica de siembra por incorporación. Explique como calcularía el número de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro.

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Esquematice el procedimiento para el recuento de microorganismos de una muestra.

ANTIBIOGRAMA

OBJETIVOS:

- Realizar correctamente el antibiograma a partir de muestras patológicas e interpretar los resultados en función de los halos de inhibición.

FUNDAMENTO TEORICO

En la medicina los quimioterápicos y antibióticos, se emplean para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, sin embargo el uso indebido y prolongado produce alteraciones a nivel del organismo vivo, así como también puede generar resistencia del microorganismo a éstos.

El antibiograma hoy en día forma parte del estudio bacteriológico de los gérmenes y permite seleccionar uno o varios antibióticos adecuados en la terapia específica de infecciones bacterianas.

Los métodos usados en la determinación de la sensibilidad in vitro de las bacterias a los diferentes antibióticos, pueden ser clasificados en: Métodos de dilución y métodos de difusión.

Método de Dilución: En la que la sensibilidades medida por la inhibición del crecimiento de los microorganismos en una serie de tubos con medio de cultivo líquido o placas con medio sólido y concentraciones crecientes de antibióticos.

Método de Difusión: En medio sólido en el que la sensibilidad es medida por los halos de inhibición que se obtienen alrededor de los discos de papel absorbente o cilindros que contienen cantidades conocidas de un antibiótico. Siendo este método una manera práctica, fácil y rápida de realizar un antibiograma.

PROCEDIMIENTO

1. Sumergir la torunda en el caldo tripticasa soya que contiene *Escherichia coli* y extender uniformemente en la superficie de la placa de agar Mueller Hinton.
2. Colocar con ayuda de pinzas los discos impregnados con los diferentes antibióticos y quimioterápicos sobre la superficie del agar.

3. Los discos deben de quedar a una distancia de 20 mm. entre ellos.
4. Incubar a 37°C durante 24 horas.

LECTURA E INTERPRETACIÓN:

1. El diámetro de las zonas de inhibición se miden con una regla milimetrada, colocada debajo de la placa petri.
2. El límite del área de inhibición, está dado por la inhibición completa del desarrollo tal como se puede apreciar a simple vista.
3. Se hace excepción en el caso de las sulfas, donde se puede producir un desarrollo discreto de aspecto granular fino, en estos casos el límite estaría dado por las zonas de crecimiento grueso.
4. Los milímetros de la lectura serán llevados a la tabla para traducir su interpretación a los términos: SUSCEPTIBLE, INTERMEDIO Y RESISTENTE.

CUESTIONARIO

¿Cuál es la finalidad de realizar un antibiograma?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Mencione algunos antibióticos que se pueden utilizar en un antibiograma

.....
.....
.....
.....

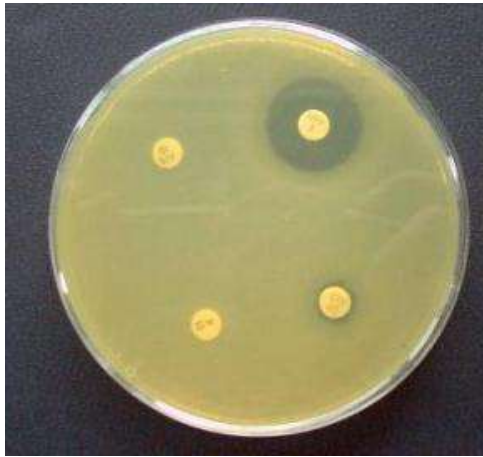
¿Qué medios y/o materiales necesita para realizar un antibiograma?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué significa un halo de inhibición en la placa de agar Muller Hinton donde realizo su antibiograma?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Esquematice el procedimiento de la realización del antibiograma realizado en la práctica:



A



B

Explique como interpretaría las placas antes mostradas:

A.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

B.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

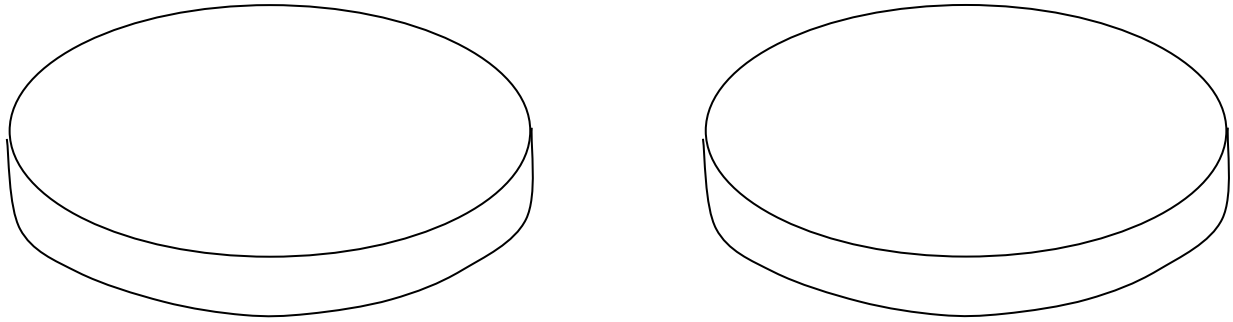
.....

.....

.....

.....

Dibuje los resultados del antibiograma realizado en práctica.



Explique lo anteriormente dibujado

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HONGOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

OBJETIVO:

- Recolectar correctamente muestras de hongos de importancia médica a partir de pacientes con diferentes micosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El término hongo procede del latín *Fungus*, que significa hongo. Estos seres han sido considerados tradicionalmente más próximos a las plantas que a otros seres vivos, debido a su similitud en la composición química y estructura ultramicroscópica, aunque en la actualidad se sabe que son grupos diferentes.

Los hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza abundando en el suelo, vegetación, en materia existente en el agua y en general en cualquier ambiente húmedo.

Son en su mayoría muy beneficiosos para el hombre ya que se encargan de destruir la materia orgánica compleja degradándola a formas químicas simples que pasan a formar parte del suelo, donde finalmente son absorbidas por otras generaciones de plantas, encargándose en gran medida de la fertilidad del suelo.

De los hongos también se pueden obtener ciertos alimentos como quesos, yogures, pan, bebidas alcohólicas como la cerveza, vino, etc., así como la producción de ciertos antibióticos, vitaminas, ácido cítrico, etc.

Desde el punto de vista clínico, el grupo más importante para el hombre va a corresponder a aquellos que crecen como parásitos en este, produciendo infecciones llamadas MICOSIS, que pueden ser tipo superficial, cutáneo, subcutáneo, sistémico o micosis oportunistas.

Las micosis superficiales pueden afectar al cuero cabelludo, barba, bigote, tronco, cuello, cara y brazos mientras que las micosis cutáneas afectan el pelo de la barba, pelo del cuero cabelludo, partes lampiñas de la piel, ingle, nalgas, pies y uñas.

Las micosis subcutáneas generalmente afectan piernas, pies y las micosis sistémicas se presentan en órganos internos como los pulmones, huesos, vísceras, sistema nervioso central, etc.

PROCEDIMIENTO:

PIEL

1. Interrogar al paciente sobre el uso de talcos o cremas que interfieren con el examen.
2. Abstenerse de cualquier tratamiento antimicótico diez días previos al examen.
3. Con un bisturí estéril raspar cuidadosamente los bordes de la lesión. Tomar muestras de diferentes zonas que presenten la lesión.
4. Las escamas desprendidas colocarlas sobre un porta objetos o dentro de una placa petri.
5. Puede colocarse también cinta pegante transparente sobre la lesión y después de haber presionado la lesión con la misma retirarla y posteriormente pegar la cinta en el porta objetos.

UÑAS

1. Si las uñas presentaran esmalte removerlo unos tres días antes del estudio.
2. Abstenerse del tratamiento antimicótico local quince días previos al examen.
3. Raspar con un bisturí estéril la zona de la placa ungueal afectada.
4. Si la lesión se encuentra en la región distal de la uña, cortar con tijeras o cortauñas estériles la porción afectada.
5. Colocar el material recolectado en una placa petri.

CABELLOS

1. Elegir con lupa los cabellos afectados (opacos, descoloridos, con nódulos, quebradizos, etc). Deben recolectarse por lo menos cinco cabellos.
2. Cortar con tijeras los cabellos elegidos y depositarlos en la placa petri estéril.
3. Si se aprecia descamación del cuero cabelludo, recolectar escamas del mismo.

CUESTIONARIO

¿Qué molestias de salud relacionados a micosis tenía el paciente de quien obtuvo su muestra?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Diga de que tipo de micosis recolectó su muestra:

.....
.....

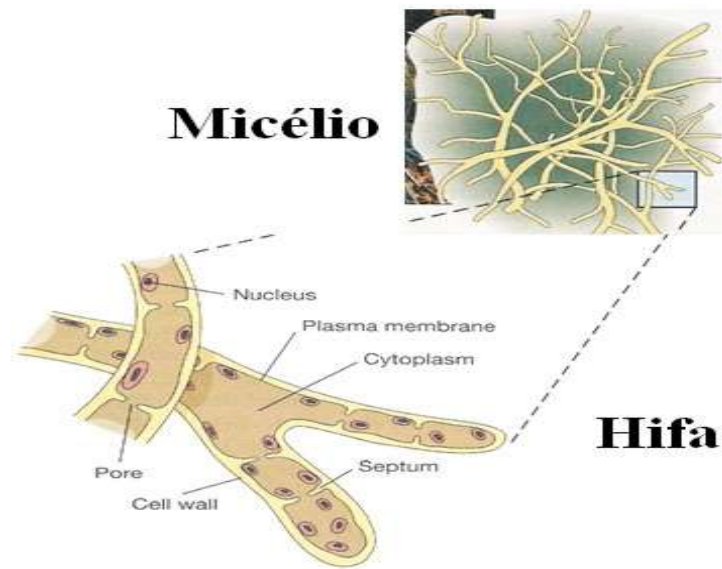
Explique como recolecto su muestra y por que siguió ese procedimiento

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

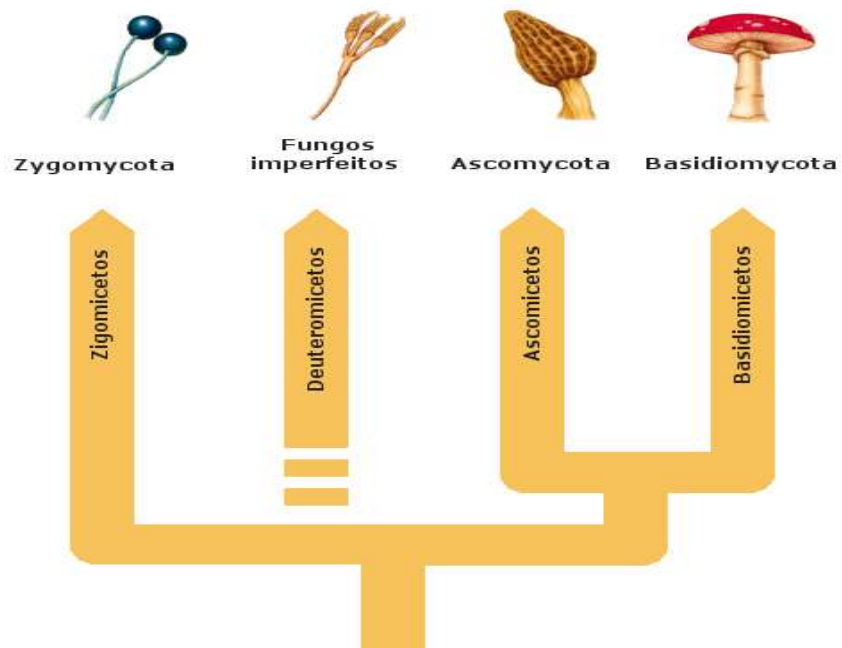
¿Qué recomendaciones usted le brindó al paciente que presentaba la micosis?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

MORFOLOGÍA FUNGICA



CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS



SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE HONGOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

OBJETIVO:

- Sembrar y aislar hongos de importancia a partir de pacientes con diferentes micosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los hongos son seres vivos cuya estructura celular es de tipo eucariota, lo que les va a diferenciar de todas las bacterias que son procariotas.

Los hongos son heterótrofos, es decir necesitan materia orgánica como nutriente. Se pueden comportar como saprofitos, en estos casos su alimento es materia orgánica generalmente muerta, procedente de animales y plantas. Existen otras especies que se pueden comportar como parásitos; en estos casos su alimento procede de huéspedes vivos a los que parasita.

En general los hongos se encuentran en la naturaleza formando hifas que es la forma vegetativa del moho. En estos casos el hongo es pluricelular. También puede encontrarse en forma de levadura; en estos casos es una única célula esférica.

Los hongos se reproducen de manera natural por medio de esporas aunque existen excepciones. Las esporas se originan de forma sexual o asexual según las especies.

Los hongos no tienen clorofila y poseen pared celular que contiene quitina y en ocasiones celulosa. Muchos hongos presentan dimorfismo como característica, es decir, pueden existir en la naturaleza en forma de levadura o en forma de moho.

Los hongos pueden crecer en la naturaleza pluricelularmente (micelio) y/o unicelularmente (levadura). Cuando crece pluricelularmente se pueden llamar mohos u hongos pluricelulares. Aquí se forman estructuras tubulares, las hifas, que crecen formando un conjunto de ramificaciones entrelazadas llamadas micelios.

Las hifas crecen por elongación de sus extremos y con producción de ramas laterales (crecimiento apical). Las hifas forman un micelio y pueden estar divididas por paredes transversales llamadas septos. El micelio puede a su vez ser aéreo si el crecimiento del hongo es hacia la superficie y si contiene esporas o células reproductoras se denominará micelio

reproductor. Si el crecimiento del micelio se realiza hacia el interior de un medio en busca de nutrientes se denominará micelio vegetativo.

En general los micelios sean del tipo que sean suelen crecer en lugares líquidos o sólidos húmedos. Las colonias que forman en su crecimiento son irregulares, algodonosos, filamentosos y secos y en ciertas ocasiones pueden estar necrosadas por falta de nutrientes u oxígeno.

Los hongos en su mayoría son aerobios pero también existen especies facultativas y otros obtienen energía de procesos fermentativos o crecer en medios mínimos donde utilizan el nitrógeno en forma de nitratos, nitritos, etc.

Pueden utilizar cualquier fuente de carbono, que es siempre un factor limitante para su desarrollo. La fuente de carbono más utilizada en su metabolismo es la glucosa u otros componentes más complejos como el almidón o la celulosa. También pueden necesitar en pequeñas cantidades hierro, zinc, cobre, magnesio, fósforo, potasio, etc.

Su metabolismo suele desarrollarse a temperaturas que pueden oscilar entre los 0°C y los 60°C aunque la temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 22°C y 30°C.

Suelen crecer mejor a concentraciones de acidez relativamente elevadas, aunque pueden encontrarse excepcionalmente en medios alcalinos. El pH óptimo para casi todas las especies se suele citar a 5,5.

Necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio, aunque muchos mohos pueden sobrevivir en ambientes muy deshidratados debido a la presencia de esporas.

PROCEDIMIENTO:

1. Se siembran raspados de piel en la superficie de medios de cultivo selectivos: Agar saboraud con concloranfenicol y cicloheximida, Dermatophite Test Médium (DTM), Rapid Sporulatium Médium (RSM).
2. Una vez sembrados los medios de cultivo se incuban a 25°C durante incluso tres semanas.

Las muestras sospechosas de contener *T. verrucosum* se incuban a 37°C. El crecimiento tanto en el medio DTM como el medio RSM y la aparición de una reacción alcalina indica la existencia de un dermatofito.

El crecimiento sospechoso se observa al microscopio. El lado adhesivo de una cinta de celofán transparente se aplica sobre la colonia sospechosa ejerciendo una ligera presión y se monta en un porta objeto con una gota de azul de lactofenol.

Preparación del microcultivo

1. Bajo condiciones estériles y con ayuda de un bisturí cortar cuadros pequeños de agar aproximadamente de 1 cm X 1 cm.
2. Utilizando las pinzas de disección colocar en cada una de las cajas petri un cuadro de agar sobre el portaobjetos.
3. Con el asa estéril inocular por picadura en cada uno de los 4 lados del cuadro de agar, hongos (muestra y aquellos proporcionados por el profesor).
4. Colocar con la ayuda de las pinzas de disección estériles el cubreobjetos encima del agar.
5. Adicionar agua glicerinada estéril a cada una de las cajas petri hasta cubrir dos terceras partes de la varilla de vidrio. Tapar las cajas.
6. Incubar las cajas a 30°C durante una semana. Verificar que las cajas conserven un nivel adecuado de agua glicerinada.

Observación de los hongos

1. Observar con el microscopio los hongos desarrollados después de 7 días de incubación.
2. En un portaobjetos colocar una gota de lugol y cubrirla con el cubreobjetos que proviene del microcultivo, observar al microscopio óptico.
3. Observar al microscopio el portaobjetos del microcultivo, retirar el cuadro de agar, agregar una gota de solución de lugol y cubrir con un cubreobjetos limpio.

CUESTIONARIO

¿Cuál es la finalidad de sembrar muestras de hongos de importancia médica?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cómo prepara un medio de cultivo para aislar muestras de hongos de importancia médica?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué recomendaría para aislar y sembrar hongos de importancia médica?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

ESQUEMATICE EL PROCEDIMIENTO REALIZADO:

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE HONGOS

OBJETIVO:

- Identificar mohos y levaduras así como diferenciar sus estructuras.
- Reconocer la importancia de los hongos como agentes patógenos responsables de micosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los hongos son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas (siete en *Candida albicans*, ocho en *Aspergillus nidulans* y dieciséis en *Saccharomyces cerevisiae*) delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S.

El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular. La estructura de las células de los hongos es muy diferente de la de las bacterias que son organismos procariotas. Aunque comparten muchas estructuras, las células de los hongos se diferencian de las de las plantas en la composición de la pared celular y en que carecen de cloroplastos y clorofila, y de las humanas en que tienen pared celular y en la presencia de ergosterol en la membrana citoplásmica. Por el exterior de la membrana citoplásmica, presentan una pared celular que está compuesta fundamentalmente por polisacáridos y por diversas proteínas. Los polisacáridos más importantes son la quitina (polímero de n-acetil glucosamina), el manano (polímero de manosa) y el glucano (polímero de glucosa). Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme.

Los hongos filamentosos (miceliares o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medios de cultivo sólido y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características.

Al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan unas estructuras tubulares, formadas por múltiples células, que se denominan hifas. En la mayoría de los hongos

filamentosos, las hifas son tabicadas y presentan septos que delimitan las diferentes células . Sin embargo, los hongos del *Phylum Zygomycota* presentan hifas que carecen de septos y se denominan cenocíticas o sifonadas. Las hifas de los hongos tabicados suelen tener un diámetro inferior (2-5 μm) a las de los hongos sifonados (10-15 μm).

Las hifas normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse a partir de fragmentos de otras hifas, y crecen gracias al depósito de nuevos materiales en su extremo, ramificándose con mucha frecuencia hasta producir una maraña de filamentos que constituyen el micelio. En una colonia de un hongo filamentosos se produce una diferenciación en las funciones del micelio, de tal forma que el micelio vegetativo penetra en el sustrato para obtener los nutrientes, mientras que el micelio aéreo se proyecta hacia el exterior de la colonia y produce las estructuras reproductoras. Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas que recuerdan a las bacterianas en medios de cultivo sólidos.

Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales (3-10 x 5-30 μm) denominadas levaduras. Los hongos levaduriformes se dividen por gemación o por fisión binaria. En algunos casos las células hijas no se separan de la célula madre, formándose cadenas cortas denominadas pseudohifas. Los hongos que presentan este tipo de crecimiento, denominado pseudomicelio, dan lugar a colonias similares a las que producen los hongos levaduriformes en medios sólidos.

Un pequeño grupo de hongos, pero de gran importancia en Micología clínica, presentan tanto un crecimiento levaduriforme como miceliar . Estos hongos se denominan dimorfos y típicamente presentan un crecimiento filamentosos a 25 °C y un crecimiento levaduriforme a 37 °C (en el interior del cuerpo humano). *Candida albicans* tiene un dimorfismo especial ya que puede presentar un crecimiento levaduriforme y filamentosos simultáneamente. Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas.

Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedador. En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo, necesitando una fuente de carbono orgánica e iones amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno. Esta facilidad para crecer en cualquier medio de cultivo y la presencia de conidios en el aire hace que sean contaminantes habituales en el laboratorio.

Los hongos filamentosos son aerobios y los levaduriformes anaerobios facultativos. Sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crecen en un rango de pH de 2 a 9 y a temperaturas entre 10 y 40 °C. La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Es relativamente común que un mismo hongo tenga dos nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que suelen haberse descubierto y nombrado de forma independiente.

En un grupo importante de hongos solamente se conoce la reproducción asexual, bien porque no se conocen las condiciones adecuadas para que se desarrolle la forma sexual o porque ésta se ha perdido a lo largo de la evolución. Aunque la reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, ya que cada fragmento puede producir una nueva colonia, normalmente los hongos se reproducen, tanto sexual como asexualmente, por medio de esporas. Los hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia.

Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica, ya que presentan diferencias características. Los hongos del *Phylum Basidiomycota* producen basidiosporas en el exterior de una estructura denominada basidio, los *Ascomycota* producen ascosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada asco y los *Zygomycota* producen zigosporas. Las esporas asexuales generalmente se producen en hifas especializadas y se denominan de diferente forma según su morfología. Los *Zygomycota* producen esporangiosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada esporangio. Los *Ascomycota* y, en menor grado, los *Basidiomycota*, producen esporas asexuales denominadas conidios que se

desarrollan a partir de una estructura denominada conidióforo. Según su tamaño se diferencian en macroconidios y microconidios.

PROCEDIMIENTO:

Examen directo de las muestras:

- Con el asa bacteriológica en ángulo y humedecido depositar una pequeña cantidad de la muestra de escamas, pelos o fragmentos de uñas, sobre una gota de KOH al 20%, que previamente ha sido colocado en una lámina portaobjetos.
- Colocar una laminilla sobre el preparado y calentar suavemente a la llama del mechero, con el fin de facilitar su aclaración.
- Observar al microscopio con lentes de menor y mediano aumento.

Estudio macroscópico o microscópico de las colonias:

- Describir las características de las colonias, tamaño, forma, pigmento y tiempo de desarrollo.
- Hacer un preparado en la lámina porta objetos a partir del cultivo usando colorante azul de lactofenol, cubrir con un laminilla y observar al microscopio con lentes de menor y mediano aumento.
- Estudiar la morfología microscópica característica de cada uno de los hongos.

OBSERVACIÓN Y REGISTRO:

1. Si en las escamas de la piel o uñas se observan filamentos entrelazados o fragmentos refringentes segmentados, formados por células rectangulares, el diagnóstico se orienta hacia un dermatofito.
2. Si se observa en las escamas raspadas de piel presencia de células esféricas de 3 a 6 micras de diámetro entre mezcladas con fragmento de micelio en forma de maza o botella, se trata de *Malassezia furfur*, hongo no cultivable y causante de la Tiña versicolor.
3. Cuando se examinan muestras de pelos se pueden distinguir dos tipos de infección: Una forma llamada “exothrix” en la que el pelo se ve rodeado de una capa de esporas y otra denominada “endothrix” en la que se ve la cadena de hongos (esporas) dentro del pelo.

HONGOS CAUSANTES DE MICOSIS

1. *Trichophyton rubrum*:

Macroscópicamente presenta colonias de micelio aéreo, blanco, elevado, de aspecto algodonoso y en el reverso pigmento de color rojo púrpura.

Al examen microscópico se observan hifas septadas que contienen microconidias sésiles piriformes; puede observarse también macroconidias en forma de salchicha septada transversalmente, cuerpos nodulares y clamidosporas.

2. *Trichophyton mentagrophytes*:

Macroscópicamente desarrolla una colonia blanquecina pulverulenta granulosa “yesosa” a veces con el micelio aéreo elevado, con producción de pigmento amarillo parduzco en el reverso de la colonia.

Microscópicamente se observan hifas septadas con abundantes microconidias esféricas formando pequeñas agrupaciones, también presenta “hifas en espiral” características, ocasionalmente se puede observar macroconidias.

3. *Microsporum gypseum*:

Macroscópicamente desarrolla colonias filamentosas poco elevadas, finamente pulverulenta, con producción de pigmento color canela.

Microscópicamente se observan hifas septadas con abundantes microconidias fragmosporadas elipsoidales, con 4 a 6 células de pared delgada, de superficie lisa y agrupada en racimo; se encuentran pocas microconidias.

4. *Microsporum canis*

Macroscópicamente se observa micelio aéreo veloso de color blanquesino, poco elevado, que produce un pigmento amarillo naranja, más notorio en el reverso de la colonia.

Microscópicamente se observa las típicas macroconidias fusiformes o elipsoidales fragmosporadas hasta con ocho tabicamentos y con pequeñas excrecencias en la superficie; también se pueden observar microconidias y clamidosporas.

5. *Epidermophyton floccosum*:

Macroscópicamente se observan colonias de aspecto aterciopelado finamente pulverulenta de color amarillo azufre con pliegues que se forman del centro de la colonia.

Microscópicamente, se observan macroconidias, fragmosporadas de pared delgada en forma de pera, de 3 a 4 tabiques con el extremo distal romo y una base de implantación angosta, dispuestas aisladamente o en racimos, presentan clamidosporas y carecen de microconidias.

6. *Cándida albicans:*

Macroscópicamente desarrolla colonias cremosas, blanco nacaradas, de borde entero, superficie lisa y opaca.

Microscópicamente se observan levaduras ovaladas, pequeñas, con gemación simple. Las esporas de *Candida* aparecen como células levaduriformes, aisladas o en proceso de gemación. Algunas muestras presentan fragmentos de pseudohifas, blastosporas y las características clamidosporas.

Para diferenciar las especies de *Candida* se siembra en tubos conteniendo caldo indicador y además con campana Durham. Los azúcares que se utilizan son glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa.

7. *Malassezia furfur:*

Microscópicamente se observan hifas cortas de extremos romos, irregulares, cilíndricos, curvos, al lado de elementos redondeados agrupados en racimos (microconidias en racimo).

Este microorganismo no desarrolla en los medios comunes, sin embargo en los medios de cultivo con contenido de lípidos, minerales y otras sustancias nutritivas desarrollan algunas colonias.

8. *Sporotrix schenckii:*

Hongo cosmopolita que vive en el suelo, plantas, animales, ambientes cerrados como minas; produce una infección crónica exógena de piel en el lugar donde penetra el hongo a través de una lesión cutánea accidental con material contaminado. Generalmente a partir de esta lesión inicial se compromete los ganglios subcutáneos de donde se disemina por los trayectos linfáticos a manera de nódulos en cordón que a

menudo se reblandecen pudiendo abrirse y dar úlceras indoloras “chancro esporotricótico”

Macroscópicamente en medio de agar saboraud glucosado y a temperatura ambiente desarrolla colonias filamentosas, membranosas de color gris o negruzco. En agar sangre a 37 °C desarrolla colonias levaduriformes blanco amarillentas.

Microscópicamente a partir de los cultivos de agar saboraud se observan las características conidias piriformes agrupadas semejando a una “flor de margarita”.

A partir de los cultivos de agar sangre se observan levaduras ovaladas y pequeñas.

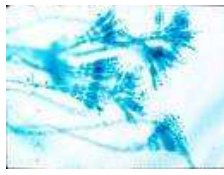
9. *Hormodendrum; Phialophora:*

Estos hongos saprófitos, que accidentalmente por traumatismos y heridas con material contaminado, producen infecciones crónicas de piel y tejido subcutáneo caracterizados por nódulos verrucosos– papilomatosos – costrosos (dermatitis verrucosa), generalmente comprometen miembros inferiores y ocasionalmente cualquier superficie expuesta del cuerpo. En esta micosis el compromiso linfático es poco común, no produce infecciones en animales y no existe contagio interhumano.

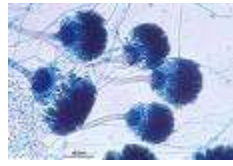
Macroscópicamente se observa colonias filamentosas de color pardo oscuro.

Microscópicamente se observan hifas septadas de color verde oliva, dando origen a conidióforos con conidios ovoides.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS



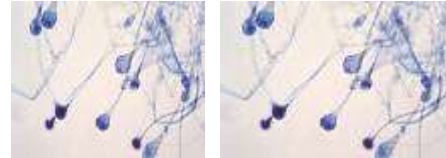
Penicillium sp



Aspergillus sp.



Microsporium sp.



Mucor sp.



Rhizopus sp.



Candida sp.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE HONGOS



CUESTIONARIO

¿Cuál es la diferencia entre una observación macroscópica y una observación microscópica?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cuál es la finalidad de realizar una observación microscópica?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Para realizar una observación microscópica de hongos se debe utilizar lo siguiente?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué es un microcultivo y para que se realiza?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

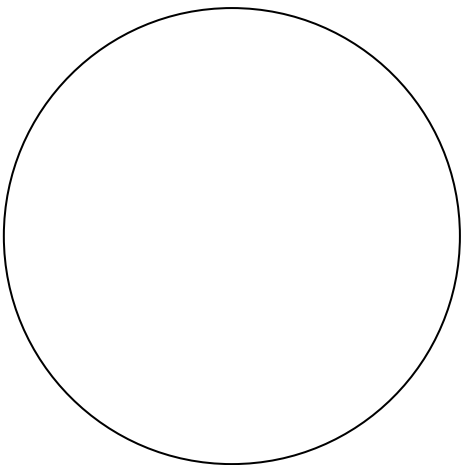
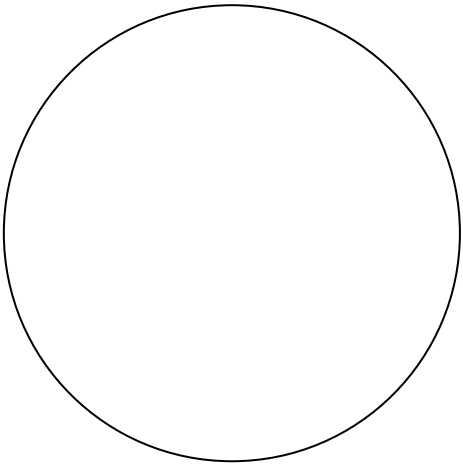
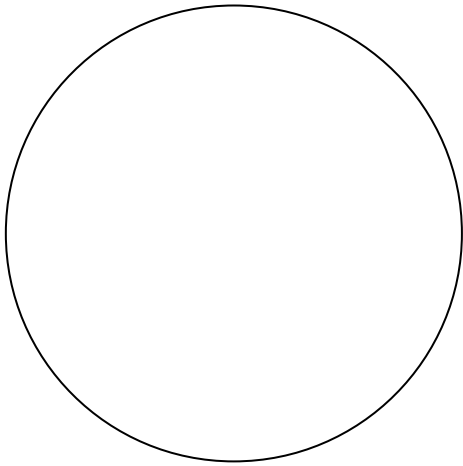
MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

DIBUJE SUS OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS:

Describa detalladamente sus observaciones, teniendo presente la forma, color, tamaño, etc. de lo que observa.

DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.



TECNICAS DE AISLAMIENTO DE VIRUS

OBJETIVO:

- Conocer y explicar las diferentes técnicas de aislamiento de virus.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los virus son parásitos intracelulares que requieren de células vivas para replicarse.

Las células cultivadas, los huevos embrionados y los animales de laboratorio pueden ser utilizados para el aislamiento del virus.

Aunque los huevos embrionados y animales de laboratorio son muy útiles para el aislamiento de ciertos virus, los cultivos celulares son generalmente el sistema de aislamiento de viral en la mayoría de los laboratorios. El desarrollo de métodos para el cultivo de células animales ha sido esencial para el progreso de la virología animal.

Los métodos utilizados para reconocer las infecciones por virus humanos pueden clasificarse en DIRECTOS e INDIRECTOS, según persigan demostrar la presencia del virus o de alguno de sus constituyentes (antígeno o genoma viral) o bien la respuesta de anticuerpos específicas por parte del huésped en el curso de la infección.

Gran parte de las técnicas utilizadas en el diagnóstico clínico se basan en pruebas serológicas, que identifiquen anticuerpos específicos frente a diversas proteínas antigénicas. Sin embargo, existen circunstancias en las cuales son necesarias pruebas que detecten precozmente la infección viral (tratamientos específicos, medidas profilácticas, etc).

En algunas infecciones virales es posible detectar la presencia de antígenos virales previamente al desarrollo de la seroconversión, siendo esta prueba la única evidencia de la exposición al virus cuando no existe aumento de los niveles de anticuerpos circulantes (pacientes inmunodeprimidos).

Igualmente la detección del genoma viral puede favorecer la precocidad del diagnóstico viral y su confirmación. En la última década se han desarrollado una serie de técnicas para el diagnóstico viral basadas en la detección de ácidos nucleicos. De ellas la Reacción en Cadena

de la Polimerasa (PCR) es la más utilizada. En la actualidad la tendencia en el diagnóstico virológico consiste en emplear nuevas y más sensibles tecnologías de detección de antígenos y de investigación de ácidos nucleicos con el propósito de lograr un diagnóstico viral más rápido.

PROCEDIMIENTO:

A.- Recolección de muestras:

1. Solicitar información epidemiológica.
2. Identificación correcta del paciente, edad y fecha de obtención de la muestra.
3. Averiguar si el paciente ha recibido vacunas virales o terapéutica antiviral con fecha reciente.
4. Las muestras deben obtenerse de forma aséptica si se va a realizar el aislamiento del virus. El volumen de la muestra debe ser suficiente como para permitir la realización de los ensayos apropiados y la conservación.

Las mejores muestras por lo general son las que se obtienen en un estadio temprano de la enfermedad (dentro de las primeras 72 horas), cuando el virus se excreta en concentraciones relativamente elevadas y todavía no se ha unido con anticuerpos. Después de transcurridos 07 días, habitualmente no es conveniente realizar cultivos virales cuando se trata de huéspedes inmuno competentes. No obstante en huéspedes inmuno comprometidos y en las infecciones virales persistentes o crónicas, el virus puede estar presente durante periodos prolongados.

Por la gran labilidad de los virus, estos deben ser transportados en un medio de transporte que les provea estabilidad. Esto se obtiene agregando proteínas como puede ser albúmina de bovino o gelatina. Con el agregado de antibióticos y anti fúngicos se logra prevenir el desarrollo de la flor bacteriana y fúngica residente del huésped.

5. Las muestras deben transportarse a 4°C (no congelarlas antes del envío, excepto el caso en el que el traslado implique grandes distancias), en recipientes estériles adecuados y con tapa hermética.

Para enviar virus de alta transmisibilidad como virus de la Hepatitis B o Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), deberá colocarse el recipiente que contiene la muestra dentro de un contenedor de preferencia metálico con tapa rosca y rotularse como peligro biológico.

Hisopados Conjuntivales:

Frotar la Conjuntiva con un hisopo estéril humedecido con solución salina estéril. Colocar el hisopo en 3 a 4 ml. de medio de transporte.

Hisopados de lesiones y vesículas cutáneas:

Recolectar la muestra dentro de los tres días de la erupción de la vesícula. Primero se lava suavemente la superficie de la vesícula o lesión, luego se aspira el fluido vesicular con una jeringa de tuberculina y se coloca el fluido aspirado en 3 a 4 ml. de medio de transporte.

Frotar las lesiones cutáneas o vesículas abiertas con un hisopo y colocarlo en 3 a 4 ml. de medio de transporte.

Aspirado nasofaríngeo:

Es la muestra de elección para virus respiratorios. Se introduce una sonda naso gástrica (SNG) por las fosas nasales hasta la rinofaringe y se aspira el mucus en un tubo colector especial. El contenido de la SNG se lava con medio de transporte para virus, que se recoge en el tubo colector.

Hisopados nasales:

Introducir un hisopo de algodón, seco, suavemente en la nariz. Dejar el hisopo en la nariz durante algunos segundos para que las secreciones sean absorbidas. Colocar el hisopo dentro de 3 a 4 ml. de medio de transporte.

Hisopados faríngeos:

Frotar las amígdalas y faringe con un hisopo de algodón seco. Colocar el hisopo en 3 a 4 ml. de medio de transporte.

Hisopados rectales:

Introducir un hisopo de algodón humedecido de 2 a 3 cm. dentro del canal anal realizando movimientos rotatorios. Colocar el hisopo dentro de 3 a 4 ml. de medio de transporte.

Heces:

Recolectar 2 a 4 g. de la muestra en un recipiente estéril.

Orina:

Recolectar un total de 10 a 15 ml. de orina recientemente emitida en un recipiente estéril y enviarla directamente al laboratorio.

Líquido cefalorraquídeo (LCR):

Recolectar al menos 0,1ml. de LCR (de preferencia 2 a 3 ml.). Transportarlo al laboratorio inmediatamente.

Sangre con anticoagulante (para cultivo viral o inmuno fluorescencia):

Recolectar sangre entera en un tubo que contenga heparina, citrato o EDTA. Enviar la sangre directamente al laboratorio. La rápida entrega (2-6 horas) al laboratorio es esencial.

Suero (para pruebas serológicas):

Recolectar la muestra de sangre en un tubo estéril que no contenga anticoagulantes. Enviar la muestra al laboratorio (no congelar).

De acuerdo al origen de la muestra, esta requerirá diferentes tratamientos previos a se inoculada. Si lo que se quiere es inocular la muestra en cultivos celulares lo que se recomienda es hacerlo inmediatamente después de obtenida.

Si el método de estudio a aplicar es inmunofluorescencia, se realiza un frotis y se fija al portaobjeto con acetona, luego puede ser conservada a -20 °C o -70°C hasta su tinción.

B. METODOS DE AISLAMIENTO DE VIRUS

Métodos Directos:

Son aquellos que detectan:

- El virus como agente infeccioso (aislamiento viral): Cultivos celulares
- La presencia de antígenos virales (técnicas inmunológicas): Inmunofluorescencia (IF), Enzimoanálisis (EIA), Test de Aglutinación.
- La presencia de ácidos nucleicos virales (PCR, etc).
- El virus como partícula viral (microscopía electrónica).

Métodos Indirectos:

Son aquellos que reconocen la respuesta inmune (humoral o celular) por parte del huésped:

- a) Detección de anticuerpos específicos antivirales por técnicas inmunológicas: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Enzimoimmunoanálisis (EIA), Western Blot (WB), Test de Aglutinación, etc).
- b) Producción de anticuerpos in Vitro.

C. ELECCIÓN DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA:

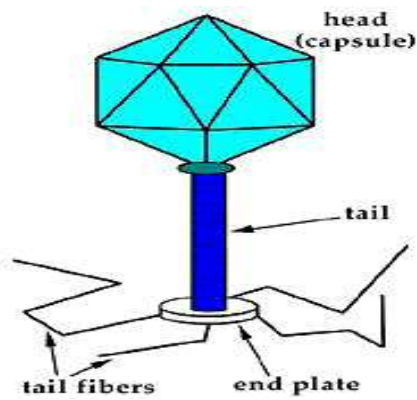
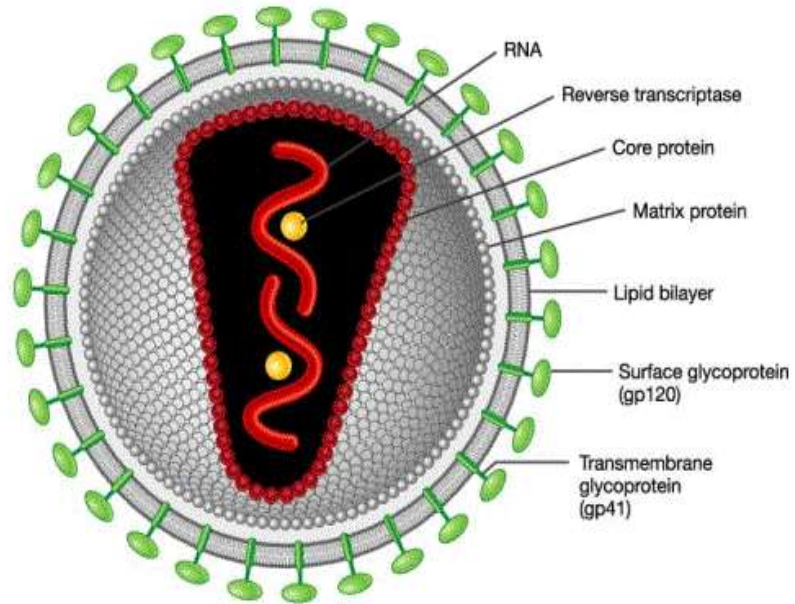
En la elección de las diferentes pruebas diagnósticas se pueden considerarse tres parámetros de importancia fundamental: Sensibilidad, especificidad y valor predictivo.

SENSIBILIDAD: Proporción de personas con la infección que reaccionan positivamente en la prueba diagnóstica realizada. Por ejemplo una prueba diagnóstica será más sensible, cuando detecte un mayor número de personas infectadas o enfermas.

ESPECIFICIDAD: Es la proporción de personas sin la infección o enfermedad que reaccionan como negativos. Por ejemplo una prueba es más específica cuando tiene menos reacciones positivas entre las muestras de personas que no tienen la enfermedad.

VALOR PREDICTIVO: Es la probabilidad de tener la enfermedad dado el resultado de la prueba.

MORFOLOGÍA VIRAL



BACTERIOFAGO



HERPES LABIAL

CUESTIONARIO

Explique en que consiste el aislamiento de virus en cultivos celulares:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Los cultivos celulares se dividen en:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Elija un método indirecto de detección de anticuerpos específicos antivirales y explique en que consiste:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....
.....
.....
¿Qué consideraciones tendría en cuenta usted para elegir una prueba diagnóstica viral?:
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

PROTOZOARIOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

OBJETIVO:

- Realizar e interpretar correctamente la técnica directa para el diagnóstico de protozoarios.
- Observar microscópicamente las diferentes formas de los protozoarios.
- Diferenciar diferentes clases de protozoarios.

FUNDAMENTO TEORICO

Los protozoos, también llamados protozoarios, son organismos microscópicos, unicelulares eucarióticos; heterótrofos, fagótrofos, depredadores o detritívoros, a veces mixótrofos (parcialmente autótrofos); que viven en ambientes húmedos o directamente en medios acuáticos, ya sean aguas saladas o aguas dulces.

La reproducción puede ser asexual por bipartición y también sexual por isogametos o por conjugación intercambiando material genético. En este grupo encajan taxones muy diversos con una relación de parentesco remota, que se encuadran en muchos filos distintos del reino Protista, definiendo un grupo polifilético, sin valor en la clasificación de acuerdo con los criterios actuales.

Los protozoos miden generalmente de 10-50 μm , pero pueden crecer hasta 1 milímetro, y se ven fácilmente en un microscopio. Se mueven alrededor con las colas en forma de látigo llamadas flagelos.

La familia protista tiene más de 30.000 diversos tipos. Los protozoos existen a través de ambientes acuáticos y del suelo, ocupando una gama de niveles tróficos. Como depredadores de algas, bacterias y microhongos unicelulares o filamentosos.

Los protozoos desempeñan un papel como los herbívoros y los consumidores en el acoplamiento de descomponer la cadena alimentaria. Los protozoos también desempeñan un papel vital en poblaciones y biomasa de las bacterias que controlan. Los protozoos pueden absorber el alimento vía sus membranas celulares.

Los protozoos tales como los parásitos de malaria (*Plasmodium spp.*), Trypanosomiasis y Leishmania son también importantes como parásitos y simbioses de animales multicelulares. Algunos protozoos tienen etapas en su vida y alternan entre etapas proliferativas (e.g. trofozoitos) y los quistes inactivos. Como quistes, los protozoos pueden sobrevivir condiciones adversas, tales como exposición a las temperaturas extremas y a los productos químicos dañinos, o largos periodos sin el acceso a los alimentos, al agua, o al oxígeno por un período.

El ser un quiste permite a esta especie parásita sobrevivir fuera de su huésped y permite su transmisión a partir de un huésped a otro. Cuando los protozoos están bajo la forma de trofozoitos se alimentan y crecen activamente. El proceso por el cual los protozoos toman su forma del quiste se llama enquistación, mientras que el proceso de la transformación nuevamente dentro del trofozoito se llama exquistación.

Clasificación de Protozoarios de importancia médica:

- | | |
|------------------------------------|------------------------------|
| 1. Clase Rhizopoda (ameba) | 3. Clase ciliata (Ciliados) |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | <i>Balantidium coli</i> |
| <i>Entamoeba coli</i> | |
| <i>Endolimax nana</i> | 4. Clase Sporozoa |
| <i>Iodamoeba butschlii</i> | <i>Plasmodium vivax</i> |
| | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| | <i>Plasmodium malarie</i> |
| 2. Clase Mastigophora (flagelados) | <i>Plasmodium ovale</i> |
| <i>Giardia lamblia</i> | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | <i>Pneumocystis carinii</i> |
| <i>Trichomonas hominis</i> | |
| <i>Dientamoeba fragilis</i> | 5. Clase Coccidia |
| <i>Leishmania braziliensis</i> | <i>Isospora belli</i> |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | <i>Cryptosporidium sp.</i> |

PROCEDIMIENTO

4. Recolección de la Muestra:

Las muestras de heces deben ser colectadas en un frasco de boca ancha sin contaminación de orina o agua y debe ser procesada lo antes posible, por que la movilidad de algunos parásitos puede desaparecer rápidamente.

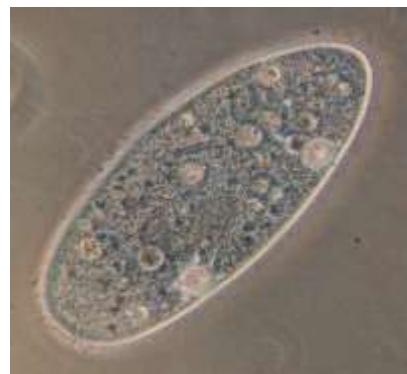
Preservación:

Puede mezclarse un volumen de heces con tres de formol al 10% o solución fijadora de alcohol polyvinil (PVA).

5. Rotular dos láminas y colocar una gota de suero fisiológico en una de ellas y en la otra una gota de lugol.
6. Añadir a cada lámina, por separado, una pequeña muestra de heces, utilizando para ello palillos de madera de 1-3 mm³ y emulsificar.
7. Colocar a cada lámina su laminilla cubre objeto y observar al microscopio con objetivo de 10X y 40X



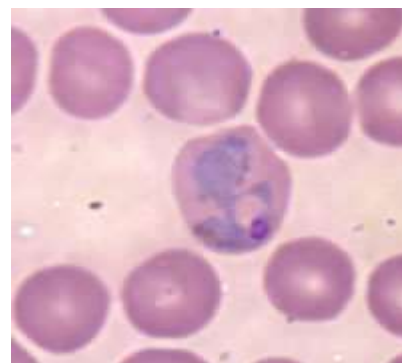
Ameba



Paramecium



Giardia sp.



Plasmodium sp.

CUESTIONARIO

¿Cuál es la diferencia entre utilizar solución salina fisiológica y lugol, en la observación de protozoarios?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cuál es la finalidad de realizar una observación directa de una muestra de heces?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué protozoarios son mas frecuentes en mujeres? ¿Por que?

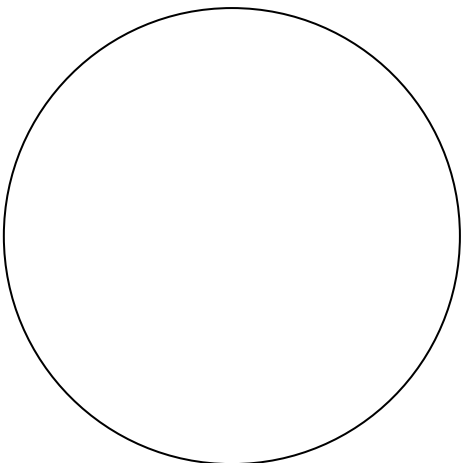
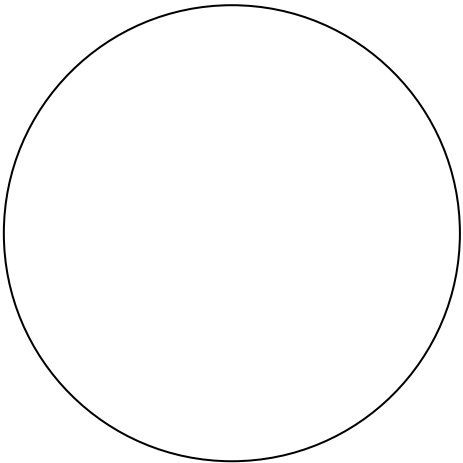
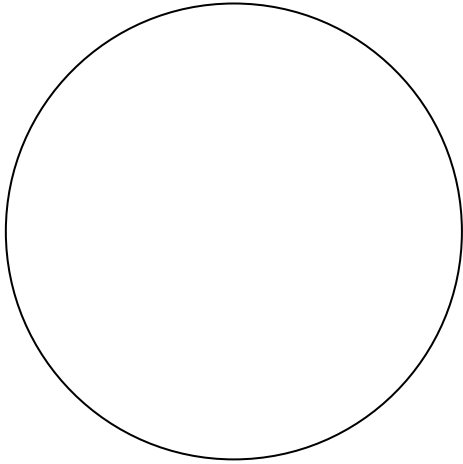
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cómo se trasmite la tricomoniasis?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.



Esquematice el procedimiento para la observación de protozoarios en muestras de heces.

TECNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA:
GOTA GRUESA Y FROTIS EN LÁMINA

OBJETIVO:

- Realizar e interpretar correctamente la técnica para el diagnóstico de malaria.
- Observar microscópicamente las diferentes formas de los plamodios.

FUNDAMENTO TEÓRICO:

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por protozoarios parásitos del género *Plasmodium*, es una de las enfermedades que mayor morbilidad y mortalidad originan en el mundo. En el Perú, la malaria ocurre tanto en la Costa como en los valles interandinos y en la selva. Las tres especies que la causan son *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malarie*. De estas las dos primeras, resultan relevantes: *P. vivax*, por su frecuencia ya que es el responsable del mayor número de casos de malaria reportados a nivel nacional, mientras que *P. falciparum* es importante por la severidad potencial de la enfermedad que causa, la que puede llegar a ser mortal, así como por la frecuencia con que este parásito es resistente a los medicamentos antimaláricos comunes.

Para el diagnóstico de malaria a nivel de laboratorios locales se realiza frotis y gota gruesa mientras que en los laboratorios intermedios y referenciales se realizan cultivos, Inmunofluorescencia, Elisa, etc.

PROCEDIMIENTO

1. Recolección de la muestra hemática:

La muestra de sangre periférica se obtiene para preparar dos clases de película de sangre, una gruesa y una delgada, la gota gruesa y el frotis respectivamente, para su examen por microscopía directa.

La gota gruesa esta conformada por numerosas capas de células sanguíneas, en su mayoría glóbulos rojos, los que son deshemoglobinizados durante la coloración Giemsa. Esta concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en el interior de alguno de ellos.

El frotis consiste de una capa delgada, única, de células sanguíneas. Esto facilita la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en los glóbulos rojos.

Pasos a seguir:

1. Sostenga la mano izquierda del paciente, con la palma hacia abajo y seleccione el tercer dedo a partir del pulgar o el dedo índice; para esto haga que el paciente extienda el dedo seleccionado y flexione los demás (en niños pequeños use el dedo gordo del pie).
2. Limpie el dedo con una pieza o torunda de algodón ligeramente humedecida en alcohol para retirar la suciedad y la grasa de la yema del dedo.
3. Seque el dedo con un algodón limpio, estimulando la circulación de la sangre con unos golpecitos suaves pero firmes.
4. Sostenga el dedo del paciente con la mano izquierda, tomándolo por sus lados y manteniendo una suave presión sobre ellos para favorecer la salida de sangre.
5. Puncie la yema del dedo con una lanceta estéril. Hágalo con un movimiento rápido.
6. Deje salir la primera gota de sangre y límpiela con una torunda de algodón seca. Asegúrese que ninguna hilacha de algodón permanezca en el dedo, que pueda mezclarse posteriormente con la sangre.
7. Colecte dos gotas de sangre de la siguiente manera:
Ponga en contacto el primer tercio externo de la superficie de una lámina con la sangre. Esta gota es para preparar la **gota gruesa**.
Luego, ponga en contacto el tercio medio de la superficie de la lámina con la sangre. Esta gota es para preparar el **frotis**.
8. Limpie la sangre restante del dedo con una torunda de algodón humedecida en alcohol, e indique al paciente que la presione contra el lugar de la punción por 5 minutos.

GOTA GRUESA

- Sostenga firmemente la lámina donde se encuentran las gotas de sangre con una mano o colóquela sobre una superficie limpia.
- Usando la otra mano, aplique una esquina de la lámina auxiliar sobre la gota de sangre destinada a la preparación de la gota gruesa y revuelva con 6

movimientos circulares, de modo, que la sangre se distribuya uniformemente en un círculo de aproximadamente 1 cm de diámetro (o en un cuadrado de 1 cm de lado).

FROTIS

- Coloque la lámina con la muestra sobre una superficie limpia.
- Ponga en contacto el borde de uno de los extremos de la lámina auxiliar con la superficie de la lámina donde se encuentra la muestra hemática, de modo que formen un ángulo de 45°, en un lugar, entre la segunda gota de sangre y el extremo limpio de la lámina.
- Aproxime el borde de la lámina auxiliar a la gota de sangre hasta tocarla solamente. Mantenga el ángulo de 45° y evite barrer la sangre.
- Deje que se distribuya sangre entre el borde de la lámina auxiliar y la superficie de la lámina con la muestra.
- Haga correr el borde de la lámina auxiliar sobre la superficie de la lámina con la muestra desde la gota hacia el extremo opuesto a la gota gruesa, manteniendo el contacto entre las láminas en un ángulo de 45°.

La lámina utilizada como auxiliar para preparar la gota gruesa y el frotis puede ser utilizada para colocar sobre ella, la siguiente muestra y otra lámina limpia del paquete se usará como lámina auxiliar en su preparación.

Nunca utilice la misma lámina auxiliar para preparar más de una muestra.

2. Secado de las muestras hemáticas:

- Deje secar la lámina con la muestra hemática sobre una superficie plana protegida de los insectos, del polvo, de la luz solar directa y del calor extremo.
- Identifique la lámina escribiendo con un lápiz de carbón suave en la parte más gruesa del frotis seco: el código de la muestra, número y la fecha.

Si no va a realizar la tinción envuelva la lámina seca en el formato de registro del paciente y envíela al laboratorio tan pronto como sea posible.

En climas húmedos y cálidos, la autofijación de las muestras ocurre muy rápidamente. Por ello, deben ser coloreadas cuanto antes a más tardar 3 días luego de su obtención.

Cuando un tiempo largo de almacenamiento es inevitable, las muestras deberán ser deshemoglobinizadas y someterse al tratamiento de precoloración.

3. Uso del colorante GIEMSA:

El colorante Giemsa, es una mezcla de eosina (tiñe de rosado) y azul de metileno (tiñe de azul), los que dan la coloración rosada y azul, respectivamente.

En la tinción de la muestra hemática se utiliza el colorante Giemsa diluido, el que se prepara a partir de una solución madre de Giemsa: Una forma sencilla de preparar la dilución es agregando una gota de solución madre por mililitro de agua destilada o solución amortiguadora.

4. Coloración (Método rápido o coloración en varilla):

Coloración de la Gota Gruesa

- 1) Coloque la varilla de vidrio sobre un lavatorio o recipiente, de tal forma, que facilite la eliminación de los líquidos que se usarán en la coloración.
- 2) Coloque las láminas que debe colorear sobre la varilla, espaciándolas de modo que pueda manipularlas con seguridad.
- 3) Vierta el colorante diluido sobre la gota gruesa, cubriéndola completamente. Haga esto suavemente y desde una distancia corta de la lámina. Deje actuar el colorante por 10 minutos. La experiencia le puede indicar la necesidad de modificar este tiempo de espera.
- 4) Descarte el exceso de colorante diluido y lave la lámina con un chorro suave de agua corriente (por ejemplo con una pisceta), hasta que el agua no desprenda colorante.
- 5) Coloque las láminas en una gradilla de madera, de modo que queden inclinadas y con la gota gruesa hacia abajo, evitando que la muestra toque algo. Deje secar las láminas en esta posición.

Coloración del Frotis(Método rápido o coloración en varilla):

- Fijar el frotis previamente con metanol. Coloque las láminas que debe colorear sobre la varilla.

- Vierta el colorante diluido sobre el frotis, cubriéndola completamente. Haga esto suavemente y desde una distancia corta de la lámina. Deje actuar el colorante por 10 minutos.
- Descarte el exceso de colorante diluido y lave la lámina con un chorro suave de agua corriente.
- Coloque las láminas en una gradilla de madera, de modo que queden inclinadas, evitando que la muestra toque algo. Deje secar las láminas en esta posición.

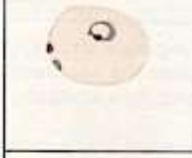




















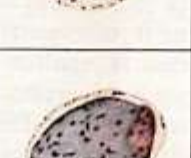


5. Observación microscópica:

Los parásitos de malaria toman con la coloración Giemsa un aspecto determinado en la gota gruesa y el frotis, que permite el reconocimiento del tamaño y forma del parásito y de sus partes.

La identificación de la especie y del estadio se basa, principalmente, en el aspecto del núcleo y el del citoplasma del parásito.

El núcleo del parásito (la cromatina), es generalmente redonda y se colorea de un rojo intenso (rojo grosella).

El citoplasma toma diferentes formas, desde una forma de anillo a una totalmente irregular y se colorea siempre de azul, aunque la tonalidad puede variar ligeramente.

		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Trophozoites	Young				
	Old				
Schizonts	Immature				
	Mature				
Gametocytes	Male				
	Female				

CUESTIONARIO

¿Qué normas de bioseguridad se deben tener en cuenta en la realización de la técnica de Gota Gruesa?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Explique cual es la finalidad de realizar la Técnica de Gota Gruesa:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué recomendaría ud. para obtener una muestra hemática correcta?

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Porque en la técnica para el diagnóstico de malaria se realiza un frotis en la lámina porta objeto?

.....

.....

.....

.....

.....

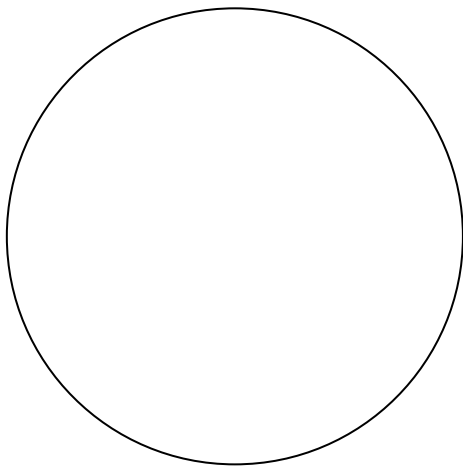
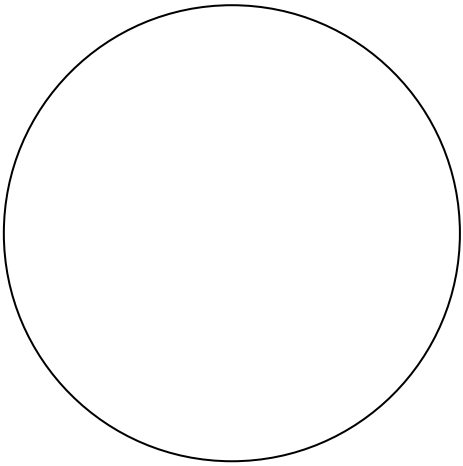
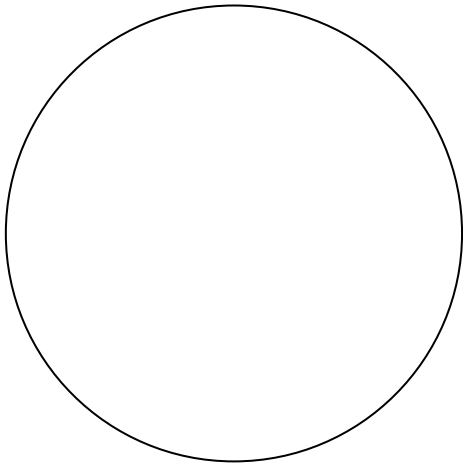
.....

Esquematice la Técnica de la Gota Gruesa:

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

DIBUJE LAS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS REALIZADAS DURANTE LA PRÁCTICA:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.



HELMINTOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

OBJETIVO:

- Realizar e interpretar correctamente las técnicas para el diagnóstico de helmintos.
- Observar microscópica y macroscópicamente las diferentes formas de los helmintos.
- Diferenciar diferentes especímenes de helmintos.

FUNDAMENTO TEORICO

Los helmintos son un grupo grande de gusanos parásitos que incluye a los platelmintos (gusanos planos): céstodos (solitaria) y tremátodos (fasciolas) y nemátodos (gusanos redondos).

Las manifestaciones de la enfermedad por helmintos varían conforme el tipo y forma de desarrollo del parásito. Aunque la forma madura (adulto) de la mayor parte de los helmintos no produce enfermedad grave, los huevecillos y larvas de algunos causan alteraciones que ponen en peligro la vida por ejemplo casi todas las solitarias adultas son inocuas o solo producen síntomas gastrointestinales; sin embargo las formas larvarias dan lugar a convulsiones y cambios de personalidad que pueden ocasionar la muerte del enfermo.

Los helmintos son la causa mas prevalente de enfermedad en el mundo y son comunes en particular en países tropicales con malas condiciones habitacionales, agua y alimentos contaminados con heces humanas.

La mayor parte de los helmintos no se multiplican en forma directa en el huésped humano de modo que cuando el enfermo se retira de la fuente de infección se libera de los parásitos con el transcurso del tiempo. Así como a menudo no es necesario tratar a los pacientes con fármacos antihelmintos a menos que se presente una enfermedad grave.

Clasificación de Helmintos de importancia médica:

1. Platelmintos (gusanos planos)

Céstodos (forma de cinta)

- *Taenia solium*
- *Taenia saginata*

- *Echinococcus granulosus*
- *Hymenolepis nana*

Tremátodos (forma de hoja)

- Fasciola hepática
- Shistosomas

2. Nematelmintos (gusanos redondos)

- *Ascaris lumbricoides*
- *Enterobius vermicularis*
- *Necator Americanus*
- *Strongyloides stercoralis*
- *Trichuris trichiura*

PROCEDIMIENTO

1. Recolección de la Muestra:

Las muestras de heces deben ser colectadas en un frasco de boca ancha sin contaminación de orina o agua y debe ser procesada lo antes posible, por que la movilidad de algunos parásitos puede desaparecer rápidamente.

Preservación:

Puede mezclarse un volumen de heces con tres de formol al 10% o solución fijadora de alcohol polyvinil (PVA).

2. METODO DIRECTO

- a) Rotular dos láminas y colocar una gota de suero fisiológico en una de ellas y en la otra una gota de lugol.
- b) Añadir a cada lámina, por separado, una pequeña muestra de heces, utilizando para ello palillos de madera de 1-3 mm³ y emulsificar.
- c) Colocar a cada lámina su laminilla cubre objeto y observar al microscopio con objetivo de 10X y 40X.

3. MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE FAUST

- a) Emulsificar 1g. de heces con 15 ml. de agua corriente en un tubo o en el mismo frasco en que fue remitida la muestra.

- b) Filtrar con gasa doble 10 ml. de esta suspensión en un tubo cónico de centrifuga de 15 ml.
- c) Centrifugar a 2 000 rpm por 1 minuto.
- d) Desechar el sobrenadante y emulsionar el sedimento en 10 ml. de agua corriente.
- e) Centrifugar a 2 000 rpm por 1 minuto y desechar el sobrenadante al máximo.
- f) Disolver el sedimento con 4 ml. de sulfato de zinc al 33% (que tenga una densidad de 1.180) y luego llevar el tubo hasta 1 cm por debajo del borde.
- g) Centrifugar a 2 000 rpm por 1 minuto.
- h) Sin mover bruscamente los tubos, tomar con un asa de platino dos muestras de la película sobrenadante que se forma en la superficie del líquido para observar con suero fisiológico y lugol.

4. MÉTODO DEL FORMOL ÉTER

- a) Tomar 2 cm³ de heces y mezclar con 10 ml. de suero fisiológico.
- b) Filtrar a través de gasa en un tubo de centrifuga.
- c) Centrifugar por 1 minuto a 2 000 rpm, descartar el sobrenadante.
- d) Añadir 10 ml. de formol al 10% , mezclar y reposar por 5 minutos.
- e) Agregar 3 ml. de éter o gasolina (reactivos muy inflamables), tapan el tubo y agitarlo vigorosamente por 2 minutos.
- f) Destapar y centrifugar a 1 500 rpm. por 1 minuto.
Se forman 4 capas: 1 ra. Capa (superior): éter.
 2da. Capa: residuos.
 3era. Capa: formol.
 4ta. Capa: sedimento.
- g) Desprender la capa de residuos de la pared del tubo con un palillo de madera
- h) Verter todo el líquido sobrenadante del tubo y limpiar las paredes con un hisopo de algodón.
- i) Resuspender el sedimento golpeando el fondo del tubo.
- j) Tomar gotas de este sedimento para colorear con lugol entre lámina y laminilla.



(A)

(B)

(C)



(D)



(E)

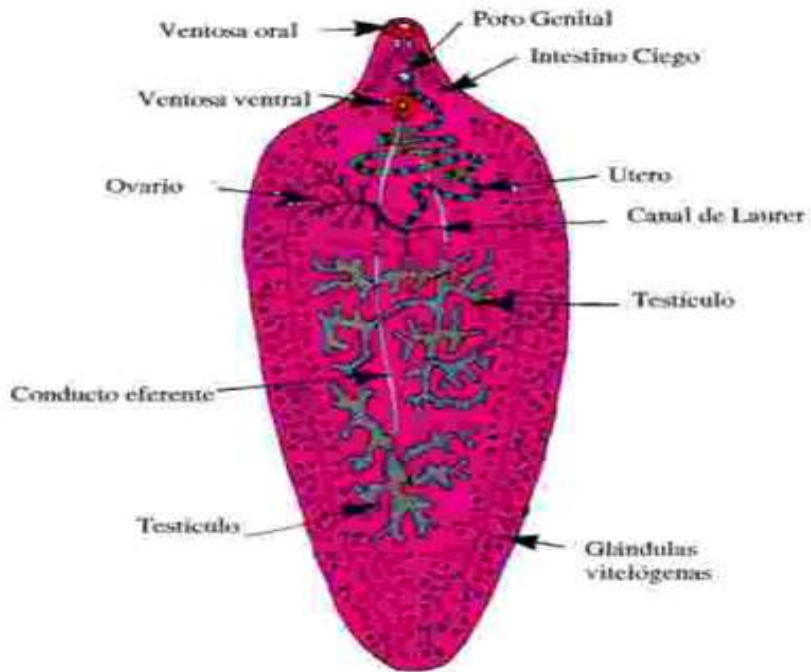
(A) Huevos de *Ascaris* (arriba), *Trichuris* (centro) y *Ancylostoma* (abajo) en el mismo campo microscópico. Obsérvense las diferencias de tamaño

(B) Huevo fértil normal de *Ascaris lumbricoides*. Miden 55-75 μm . por 35-50 μm ., son de color entre amarillo dorado y pardo y se pasan a las heces en la fase monocelular. El huevo presenta mamelones bien visibles en la superficie.

(C) Huevo de *Fasciola hepática*.

(D) Huevo de *Enterobius vermicularis*.

(E) Adulto de *Enterobius vermicularis*.



(A)



(B)

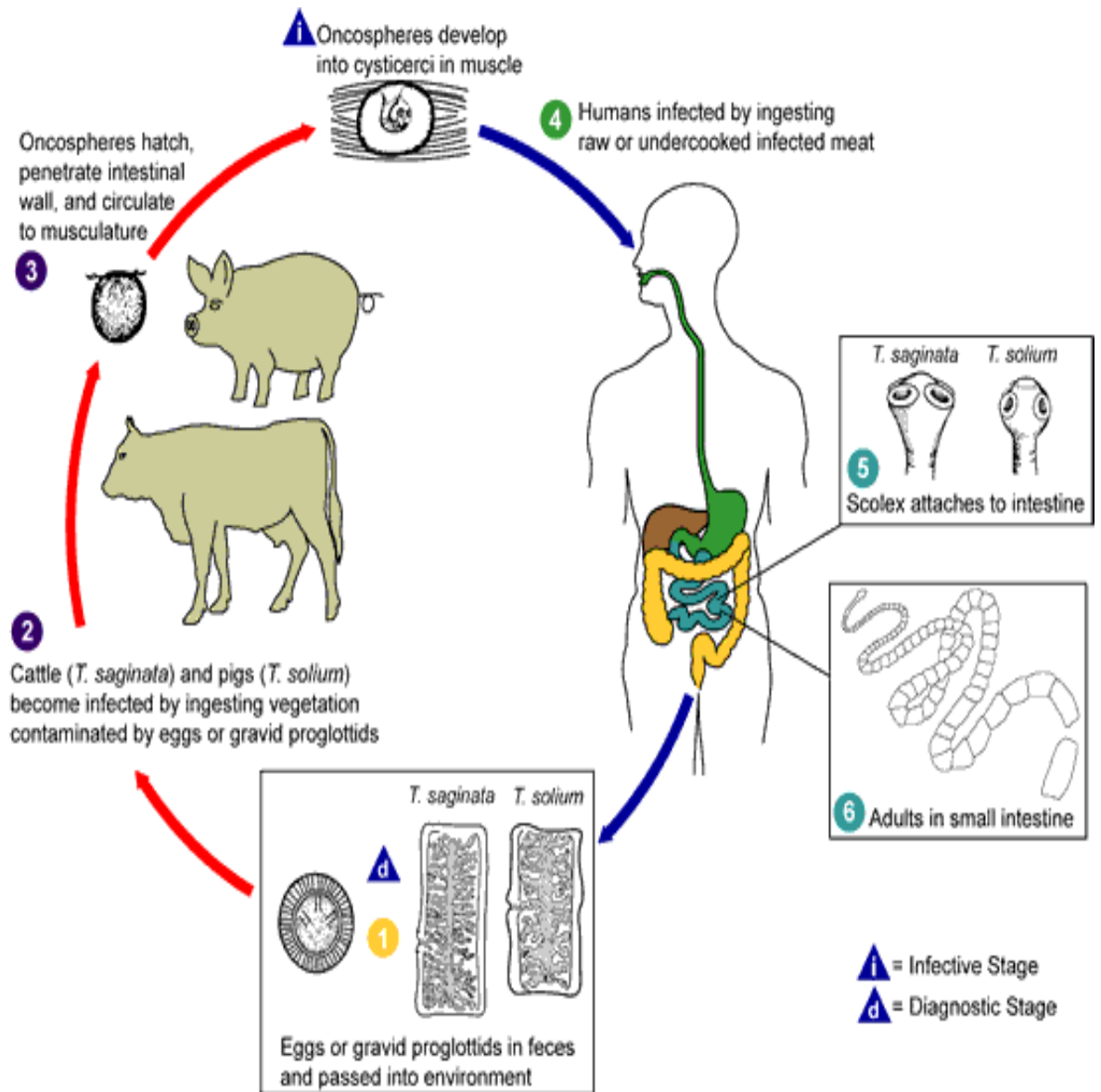


(C)

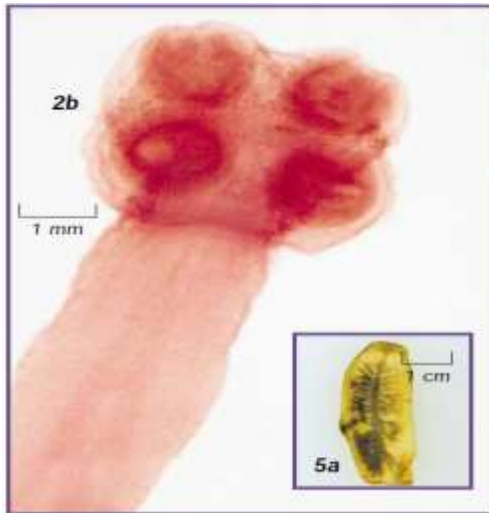
(A) Adulto de *Fasciola hepática*.

(B) Escolex de *Taenia saginata*. Observe el rostelo con su corona de ganchos.

(C) Adulto de *Taenia solium*.



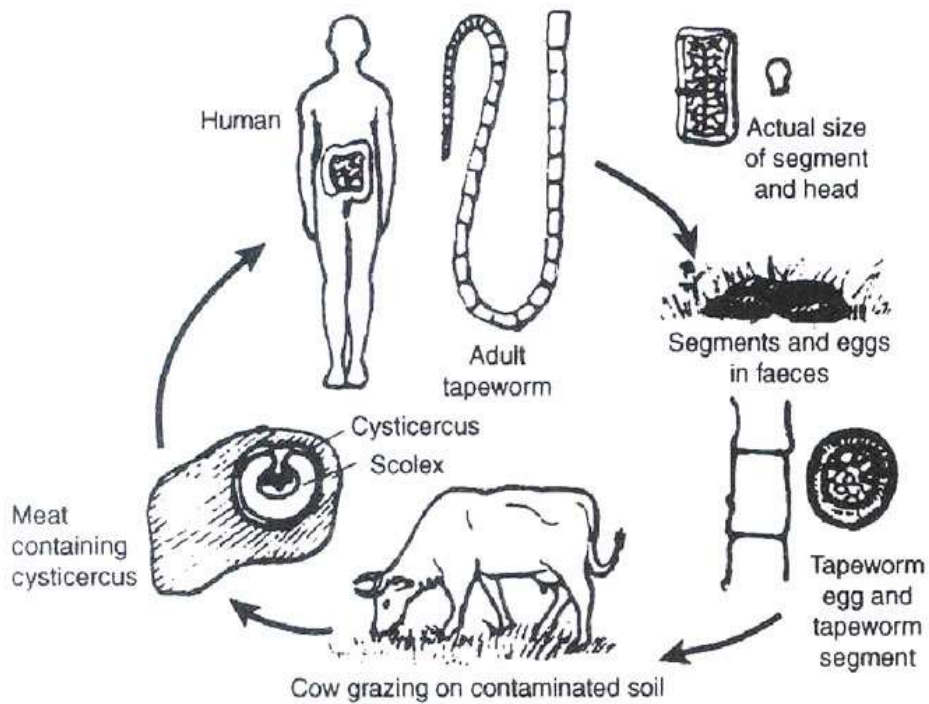
Ciclo de transmisión de la *Taenia Solium*



(A)



(B)



(C)

(A) Escolex *Taenia saginata*.

(B) Adulto *Taenia saginata*.

(C) Ciclo de transmisión de *Taenia saginata*.

CUESTIONARIO

¿Cuál es la diferencia entre utilizar un método directo y un método de concentración en la observación de helmintos?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cuál es la finalidad de realizar un examen parasitológico en una muestra de heces?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Qué helmintos son mas frecuentes en niños? ¿Por que?

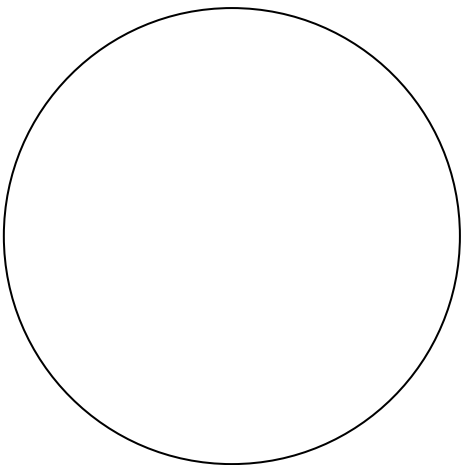
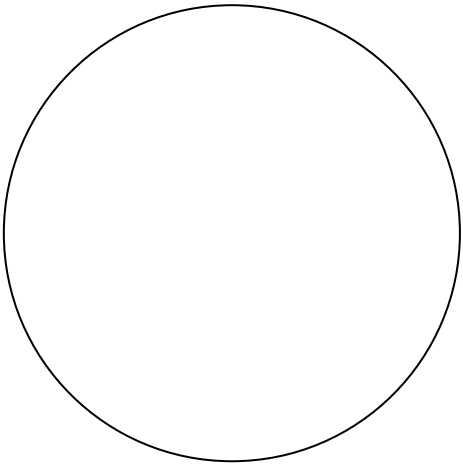
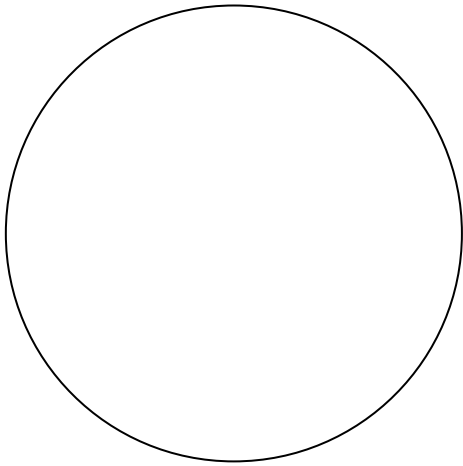
.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Cómo se trasmiten las helmintiasis?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

DIBUJE SUS OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS:

En el costado derecho describa lo que observa e indíquelo con flechas.



DIBUJE SUS OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS:

Escriba el nombre científico de los helmintos que está dibujando y señale con flechas sus partes.

Esquematice el procedimiento para la observación de helmintos en muestras de heces.

REACCIONES SEROLÓGICAS

OBJETIVO:

- Analizar y explicar la reacción antígeno anticuerpo en algunas pruebas de laboratorio con fines diagnósticos.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La inmunidad (del latín *immunis*, libre de carga) alude a la capacidad general de un huésped de resistir a una determinada infección o enfermedad. La respuesta inmunitaria resultante, tiene como consecuencia una serie de acciones defensivas específicas y complejas, extensamente distribuidas por todo el cuerpo del animal. Cada respuesta inmunitaria concreta es una secuencia local peculiar de sucesos, configurada por la naturaleza del estímulo.

La principal función de la respuesta inmunitaria en animales es brindar una protección específica (inmunidad) contra microorganismos dañinos, células cancerosas y ciertas macromoléculas que en conjunto se denominan antígenos (inmunógenos). Se ha desarrollado la terminología para describir los diferentes tipos de inmunidad: inespecífica o específica, natural o artificial y activa o pasiva.

Dos clases principales de linfocito: los linfocitos B y T, reconocen y responden de forma específica a los antígenos. Las células B forman unos productos inmunitarios llamados inmunoglobulinas (anticuerpos), mientras que las células T se activan o sensibilizan para llevar a cabo diversas funciones.

Las inmunoglobulinas interactúan específicamente con antígenos libres o con células que portan antígenos y los marcan para su posterior eliminación. La estructura básica de la molécula de inmunoglobulina consiste en cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos ligeras. Existen cinco clases de inmunoglobulinas (Ig), basadas en propiedades fisicoquímicas y biológicas y son: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Dos características distintivas de las inmunoglobulinas son la diversidad y la especificidad.

Diferentes mecanismos de defensa del huésped:

1. Resistencia inespecífica.
 - Barreras biológicas.

- Barreras químicas.
- Barreras generales.
- Barreras físicas.

2. Inmunidad específica (Respuesta inmunitaria)

A. Inmunidad adquirida natural

- Activa:
Se producen anticuerpos o linfocitos sensibilizados tras una infección.
- Pasiva:
Se transmiten anticuerpos al feto a través de la placenta o con el calostro.

B. Inmunidad adquirida artificial

- Activa:
Se producen anticuerpos tras la inmunización con una vacuna.
- Pasiva:
Se han producido anticuerpos en otro animal o in vitro y se administran a un animal.

Los animales superiores (vertebrados) poseen un mecanismo de respuesta inmunitaria defensiva, muy sofisticado, para desarrollar resistencia frente a microorganismos, macromoléculas, agentes extraños y células cancerosas específicas. Esta respuesta inmunitaria es desencadenada por reacciones antígeno-anticuerpo específicas.

En animales superiores se producen diversos tipos de reacciones antígeno anticuerpo (in vitro) que llevan a la producción de productos inmunitarios. Esta unión de antígeno y anticuerpo inicia la participación de otros elementos del organismo que determinan el destino último del antígeno. Por ejemplo, el sistema del complemento puede activarse, llevando a la lisis celular, fagocitosis, quimiotaxis o estimulación de la respuesta inflamatoria. Otras reacciones defensivas son la neutralización de toxinas, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, la opsonización y la formación de inmunocomplejos.

La unión del antígeno y el anticuerpo in vitro produce una reacción visible (reacción serológica) o que se puede hacer visible de diversas maneras. Estas técnicas se pueden emplear, para identificar virus, microorganismos y sus productos; para cuantificar e identificar antígenos y anticuerpos, para seguir la evolución de una enfermedad; determinar el serotipo de

un microorganismo; y para determinar la intensidad de protección frente a una enfermedad que posee un animal.

La denominación de las pruebas clásicas más antiguas depende de lo que suceda al antígeno: aglutinación, fijación del complemento, precipitación, neutralización o en el caso de cápsulas, su hinchamiento. Las pruebas más recientes se denominan según la técnica empleada: análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (o análisis inmunoenzimáticos), inmunodifusión, inmunoelectroforesis, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación y radioinmunoanálisis.

Históricamente, la detección de drogas se hacía por métodos químicos clásicos como la cromatografía en capa fina o la cromatografía líquida que, aunque precisos, eran procedimientos laboriosos. Las determinaciones empleadas en la actualidad se basan en reacciones antígeno anticuerpo. Con la necesidad de determinaciones masivas de drogas y fármacos en los deportistas, en el empleo de personal civil, ejército y otros ámbitos, se hacen necesarios procedimientos más rápidos.

Uno de estos procedimientos rápidos emplea el inmunoanálisis de aglutinación de latex para la detección de cocaína, morfina, barbituratos, THC (marihuana), metadona, fenciclidina y anfetaminas. Este método ofrece la precisión del inmunoanálisis sin la necesidad de equipos costosos, y ofrece resultados *in situ* de “positivo” o “negativo” en 3 minutos.

Cuando se forma un inmunocomplejo por el entrelazado entre células y partículas por anticuerpos específicos, recibe el nombre de REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN. Las reacciones de aglutinación suelen formar agregados visibles o grumos (aglutinados) que se pueden ver a simple vista. Las reacciones de aglutinación directa son muy útiles para el diagnóstico de ciertas enfermedades. Por ejemplo la PRUEBA DE WIDAL es una reacción de aglutinación de bacilos tifoideos cuando se mezclan con suero que contiene anticuerpos específicos procedentes de un sujeto con fiebre tifoidea.

Se han desarrollado técnicas que emplean esferas sintéticas microscópicas de látex revestidas de antígenos. Estas microesferas revestidas son de gran utilidad en las reacciones de aglutinación con fines diagnósticos. Por ejemplo la prueba moderna del embarazo determina el nivel elevado de hormona gonadotropina coriónica humana (HCG) que se detecta precozmente en la orina y en la sangre de la mujer en el curso del embarazo. También se

emplean pruebas de aglutinación de látex para detectar anticuerpos que se desarrollan durante ciertas infecciones por hongos, helmintos y bacterias y en la detección de drogas.

La hemaglutinación suele deberse a anticuerpos que entrelazan eritrocitos al unirse a antígenos de superficie y se emplea sistemáticamente en la determinación de grupos sanguíneos. Además, algunos virus producen directamente una hemaglutinación, HEMAGLUTINACIÓN VIRAL. Así por ejemplo, se produce aglutinación cuando se mezclan virus del sarampión y eritrocitos, pero no se produce cuando se agrega a la mezcla de suero de una persona infectada con dicho virus; esto muestra que los anticuerpos séricos del paciente han neutralizado los virus del sarampión. Esta prueba de inhibición de la hemaglutinación se emplea extensamente para diagnosticar gripe, sarampión, parotiditis, mononucleosis y otras infecciones virales.

PROCEDIMIENTO:

Prueba de aglutinación para detección de anticuerpos:

Las pruebas de aglutinación se emplean también para medir títulos de anticuerpo.

- Se añade una cantidad específica de antígeno a una serie de tubos o pocillos de una placa de microtitulación.
- Después se añaden a cada tubo o pocillo diluciones seriadas del suero a estudiar (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, etc), que contiene los anticuerpos.

Se determina la máxima dilución del suero que muestra una reacción de aglutinación y el recíproco de esta dilución se denomina título o potencia del suero.

Prueba de inhibición de aglutinación para detección de fármacos (drogas):

La prueba de inhibición de aglutinación de látex se basa en la competencia por el anticuerpo entre un conjugado de látex-droga (fármaco) y la correspondiente droga (fármaco) que pueda estar presente en la orina.

- Se coloca una muestra de orina en el pocillo de mezcla sobre un porta que contiene el reactivo de anticuerpo, un tampón y un reactivo de látex.

Si no existe la droga, el conjugado látex-droga se une al anticuerpo y forma grandes partículas que aglutinan. Por lo tanto, la aglutinación, es la prueba de la ausencia de drogas en la muestra

de orina. Si en la muestra de orina existe una droga, compite con el conjugado de látex por la pequeña cantidad de anticuerpo específico disponible. Una cantidad suficiente de droga captará los anticuerpos e impedirán la aglutinación de las partículas.

CUESTIONARIO

Explique la diferencia entre un inmunógeno y una inmunoglobulina:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Mencione algunas pruebas de laboratorio en la que exista reacción antígeno anticuerpo:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Elija una prueba de laboratorio y explique el fundamento de la misma desde el punto de vista inmunológico:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Defina el termino “Reacciones serológicas”:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

¿Por qué son importantes en el campo de la salud las reacciones serológicas?:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Explique en que consiste la reacción de VDRL:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Explique en que consiste la reacción de Widal:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aristigui, B. 2002. El Reino de los Hongos. Revista Iberoamericana de Micología. Buenos Aires, Argentina.
- Brock, D. 2003. Clínica y diagnóstico microbiológico. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. New Jersey, USA.
- Carballal, G. y Oubiña, J. 2001. Diagnóstico virológico. Virología Médica. El Ateneo. México.
- Chans, G. 2000. Aplicaciones de las nuevas técnicas de biología molecular al estudio de bacterias y virus. Etiopatogenia microbiológica: 2: 19(289-301). Librería Médica Editorial. Chile.
- Montiel, F. y A. Guzmán. 1997. Laboratorio de Microbiología clínica. Revista de la Escuela de Medicina de la Universidad Católica de Chile. 26(3). Chile.
- Ministerio de Salud. Instituto nacional de Salud. Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública. Manual de Normas y Procedimientos de Laboratorio. Serie de Normas Técnicas N° 10. Lima, Perú.
- Ramirez, R. 2008. Métodos prácticos de laboratorio clínico básico. Departamento de Patología Clínica del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen del Instituto Peruano de Seguridad Social. Lima, Perú.
- Sanabria, R.; N. Fariña, F. Laspina; M. Balmaceda; M. Samudio. 2003. Dermatofitos y hongos levaduriformes productores de micosis superficiales. Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Bolivia.
- Vargas F. 1999. Manual Teórico – Practico de Microbiología. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

ANEXOS

FUNDAMENTOS DE MEDIOS DE CULTIVO

AGAR MAC CONKEY

Es un agar selectivo para el aislamiento de Salmonellas, Shiguellas y bacterias coniformes a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales, etc.

Formas de Actuación:

Las sales biliares y el cristal inhiben considerablemente la flora Gram Positiva. La lactosa junto con el indicador de pH rojo neutro, sirven para la comprobación de la degradación de dicha azúcar.

Los medios de cultivo preparados son claros y de color rojo parduzco.

Empleo e Interpretación:

Sembrar las placas por el método de estría. Incubar de 18 a 24 horas a 37 °C.

Las colonias Lactosa negativas son incoloras y las lactosa positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares.

COLONIAS	MICROORGANISMOS
Incoloras, transparentes	<i>Salmonella, Shiguella, Proteus</i> y otros
Grandes, rojas y halo turbio	<i>Escherichia Coli</i>
Más grandes, rosadas, mucosas	<i>Enterobacter, Klebsiella</i>
Diminutas, de crecimiento aislado y opacas.	<i>Enterococos, Estafilococos</i> y otros

AGAR CITRATO SIMMONS

Para la demostración de la utilización microbiana del citrato. Este medio de cultivo sirve especialmente para la identificación de *Escherichia coli*, se utiliza para la identificación de microorganismos especialmente de enterobacterias y ciertos hongos, basado en el empleo de citrato como única fuente de carbono.

Forma de Actuación:

La degradación del citrato por los microorganismos da lugar a una alcalinización del medio de cultivo, lo que se manifiesta por un viraje a azul oscuro del indicador de pH azul de bromotimol.

Empleo e Interpretación:

Placas o tubos con medio de cultivo son claros y de color verde.

CRECIMIENTO	MICROORGANISMOS
Positivo: Medio de cultivo azul oscuro.	Citrato Positivos: <i>Citrobacter, Enterobacter, Salmonella paratyphi B., Klebsiella, Serratia.</i>
Negativo o inhibido	Citrato Negativos: <i>Shiguella, Escherichia, S. Typhi, otros.</i>

AGAR HIERRO TRES AZÚCARES (TSI)

Para la identificación de enterobacteriaceas.

Forma de Actuación:

La degradación del azúcar con formación de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador Rojo de Fenol que vira de anaranjado rojizo a amarillo, o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro de color negro.

Composición:

Peptona de caseína, peptona de carne, extracto de carne, extracto de levadura, NaCl, lactosa, sacarosa, glucosa, amonio de hierro (III), citrato, tiosulfato sódico, rojo de fenol, agar.

*Color claro y rojo anaranjado.

Empleo e Interpretación:

Se siembra el cultivo puro sometido a investigación tanto por estría en la superficie inclinada como en la columna vertical mediante puntura.

Microorganismo	Tubo	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	A/A	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	K/A	+	+

AGAR LISINA HIERRO (LIA)

Agar de ensayo para la demostración simultánea de lisina descarboxilasa (LD) y de la formación de H₂S (Acido sulfhídrico) para la identificación de enterobacteriaceas sobre todo *Salmonellas* y *Arizona*.

Forma de Actuación:

La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos LD positivos, que la transforman en la amina Cadaverina. Esto produce un viraje al violeta del indicador de pH Púrpura de bromo

Cresol. Puesto que la descarboxilación sólo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6), es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo, por la fermentación de la glucosa. Por este motivo, este medio de cultivo solo puede utilizarse para la diferenciación de cultivos que fermentan la glucosa.

Los microorganismos LD (-) pero fermentadores de la glucosa, producen un viraje al amarillo de la totalidad del medio de cultivo. La incubación prolongada puede ocasionar una alcalinización en la zona de la superficie del medio y en consecuencia, se produce un viraje al violeta. La formación de H₂S produce una coloración negra debida al FeS producido.

Las cepas del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de algunas cepas de *Proteus morgani*, desaminan a la lisina a ácido alfa cetocarbónico. Este último forma compuestos pardo rojizos en la región superficial del medio de cultivo con la sal de hierro y bajo la influencia de oxígeno.

Empleo e Interpretación:

Este medio nutritivo se siembra con el cultivo puro sometido a ensayo, tanto por estría sobre la superficie inclinada como por picadura central en la columna vertical subyacente.

Incubación 16-18 horas a 37°C.

Microorganismo	Tubo	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	K/A	-

Microorganismos	Color del medio de cultivo		Formación de H ₂ S
	Superficie Inclinada	Columna vertical	
<i>Arizona</i>	Violeta	Violeta	+
<i>Salmonella</i>	Violeta	Violeta	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Pardo rojizo	Amarillo	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Pardo rojizo	Amarillo	+
<i>Proteus morgani</i>	Pardo rojizo	Amarillo	-
<i>Proteus rettgeri</i>	Pardo rojizo	Amarillo	-
<i>Providencia</i>	Pardo rojizo	Amarillo	-
<i>Citrobacter</i>	Violeta	Amarillo	+
<i>Escherichia</i>	Violeta	Amarillo o -	-
<i>Shiguella</i>	Violeta	Amarillo	-
<i>Klebsiella</i>	Violeta	Violeta	-

CALDO VERDE BRILLANTE BILIS LACTOSA (CALDO BRILA)

Para el enriquecimiento selectivo y numeración de *Escherichia coli* en aguas, leche, alimentos y otros materiales mediante la determinación del título según la Técnica del Numero Más Probable (NMP).

Forma de Actuación:

La bilis y el verde brillante inhiben notablemente el crecimiento de la flora indeseable acompañante, incluso clostridios degradadores de la lactosa (Por ejemplo *Clostridium perfringens*). La fermentación de la lactosa con formación de gas, que es un indicativo de la presencia de *E. coli*, se demuestra mediante campanas de Durham, los restantes coliformes no fecales también crecen en este medio, pero casi siempre sin formación de gas.

El caldo preparado es claro y de color verdoso.

Coliformes: *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus*.

Empleo e Interpretación:

Incubar 24 – 48 horas a 37°C o a la temperatura indicada.

El título de *E. coli* corresponde al volumen más pequeño de material a investigar que todavía produce gas. Como garantía de la investigación hay que complementar el estudio con la diferenciación del cultivo desarrollado.

AGAR SALMONELLA SHIGUELA (SS AGAR)

Para el aislamiento de *Salmonellas* y *Shiguellas* a partir de heces, alimentos y otros materiales objeto de investigación.

Forma de Actuación:

El verde brillante, la bilis de buey y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben considerablemente la flora acompañante. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias.

Las colonias de coliformes quedan señaladas por la demostración de la degradación de lactosa a ácido a cargo del indicador de pH rojo neutro.

Las placas con medio de cultivo son claras y parduzcas.

Empleo e interpretación:

Sembrar por estría la superficie del medio de cultivo con el material de muestra o con el procedente de un cultivo de enriquecimiento previo.

Las colonias de gérmenes lactosa negativas son incoloras y las de gérmenes lactosa positivas son rosadas hasta rojas.

Las colonias de microorganismos formadores de H₂S presentan un centro negro.

COLONIAS	MICROORGANISMOS
Incoloras, transparentes	<i>Shiguellas</i> y la mayoría de <i>Salmonellas</i>
Transparentes con centro negro	<i>Proteus</i> y algunas <i>Salmonellas</i>
Rosadas hasta rojas	<i>Escherichia coli</i>
Mayores que las de <i>E.coli</i> rosadas hasta de color cremoso-blanquesinas, opacas y mucosas.	<i>Enterobacter aerogenes</i>

AGUA PEPTONADA O TRIPTONADA

Para la demostración de la formación microbiana de indol en la identificación bioquímica de microorganismos.

Forma de actuación:

La peptona de caseína (Tryptona) contiene una elevada proporción de triptófano, el cual es degradado por los microorganismos indol positivos formándose indol. La formación del indol se comprueba con el reactivo de KOVACS.

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

AGUA PEPTONADA DE KOCH

Peptona	10 g
CINa	5 g
Agua destilada	1000 ml.

CALDO SIMPLE

Peptona	5 a 10 g
CINa	5 g
Extracto de carne	1 g
Agua destilada	1000 ml.

CALDO INFUSIÓN DE CARNE

Peptona	5 g
CINa	5 g
Infusión de carne	1000 ml

CALDO PEPTONADO DE KOCH

Peptona	10 gr.
CINa	05 gr.
Agua destilada	1000 ml.

CALDO NUTRITIVO

Peptona	10 gr.
CINa	05 gr.
Extracto de carne	03 gr.
Agua destilada	1000 ml.

AGAR NUTRITIVO

Peptona	10 gr.
Agar	15 gr.
CINa	05 gr.
Extracto de carne	03 gr.
Agua destilada	1000 ml.

AGAR MAC CONKEY

Peptona de caseína	17.0 gr.
Lactosa	10.0 gr.
Peptona de carne	3.0 gr.
Sales biliares	1.5 gr.

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Cloruro de sodio	5.0 gr.
Rojo neutro	0.03 gr.
Cristal violeta	0.001 gr.
Agar Agar	12.5 gr.
Água destilada	1000 ml.

AGAR SALMONELLA SHIGUELLA

Extracto de carne	5.0 gr.
Proteosa peptona	5.0 gr.
Lactosa	10.0 gr.
Bilis de buey desecada	8.5 gr.
Citrato de sodio	8.5 gr.
Tiosulfato de sodio	8.5 gr.
Citrato de fierro amoniacal	1.0 gr.
Verde brillante	0.0003 gr.
Rojo neutro	0.025 gr.
Agar agar	13.0 gr.
Agua destilada	1000 ml.

AGAR TSI (Agar Triple Sugar Iron)

Extracto de carne	3.0 gr.
Extracto de levadura	3.0 gr.
Peptona de caseína	15.0 gr.
Peptona de carne	5.0 gr.
Lactosa	10.0 gr.
Sacarosa	10.0 gr.
Glucosa	1.0 gr.
Citrato férrico amoniacal	0.5 gr.
Cloruro de sodio	5.0 gr.
Tiosulfato sódico	0.5 gr.
Rojo de fenol	0.024 gr.
Agar Agar	12.0 gr.
Agua destilada	1000 ml.

18. Agar Sabouraud

Peptona	10,0 g
Dextrosa	40,0 g pH 5,6 +/- 0,2
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA

Cloruro de sodio	0,85 g.
Agua destilada	100 ml.

LUGOL PARA HECES:

1. Disolver 02 g. de ioduro de potasio en 50 ml. de agua destilada.
2. Añadir 1 g. de iodo (cristales) y completar a 100 ml. con agua destilada. Mezclar bien.
3. Guardar en frasco oscuro. Estable 3 semanas.

COLORANTES GRAM

a. Tinte de Cristal Violeta (modificación de Hucker),

Solución madre de Cristal Violeta:

Cristal Violeta (colorante al 85%)	20 g.
Alcohol etílico de 95	100 ml.

Solución madre de oxalato:

Oxalato de amonio	1 g.
Agua destilada	100 ml.

Diluir la solución madre de Cristal violeta en proporción de 1:10 con agua destilada y mezclar con 4 volúmenes de solución madre de oxalato. Filtrar y guardar en frascos de vidrio.

b. Solución de yodo gram

Cristales de yodo	1 g.
Yoduro de potasio	2 g.
Disolver completamente en 5 ml. de agua destilada y agregar :	
Agua destilada	240 ml.
Bicarbonato de sodio, solución Acuosa al 5 %	60 ml.

Mezclar bien y guardar en frascos de vidrio color caramelo.

c. Decolorante

Alcohol etílico (95%)	250 ml.
Acetona	250 ml.
Mezclar bien y guardar en frasco de vidrio con tapón.	

d. Contracolorante (Safranina madre)

Safranina 0	2.5 g.
Alcohol etílico	100 ml.

Diluir la safranina madre en proporción de 1:5 ó 1:10 con agua destilada. Guardar en frasco con tapón de vidrio.

COLORANTES TINCIÓN ZIEHL – NEELSEN

a. Colorante de carbofucsina (solución fenicada de Ziehl)

Fucsina básica	0.3 g.
Alcohol etílico	10 ml.
Mezclar bien con:	
Fenol, cristales fundidos	3 ml.
Agua destilada	95 ml.

a. Alcohol ácido

Ácido clorhídrico concentrado	3 ml.
Ácido etílico	97 ml.

b. Contracolorante

Azul de metilo	0.3 g.
Agua destilada	100 ml.