



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101, Tel: (444) 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.



CARRERA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

MICROBIOLOGÍA GENERAL

**MANUAL
DE
LABORATORIO**

Alumno (a): _____ Hora: _____

Maestro (a): _____

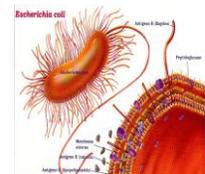
AUTORES

*QFB. Juana Tovar Oviedo
Dr. Fidel Martínez Gutiérrez*

COLABORADORES

*QFB. María Guadalupe Yasmín Díaz Ruiz
Dra. María Eugenia Torre Bouscoulet
QFB. Rosa Elvia Medina Noyola
QFB. Gloria Alejandra Martínez Tovar*

Aprobado por el Honorable Consejo Técnico Consultivo



LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA

(enero de 2017)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101. Tel: 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.



CARRERA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Revisado por:

QFB. Juana Tovar Oviedo

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Agradecimientos a:

Lucero Berenice Ruiz Torres

Héctor Manuel Aguilar López

Enero de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101. Tel: 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.



CARRERA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASIGNATURA: **MICROBIOLOGÍA GENERAL**

DOCENCIA PRÁCTICA: 3 HORAS / SEMANA

SEMESTRE: 4°

OBJETIVOS

- Durante el curso, el alumno (a) desarrollará las habilidades necesarias para la identificación y cuantificación de bacterias, protozoos, hongos y virus.
- Comprobará la utilidad de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos con base a lineamientos internacionales.
- Conocerá el manejo adecuado de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos en el Laboratorio de Microbiología.
- Comprenderá la importancia de la Microbiología en los diferentes campos laborales a través de visitas.

INTENCIONES EDUCATIVAS

- 1) Promover el desarrollo de habilidades de razonamiento.
- 2) Favorecer la capacidad de análisis y de síntesis.
- 3) Fomentar el liderazgo y la toma de decisiones.
- 4) Inducir la solución de problemas.
- 5) Estimular la comprensión de conceptos.
- 6) Desarrollar el pensamiento crítico.
- 7) Mejorar la comunicación oral y escrita.
- 8) Reforzar la honestidad y la ética profesional.
- 9) Cultivar el compromiso y la responsabilidad.
- 10) Lograr que encuentre su propio aprendizaje.



REGLAMENTO INTERNO DE LABORATORIO

Objetivo: Informar a los alumnos y personal adscritas al laboratorio, la necesidad de cumplir con las disposiciones de seguridad establecidas en el área de trabajo, para proteger la salud de los usuarios y del medio ambiente.

- 📖 Acudir puntualmente a las sesiones de enseñanza práctica.
- 📖 Contestar el examen de la plataforma educativa Tzaloa en las prácticas del 1 al 10.
- 📖 En el área de trabajo: No gritar, no correr, no jugar, no beber, no comer, no fumar...
- 📖 Portar el manual de laboratorio en cada sesión práctica.
- 📖 Desinfectar el área de trabajo antes y después de cada práctica.
- 📖 Respetar, colaborar y mantener el orden en el laboratorio.
- 📖 Usar con responsabilidad y buen criterio: Bata, guantes, cubrebocas y sanitas.
- 📖 La bata debe ser usada preferentemente de algodón, de manga larga y abotonada.
- 📖 **La bata debe permanecer en el laboratorio los días destinados a práctica.**
- 📖 La bata debe ser transportada para su lavado en una bolsa de polietileno.
- 📖 El lavado de la bata debe ser por separado de la ropa común, utilizando cloro diluido.
- 📖 Avisar al profesor en turno de cualquier derrame de material infeccioso.
- 📖 Uso obligatorio de bata, guantes y cubrebocas en el manejo y tratamiento de RPBI.
- 📖 Identificar los procedimientos de desinfección, anotando hora de inicio y término.
- 📖 Encender el mechero solo el tiempo necesario y cerrar bien el gas.
- 📖 El uso de bitácoras implica darles seguimiento con criterio de responsabilidad.
- 📖 Participar en el lavado, secado y guardado de los materiales utilizados con "calidad".
- 📖 Lavarse las manos antes de abandonar el laboratorio o emplear sanitizante.

Nombre del alumno (a): _____ Firma: _____

<http://www.cdc.gov/> (2016) *Biosafety in Micrological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, 5th Edition [online]
Disponible en <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl.pdf> [Accedido 27 Jun 2016].



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101. Tel: (444) 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.

CARRERA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO



4° Semestre: Días 2, 3 y 4

Enero – junio de 2017

PROGRAMA DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

PÁGINA	CONTENIDO	FECHA
6	1. Bioseguridad a) Niveles de bioseguridad del 1 al 4 (CDC) b) Organización y funcionamiento del laboratorio c) Descripción de equipo y métodos de esterilización	Enero 24-26
9	2. Estudio microscópico y macroscópico de los microorganismos a) Tinciones selectivas: Cápsulas (Tinción negativa) y esporas (Técnica de Schaeffer-Fulton) b) Tinciones diferenciales: Tinción de Gram y tinción para BAAR	31 Febrero 1-2 7-9
16	3. Medios de cultivo a) Preparación y control de calidad (apegada a especificaciones del fabricante) b) Técnicas de siembra en medios sólidos, semisólidos y líquidos c) Morfología colonial: Características culturales	14-16 21-23
25	4. Cuantificación de microorganismos a) Escala de McFarland b) Cuantificación de bacterias totales c) Cuantificación de bacterias vivas	28 Marzo 1-2
29	5. Actividad bioquímica de los microorganismos a) Inoculación y siembra de pruebas bioquímicas b) Revelado de las pruebas c) Interpretación y discusión	7-9
37	6. Susceptibilidad antimicrobiana a) Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) b) Técnica de Kirby-Bauer o difusión en placa	14-16 21-23
42	7. Parasitología: Búsqueda de parásitos en alimentos, agua y tierra a) Búsqueda de parásitos en hortalizas b) Búsqueda de parásitos en aguas c) Búsqueda de parásitos en suelo	28-30 Abril 4-6
52	8. Micología: Aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes a partir de sustratos naturales a) Técnica de dilución y vaciado en placa b) Técnica de inoculación por punto c) Técnica de exposición de placas	25-27 Mayo 2-4
57	9. Virología: Métodos utilizados para el diagnóstico viral a) Aislamiento y valoración de bacteriófagos. b) Inmuncromatografía aplicada a la detección de VIH	9 y 11
66	10. Microbiología de los Alimentos: Cuantificación de coliformes fecales y coliformes totales a) Técnica del número más probable (NMP) en alimentos, lácteos y jugos b) Técnica de filtración por membrana en muestras de agua	16-18
Actividades complementarias para favorecer el aprendizaje	Presentación en inglés: Tema libre sobre las aplicaciones de la Microbiología Bacterias, parásitos, hongos y virus	23
	Taller integrador de casos clínicos: Bacterias, parásitos, hongos y virus (Hospital Central)	24
	Visitas al campo profesional: Laboratorio Estatal de Salud Pública de la Secretaría de Salud	29



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
 Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101, Tel: (444) 8-26-23-00 ext. 6591
 San Luis Potosí, S.L.P., México.



CARRERA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

SISTEMA DE EVALUACIÓN

El curso práctico de Microbiología General consta de 10 prácticas al semestre basadas en el contenido del curso teórico, al término del programa práctico se realiza una visita académica al campo laboral con enfoque a las diferentes áreas de aplicación de la Microbiología. Además, se organiza un taller integrador con enfoque al área microbiológica.

La evaluación del desempeño del alumno en el **Laboratorio de Microbiología General** se lleva a cabo en cada una de las prácticas a través del reporte en el manual de laboratorio y se asigna la calificación correspondiente del 0 al 10.

Las prácticas 1-5 y 9-10 se calificarán de acuerdo al reporte que incluirá los siguientes puntos:

- ✓ Fecha del día de trabajo
- ✓ Nombre de la práctica
 - ♣ Evaluación diagnóstica en plataforma educativa Tzaloa 2
 - ♣ Diagrama de trabajo 1
 - ♣ Resultados 2
 - ♣ Discusión de resultados, basada en referencias bibliográficas 3
 - ♣ Conclusiones sobre el aprendizaje obtenido 2
- ✓ Firma del alumno 10

La rúbrica empleada en la evaluación de las prácticas 6, 7, y 8 incluye los siguientes puntos:

Evaluación diagnóstica en plataforma educativa Tzaloa	2.0
Dominio del tema	4.0
Orden de las ideas	2.5
Originalidad	1.0
Bibliografía (Vancouver)	<u>0.5</u>
	10.0

CRITERIOS DE RECHAZO DE REPORTE: Inasistencia no justificada o reporte incompleto.

La calificación de laboratorio contribuirá a mejorar el promedio de teoría hasta con un punto, siempre y cuando se haya aprobado por lo menos tres exámenes y la calificación general sea aprobatoria (mayor de 6.0). Caso contrario la calificación de laboratorio no se tomará en cuenta para subir el promedio de la teoría.

Calificación final de laboratorio	Contribución al promedio de teoría
9.0-10	1
7.5-8.9	0.5
Menor o igual a 7.4	0



BIOSEGURIDAD

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. La NOM-007-SSA3-2011 (PDOF el 21 de abril de 2011). Para la Organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental– Salud ambiental– Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.
3. Misión, Visión y Políticas de seguridad y calidad en el laboratorio de Microbiología.
4. Reglamento de Laboratorio de Microbiología.

OBJETIVO GENERAL

- Conocer los conceptos básicos de seguridad en el laboratorio, así como el manejo adecuado de los Residuos Peligrosos Biológicos Infeciosos y realizar el método de esterilización por calor húmedo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar la organización e infraestructura, equipos y materiales usados en el laboratorio de Microbiología.
- Explicar por lluvia de ideas los diferentes procedimientos de esterilización y practicar el método de esterilización por calor húmedo para diferentes materiales.

A) NIVELES DE BIOSEGURIDAD DEL 1 AL 4 [Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC)] en plataforma Tzaloa (videos).

Ver videos en Plataforma Tzaloa.

B) ORGANIZACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL LABORATORIO

Cumplir los requisitos teóricos.

C) DESCRIPCIÓN DE EQUIPO Y MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

Para poder estudiar el comportamiento de los microorganismos en el laboratorio, es necesario contar, entre otras cosas, con material y medios de cultivo estériles.

La esterilización es el proceso mediante el cual se destruyen todas las formas de vida de un objeto, medio o superficie. Para lograr este fin, se cuenta con una variedad de métodos y su elección dependerá de la naturaleza del material que se va esterilizar.

Los métodos de esterilización son: calor ya sea seco o húmedo, filtración, radiaciones y agentes químicos.

Esterilización por calor.- Las temperaturas elevadas pueden causar diversos daños a la célula, que van desde la inactivación de algunas enzimas hasta la desnaturalización de proteínas y por tanto la muerte de los microorganismos. El efecto dependerá de la temperatura y del tiempo de exposición. La esterilización por calor puede ser en calor húmedo o en seco.

a) Calor húmedo.- El calor en forma de vapor saturado a presión es el agente de esterilización más empleado, ya que cuando el ambiente es húmedo se favorece la penetración del calor a la célula y por consiguiente hay una coagulación de las proteínas. Para efectuar este proceso se utiliza un aparato denominado autoclave, que consta básicamente de una cámara de doble pared, un termostato, un termómetro, un manómetro, válvulas para regular la presión de vapor.

El efecto esterilizante se logra a una presión de 15 lb/in² y una temperatura de 121°C, aplicadas durante un tiempo de 15 a 20 minutos según la carga de material. Aquí la temperatura y el tiempo están en función del tipo de material a esterilizar.

Este método es aplicable para esterilizar la mayor parte de medios de cultivo, soluciones acuosas que resistan temperaturas de 121°C, cultivos que se van a desechar, pero no es útil para esterilizar materiales impermeables al vapor, ni para aquellas sustancias que se desnaturalizan con el calor.

b) Calor seco.- Este método se recomienda siempre que el vapor de agua a presión no sea deseable o no sea posible que entre en contacto directo con el material que se va esterilizar. Para que se complete un ciclo de esterilización se necesita exponer por una hora a una temperatura de 180°C. Se fundamenta en una atmósfera seca, el calor ocasiona la oxidación de los componentes celulares vitales.

Esterilización por filtración.- Se emplea para esterilizar sustancias termolábiles, como sueros, vitaminas, antibióticos, azúcares, etc. El material filtrante es de diferente naturaleza y puede ser de asbesto, tierra de diatomeas, porcelana y actualmente, el más usado corresponde a las membranas de éster de celulosa. La eliminación de microorganismos está en función de la carga eléctrica y del tamaño de los poros del material filtrante.

1er DÍA

Se establecen los grupos, lectura del reglamento y recorrido por el laboratorio para conocer las instalaciones.

2do DÍA

EJERCICIO.-ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO

MATERIAL

- Material de vidrio: Cajas Petri, matraces, pipetas serológicas, tubos de ensaye, etc.
- Papel de envoltura, papel aluminio, algodón, cinta testigo p/calor húmedo, masking-tape.
- Equipo de esterilización: Autoclave y horno.

MÉTODO

1. Lavar toda la cristalería con jabón (de preferencia extrán), para eliminar materia orgánica, enjuagar con abundante agua de la llave y al final con agua destilada, para eliminar residuos.
2. Secar el material que se va a esterilizar a temperatura ambiente o en un horno.
3. Envolver el número de cajas que le indique el profesor. Las cajas se acomodan de tal manera que la tapa quede para abajo y el dobléz del papel quede del lado de la base de la caja para que al abrir tengamos cuidado y no vayamos a contaminar la caja, en el papel se anota el número de cajas, la fecha de preparación y el nombre del operario.
4. A las pipetas se les coloca un poco de algodón (trampa) en la boquilla, de tal manera que el aire pase libremente a través de ellas, en la envoltura se marca el volumen de cada pipeta.
5. Los tubos de ensaye deberán llevar un tapón hecho de gasa y algodón del tamaño de la boca de dicho tubo y que embone fácilmente.
6. Ya que está envuelto se le marcará con cinta testigo para corroborar que el proceso de esterilización se llevó a cabo por calor húmedo. De igual manera el material destinado a esterilización por calor seco se preparará y envolverá siguiendo las indicaciones del profesor, se esteriliza por una hora a 180°C.

3er DÍA

- Interpretación de resultados de esterilización. Se entrega el material solicitado, se enfatiza en los lineamientos de evaluación del reporte y se contribuye al orden y limpieza del material de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM & Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. 6ª Edición. USA. Ed. Médica Panamericana. 2008. p48-56
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011 (PDOF el 21 de abril de 2011). Para la Organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (PDOF el 17 de febrero de 2003). Protección ambiental–Salud ambiental– Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.
- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, 2014. <http://www.cdc.gov/od/ohs>
- Occupational Safety & Health Administration, Washington D.C., U.S.A., 2014. <http://www.osha.gov/>
- Secretaria de Salud, México. 2014. <http://www.ssa.gob.mx>



ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LOS MICROORGANISMOS

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Estructura y función de la célula procariota.
2. Pared celular: composición y características.
3. Principios de tinción negativa y de la técnica de Schaefer y Fulton.
4. Fundamentos de la tinción de Gram y Ziehl Neelsen.

OBJETIVO GENERAL

- Conocer y describir las tinciones más comunes en el laboratorio de Microbiología para identificación presuntiva de microorganismos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las características morfológicas de cápsulas y esporas.
- Diferenciar a través de las tinciones de Gram y Ziehl Neelsen la composición de la pared de algunos microorganismos.

INTRODUCCIÓN

Una de las características de los microorganismos es su minúsculo tamaño que los hace imperceptibles a simple vista y aunado a su transparencia, obliga a utilizar además del microscopio, técnicas especiales para observar y estudiar su morfología.

La forma de realizar preparaciones de microorganismos para su estudio microscópico, depende del tipo de microscopio, el propósito específico del estudio y el tipo de germen.

Esta práctica hace referencia a las preparaciones y tinciones más utilizadas para la observación al microscópico de diversos tipos de gérmenes, con el microscopio óptico, en el cual los microorganismos de diferentes especímenes pueden observarse *en preparaciones en fresco ó preparaciones fijas y teñidas*.

LAS PREPARACIONES FIJAS Y TEÑIDAS

Se emplean para eliminar el movimiento de los microorganismos que dificulta el realizar las observaciones específicas de los microorganismos.

Las tinciones pueden ser *Positivas*, cuando se colorean directamente los microorganismos o las estructuras en estudio, o *Negativas*, cuando se oscurece el fondo de la preparación, observándose la silueta incolora de los mismos.

Para hacer las tinciones positivas se utilizan colorantes que están formados por un grupo cromóforo que es la parte de la molécula responsable del color, y un grupo auxocromo que al formar sales le permite dissociarse y combinarse. Los colorantes pueden ser ácidos o básicos, los colorantes ácidos se combinan con los componentes básicos de la célula, como el citoplasma, en tanto que, los colorantes básicos se combinan con los componentes ácidos de la célula como el ADN y el ARN, por lo tanto, los factores como fuerza iónica, composición del medio, temperatura y pH, afectan las tinciones. Las

aplicaciones de diferentes colorantes según sus propiedades y las combinaciones de colorantes, mordentes y decolorantes, han permitido desarrollar tinciones que se agrupan en:

1. Tinción simple
2. Tinciones selectivas
3. Tinciones diferenciales

TINCIONES SELECTIVAS.- Son aquellas que nos permiten observar a un organelo celular determinado, porque el colorante se combina selectivamente con él, en algunos casos se requieren mordentes, agentes acidificantes o precipitantes para lograr la combinación específica colorante-organelo, también suelen usarse colorantes de contraste, para distinguir el resto de la célula. Las tinciones selectivas más importantes son: Tinción de endosporas, Tinción de flagelos, Tinción de núcleo, Tinción de cápsula.

TINCIONES DIFERENCIALES.- Consisten en aplicar una combinación de colorantes, mordentes y decolorantes que permiten poner de manifiesto algunas diferencias importantes en la composición de los microorganismos que aún cuando tengan igual morfología, presenten diferencias en su composición química. Las dos tinciones diferenciales más importantes que se aplican en la bacteriología son la de Gram y la de Ziehl-Neelsen.

1er DÍA

A) TINCIONES SELECTIVAS

MATERIAL

- Microscopio, Portaobjetos y cubreobjetos.
- Cultivos de *Klebsiella pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Bacillus* sp. de 7 días.
- Tinta china, fucsina, verde de malaquita y safranina.
- Mechero de gas butano.

MÉTODO: TINCIÓN NEGATIVA

Cápsula bacteriana (*Klebsiella pneumoniae*)

1. En un portaobjetos previamente identificado con el nombre del microorganismo y las iniciales del alumno, se pone en un extremo una gota de tinta china.
2. Tomar la muestra del microorganismo y hacer la suspensión en la tinta china con ayuda de otro portaobjetos extender con el portaobjetos en un ángulo de 45 grados.
3. Dejar secar a temperatura ambiente.
4. Cubrir con fucsina la preparación y dejar actuar durante 1 min.
5. Después lavar a goteo hasta que ya no salga colorante.
6. Secar y observar con el objetivo de inmersión

Cápsula fúngica (*Cryptococcus neoformans*)

1. En un portaobjetos previamente identificado con el nombre del microorganismo y las iniciales del alumno, se pone en un extremo una gota de tinta china.

2. Colocar una muestra del cultivo, cerca de la tinta china, con una esquina del cubreobjetos se mezclan ambas gotas y se coloca con cuidado evitando la formación de burbujas de aire. Fig. 2.
3. Observar a 10x y 40x.
1. **Técnica de Schaefer y Fulton** *Esporas (Bacillus subtilis)* Preparar un frotis bacteriano de los cultivos proporcionados.
2. Colocar sobre los soportes ubicados en los lavabos y cubrirlo con verde de malaquita.
3. Calentar hasta desprender vapor durante 5 min. con una torunda o con mecheros de alcohol.
4. Dejar que la preparación se enfríe y enjuagar hasta eliminar el exceso de colorante.
5. Cubrir con safranina durante 1 minuto, enjuagar, secar y observar. Fig. 3.

TINCIÓN DE ESPORAS

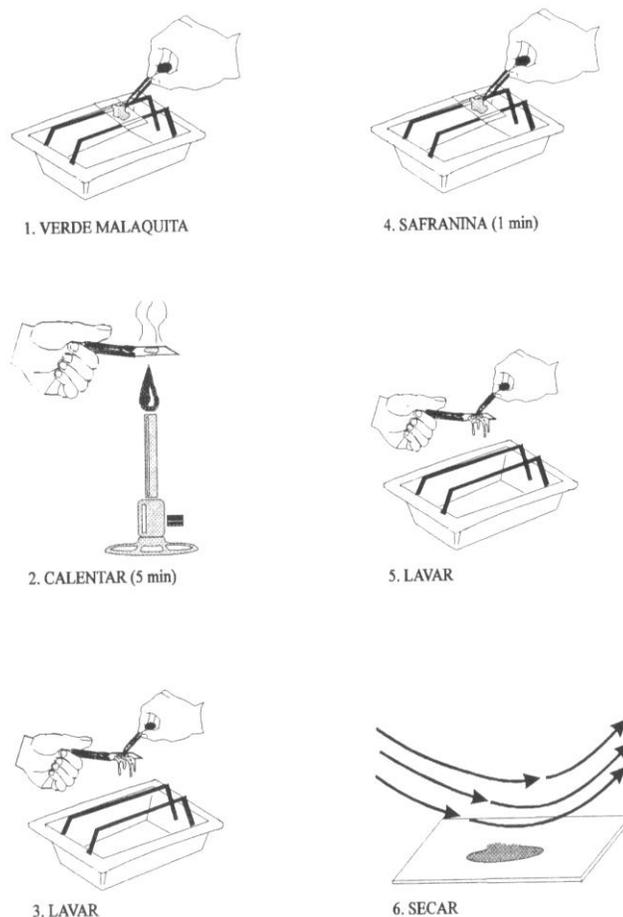


Fig. 2.1 Tinción de Schaefer y Fultón: *Bacillus subtilis* (Díaz y col., 2005.).

TINCIÓN NEGATIVA (CÁPSULAS)



Fig. 2.2 Tinción negativa: *Klebsiella pneumoniae* y *Cryptococcus neoformans*. (Díaz y col., 2005.).

2do DÍA

B) TINCIONES DIFERENCIALES

TINCIÓN DE GRAM. Se basa en la composición de la pared celular y consiste en aplicar 4 reactivos, el cristal violeta imparte color a todos los microorganismos, yodo de Gram o lugol actúa como mordente, forma un complejo cristal violeta-yodo-ribonucleato de magnesio, alcohol-acetona decolora disolviendo y arrastrando el primer colorante, safranina o colorante de contraste.

MATERIAL

- Microscopio
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Asas de siembra
- Reactivos para la tinción de Gram: Cristal violeta, lugol, alcohol, acetona y safranina
- Cultivos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*, *Candida albicans*.

MÉTODO

Realizar una suspensión de cada uno de los microorganismos, se fija al calor pasando una o dos veces sobre la flama del mechero y se realizan los siguientes pasos: Fig. 1.

PROCEDIMIENTO	Gram POSITIVAS	Gram NEGATIVAS
1. Cubrir por 1 minuto con cristal violeta	Menor cantidad de lípidos (1-4%) la pared celular es más gruesa. Se tiñe de color violeta	Mayor cantidad de lípidos (11-21%) la pared celular es más delgada. Se tiñe de color violeta
2. TIRAR EL EXCESO DE COLORANTE Y LAVAR CON CUIDADO CON AGUA DESTILADA		
3. Cubrir por 1 minuto con lugol (yodo)	Se forma el complejo CV-L en el interior de las bacterias, dando una coloración violeta	Se forma el complejo CV-L en el interior de las bacterias, dando una coloración violeta
TIRAR EL EXCESO DE LUGOL Y LAVAR CON CUIDADO CON AGUA DESTILADA		
4. Decolorar con alcohol-acetona , por no más de 10 segundos	Deshidratación de la pared celular, retracción de los poros, la permeabilidad disminuye por lo que el complejo CV-L no puede salir, permaneciendo el color violeta	El alcohol extrae lípidos de la pared celular aumentando la permeabilidad de los poros que permite que salga el complejo CV-L
TIRAR EL EXCESO DE ALCOHOL - ACETONA Y LAVAR CON CUIDADO CON AGUA DESTILADA		
6. Cubrir por 30 segundos con safranina	Debido al contracción de los poros el colorante no penetra quedando el color VIOLETA	Por encontrarse los poros dilatados las bacterias toman este colorante y se tiñen de ROJO
TIRAR EL EXCESO DE SAFRANINA Y LAVAR CON CUIDADO CON AGUA DESTILADA, SECAR Y OBSERVAR EN 100X.		

3er DÍA

TINCIÓN DE BACILOS ALCOHOL ÁCIDO RESISTENTES (BAAR)

MATERIAL

- Microscopio
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Asas de siembra
- Reactivos para la tinción de Kinyou: Carbofucsina, alcohol-ácido, azul de metileno
- Cultivo de *Mycobacterium gordonae*

Los Bacilos Alcohol Ácido Resistentes (BAAR) tienen esta característica debido a que su pared celular tiene un alto contenido de lípidos (arriba del 60%) incluyendo ceras A, B, C y D, unidos a polisacáridos. En los microorganismos acidorresistentes, una vez que el colorante se ha combinado con las sustancias céreas, estos resisten la decoloración con alcohol ácido, pues ni el fenol ni las ceras son solubles en éste y para observarlos se aplica como colorante de contraste el azul de metileno.

1.- Utilizando carbofucsina, que es una mezcla de fucsina con fenol, en el cual existen dos variantes de ésta, ya sea utilizando calor que suaviza las ceras y facilita la solubilidad del colorante en ellas, conocida con el nombre de tinción de Ziehl-Neelsen. Fig. 2. O el método en frío que recibe el nombre de tinción de Kinyou.

2.- Si se tiene un microscopio de fluorescencia se pueden hacer búsquedas más sensibles de BAAR empleando fluorocromos como la auramina O y la rodamina.

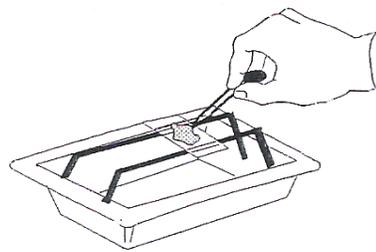
MÉTODO TINCIÓN DE BAAR (KINYOU)

1. Cubrir con carbofucsina y dejar a temperatura ambiente durante 6 a 8 minutos.
2. Lavar a chorro de agua, hasta quitar el exceso de colorante.
3. Decolorar con el alcohol-ácido.
4. Cubrir con el azul de metileno durante 3 minutos.
5. Lavar al chorro del agua.
6. Dejar secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

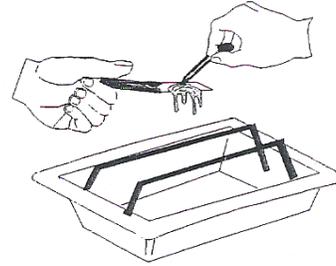
BIBLIOGRAFÍA

- Díaz R., Gamaso, C. López-Goñi, I. Manual Práctico de Microbiología. 2ª Edición. MASSON. Barcelona.1999
- Tortora, Funke, Case. Microbiología. 9ª. San Francisco. Ed. PEARSON, 2007
- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, 2014. <http://www.cdc.gov/od/ohs>
- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España. 2013, Protocolos. <http://www.seimc.org>

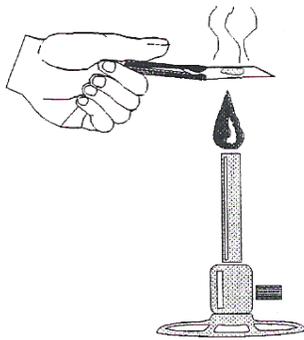
TINCIÓN PARA BACIOS ÁCIDO ALCOHOL-RESISTENTE (BAAR)



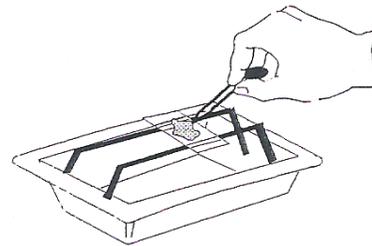
1. CARBOFUCSINA



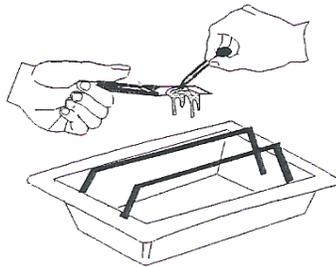
5. LAVAR



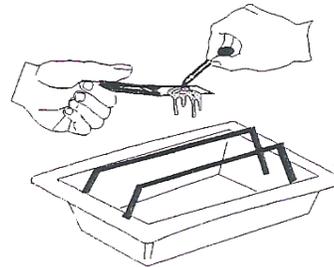
2. CALENTAR (5 min)



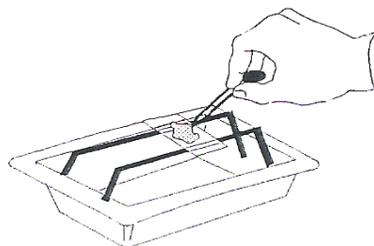
6. AZUL DE METILENO (1 min)



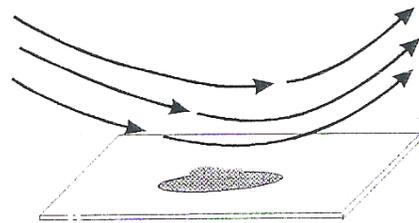
3. LAVAR



7. LAVAR



4. ÁCIDO-ALCOHOL (30 seg)



8. SECAR

Fig. 2.3 Tinción de Ziehl-Neelsen. (Díaz y col., 2005).



MEDIOS DE CULTIVO

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Requerimientos nutricionales de los microorganismos
2. Medios de cultivo y su clasificación

OBJETIVO GENERAL

- Conocer la composición, uso, almacenamiento y aplicaciones de algunos medios de cultivo.
- Describir la morfología macroscópica y microscópica de algunos microorganismos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Elegir y evaluar el procedimiento de preparación del medio de cultivo con base a las especificaciones del fabricante.
- Diferenciar las técnicas de siembra más comunes en medio sólido, semisólido y líquido, así como la morfología macroscópica y microscópica de algunos microorganismos.

INTRODUCCIÓN

Todas las formas de vida, desde los microorganismos hasta los seres humanos, toman del ambiente sustancias, denominadas nutrientes, que requieren para sintetizar su material celular, generar energía y efectuar un funcionamiento adecuado. Los microorganismos son extraordinariamente diversos en cuanto a sus requerimientos y propiedades fisiológicas específicas.

Por su diminuto tamaño, los microorganismos no pueden estudiarse como individuos, sino que es necesario manejarlos como poblaciones. Para ello es necesario cultivarlos, es decir favorecer su multiplicación *in vitro*, en ambientes especiales que proporcionen las condiciones semejantes a las de su hábitat natural. Aparte de los nutrientes para el microorganismo, se debe controlar: El pH, la necesidad de gases, pues afectan el desarrollo microbiano como el O₂ y CO₂, suministro de luz, control de la temperatura que puede determinar la velocidad de crecimiento.

Los medios de cultivo pueden variar en su composición, no sólo en función del grupo microbiano para el cual se utilizan, sino también por su complejidad química, su estado físico y su aplicación.

Por su **composición** los medios de cultivo se clasifican en:

- a) **Sintéticos** o de composición químicamente definida, estos medios no son utilizados de forma rutinaria, ya que su elaboración es minuciosa y los ingredientes son costosos.
- b) **Naturales** o de composición químicamente desconocida o no definida, estos se elaboran con ingredientes de naturaleza compleja tales como extractos de tejido animal o vegetal.

Por su estado **físico** los medios de cultivo pueden ser:

- a) **Líquidos** conocidos como caldos, estos son útiles para hacer diluciones, para homogenizar mezcla de microorganismos y determinar su agrupación natural de estos.
- b) **Sólidos** son útiles para separar microorganismos y favorecer el desarrollo de colonias aisladas en las que sea posible observar las características típicas de uno solo de ellos.
- c) **Semisólidos** son medios líquidos a los que se adiciona agar en concentraciones de 0.4 a 0.8%. Se emplean para determinar la movilidad de los microorganismos microaerófilos.

Considerando la **aplicación** de los medios de cultivo estos se clasifican en:

- a) **Selectivos** los cuales favorecen el crecimiento de un microorganismo específico y suprimen el crecimiento de otros.
- b) **Enriquecido** estos permiten el desarrollo de microorganismos heterótrofos exigentes, son medios químicamente complejos o ricos en nutrientes.
- c) **Diferenciales** son aquellos que contienen sustancias indicadoras que permiten poner de manifiesto alguna actividad metabólica del microorganismo que lo distingue.
- d) **Para la cuantificación** permite determinar la cantidad de microorganismos y la calidad microbiológica del agua y productos como la leche, siguen normas y métodos estándares.
- e) **De mantenimiento** para preservar satisfactoriamente la viabilidad de las células en un cultivo, se caracterizan por concentraciones muy limitadas de nutrientes.

1er DÍA

A) PREPARACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO (APEGADA A ESPECIFICACIONES DEL FABRICANTE)

EJERCICIO

MATERIAL

- Material de cristalería estéril
- Medios deshidratados de diversos tipos

MÉTODO

1. Cada equipo de alumnos preparará el volumen de medio de cultivo indicado por el profesor. Fig. 1.
2. Seguir las indicaciones descritas por el fabricante.
3. Considerar los procedimientos de dilución al adicionar el agua destilada.
4. Pesar la cantidad del medio de cultivo necesaria para el volumen establecido, limpiar la espátula para evitar contaminación.

5. Distribuir el medio de cultivo en caso de ser tubos antes de esterilizar.
6. El material a esterilizar (tubos o matraces) deberá de ser cubierto con torundas de algodón o los tubos con tapón de rosca sin apretar.
7. Meter el material en autoclave siguiendo las indicaciones del fabricante.
8. Para el vaciamiento de los medios de cultivo en las cajas estas deben de estar previamente identificadas y en condiciones de esterilidad.
9. Para comprobar la esterilidad de los medios, meter una muestra de tubos y cajas en la estufa e incubar durante 24 hrs. a 37°C.
10. Los medios cuya esterilidad ha sido comprobada, serán utilizados en la siguiente práctica.

DIAGRAMA DE TRABAJO

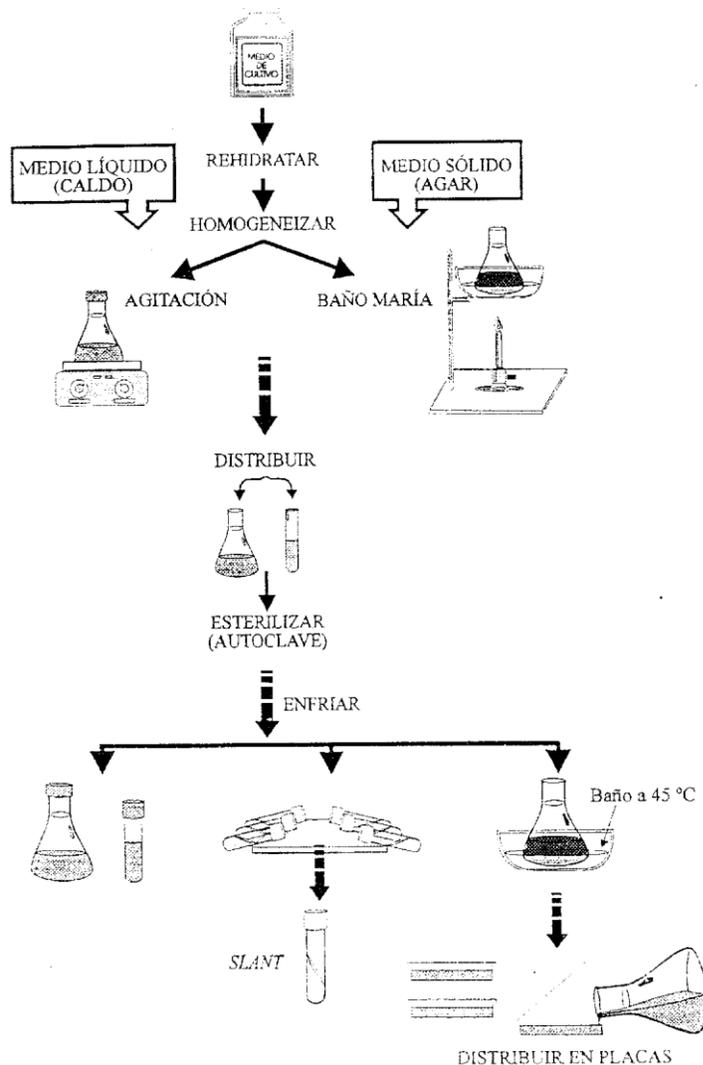


Fig. 3.1 Preparación de medios de cultivo. (Díaz y col., 2005.).

B) TÉCNICAS DE SIEMBRA EN MEDIOS SÓLIDOS, SEMISÓLIDOS Y LÍQUIDOS

Para efectuar el estudio de los microorganismos, se han diseñado diversos métodos que permiten cultivarlos bajo condiciones artificiales, en los que es posible controlar las condiciones experimentales y manejar un solo tipo de microorganismos. Una de las técnicas más usadas consiste en transferir una muestra microbiológica de un ambiente determinado a un medio de cultivo, al efectuar este procedimiento es necesario considerar que en el aire que nos circunda y en la superficie del área de trabajo, existen otros muchos microorganismos, debido a esto es necesario tomar precauciones para impedir que estos penetren y contaminen los cultivos en estudio. Para favorecer el desarrollo de un microorganismo en particular, es necesario considerar no sólo el aspecto nutricional, sino también las condiciones ambientales de su hábitat natural, por lo que en el medio de cultivo se debe de ajustar el pH, concentración de sales y durante la incubación, condiciones tales como: la temperatura, la aireación, y la luminosidad. La aplicación de estos procedimientos ha permitido propagar a los microorganismos en cultivos mixtos, así como su aislamiento y la obtención de cultivos puros, facilitando de éste modo, el estudio, caracterización, aplicación, y control de los mismos. La forma de sembrarlos y cultivarlos, depende del tipo de microorganismos y el propósito específico del estudio. Fig. 1, 2 y 3.

Un **medio líquido** puede ser inoculado mediante un asa microbiológica, un hisopo, una pipeta serológica o una pipeta Pasteur, depositando dentro del caldo y homogenizando.

Los **medios semisólidos** se inoculan con asa recta, en un ángulo de 90° con respecto a la superficie del medio, son usados para estudiar la movilidad de los microorganismos.

En los **medios sólidos** la siembra se realiza con asa microbiológica inoculando la superficie del agar con suavidad, existen varias técnicas de inóculo, cuya finalidad común es el aislamiento de los microorganismos, los cuales al multiplicarse forman agregados que se hacen visibles a simple vista, a estos agregados se les llama colonias, las que presentan características que varían de acuerdo al tipo de microorganismo cultivado y el medio empleado.

MATERIAL

- 4 tubos con caldo nutritivo
- 4 tubos con gelosa inclinada
- 4 tubos con gelosa vertical
- 2 cajas con agar nutritivo
- 2 cajas con agar selectivo
- 2 cajas con agar Sabouraud
- Cultivo de 24 hrs. de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.

2do DÍA

PROCEDIMIENTO

1. Desinfectar el área de trabajo.
2. Marcar los tubos y cajas con las iniciales de las cepas a sembrar y el grupo del alumno.

Siembra en medio líquido

1. Con la mano derecha (si usted es diestro) esterilizar el asa a la flama y enfriarla.
2. Con la mano izquierda tomar el tubo que contiene el cultivo, colocarlo en posición inclinada y con la boca cerca de la flama del mechero, sujetar el tapón de algodón entre el meñique y la palma de la mano derecha (que sostiene el asa ya estéril) y girar el tapón hasta que salga del tubo; mantener el tapón en la mano (nunca deje este sobre la mesa porque contaminaría el cultivo); flamear la boca del tubo 1 o 2 veces manteniéndolo en la posición inclinada y con la boca cerca de la flama.
3. Introducir el asa y tomar una asada del cultivo de *Escherichia coli*, cerca del mechero.
4. Flamear el algodón y la boca del tubo y taponarlo.
5. Colocar el tubo en la gradilla y tomar el tubo que va a ser sembrado.
6. Destapar, flamear y mantener el tubo en la forma indicada.
7. Introducir el asa y depositar el inóculo dentro del medio líquido.
8. Sacar el asa, flamear el algodón y la boca del tubo y taponarlo.
9. Flamear el asa al rojo incandescente para destruir los microorganismos de tal forma que no produzca aerosoles.

Siembra en tubo con medio semisólido

Siguiendo las indicaciones anteriores y con el asa recta, introducir por picadura en la parte central, hasta la mitad del medio, dejando uno de los 4 tubos como control.

Siembra en tubo con medio inclinado.

1. Siguiendo las indicaciones anteriores y con el asa recta, se pica por el centro de los tubos y posteriormente se siembra por estría en la superficie de pico de flauta.

Siembra en caja de Petri.

1. Se practicarán las formas de estriado más comunes.
2. En las cajas de agar sangre sembrar *Staphylococcus aureus* por técnica de dilución; en las cajas que contienen agar nutritivo sembrar *Bacillus subtilis*. Usando el estriado radial y en las cajas que contienen el medio diferencial Mac Conkey sembrar *Escherichia coli* usando el estriado de descarga central con el asa calibrada de 0.001 mL.
3. Invertir las cajas para evitar que el agua de condensación caiga sobre los cultivos.

SIEMBRA EN MEDIO SÓLIDO EN TUBO INCLINADO Y CAJA PETRI

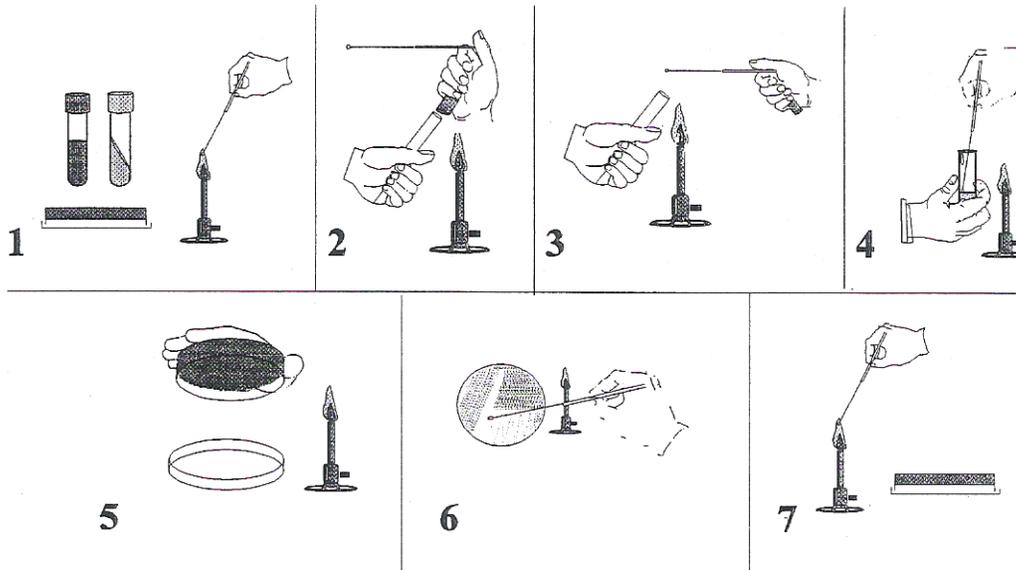


Fig. 3.2 Manejo de muestras y toma de inóculo. (Díaz y col., 2005).

TÉCNICA DE SIEMBRA POR AGOTAMIENTO EN MEDIO SÓLIDO

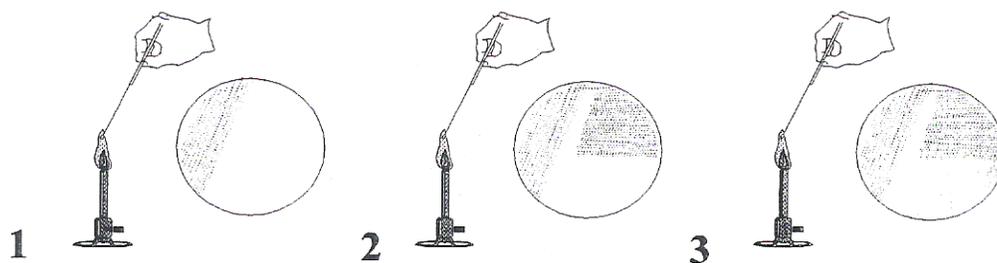


Fig. 3.3 Aislamiento por agotamiento por estrías. (Díaz y col., 2005).

3er DÍA

C) MORFOLOGÍA COLONIAL: CARACTERÍSTICAS CULTURALES

INTRODUCCIÓN

En el estudio de cultivos de algunos microorganismos los criterios que se emplean para caracterizarlos incluyen las características microscópicas: tamaño, morfología celular, forma de agrupación, reacción a la tinción Gram fig. 1, formación de esporas y características culturales o macroscópicas (cuadro 1) en medios líquidos, semisólidos y sólidos (Fig. 2, 3 y 4) en los que presentan patrones de desarrollo.

Las características microscópicas son:

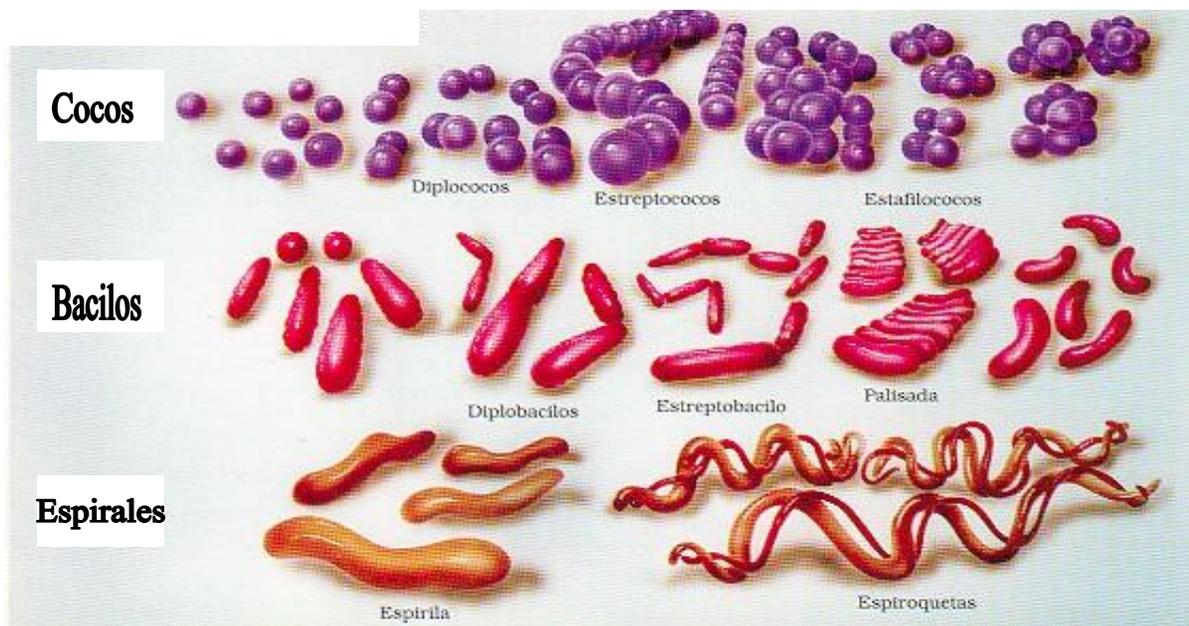


Fig. 3.4 Ejemplos de morfología microscópica. (Escobar Gutiérrez A., Atlas de Bacteriología. 2ª. Barcelona, Editorial Scheramex, 1999)

Las características de cultivo observables en medio líquidos son:

1. Crecimiento superficial: a) flocculado, b) anillado, c) pelliculado o d) membranoso.
2. Opacidad: a) ligera, b) persistente ó c) nula.
3. Cantidad de sedimento: a) escaso, b) abundante ó c) nulo.

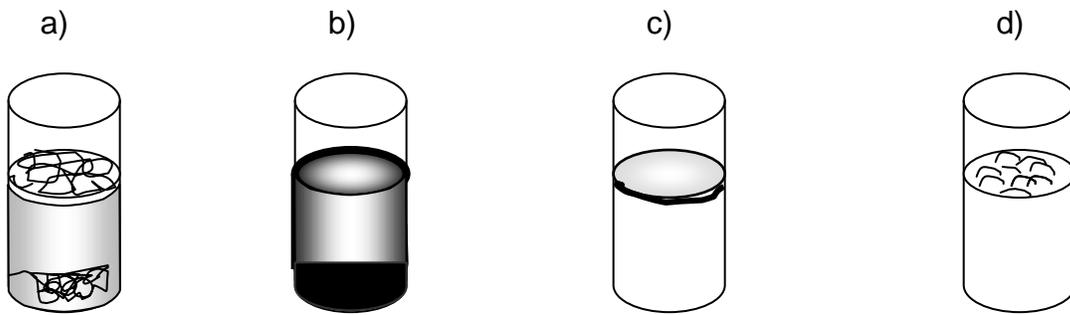


Fig. 3.5 Características culturales en medios líquidos

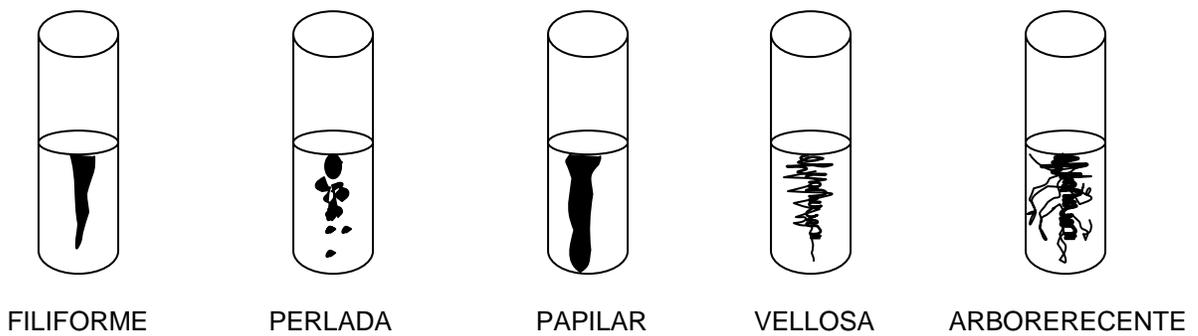


Fig. 3.6 Características culturales en medios semisólidos

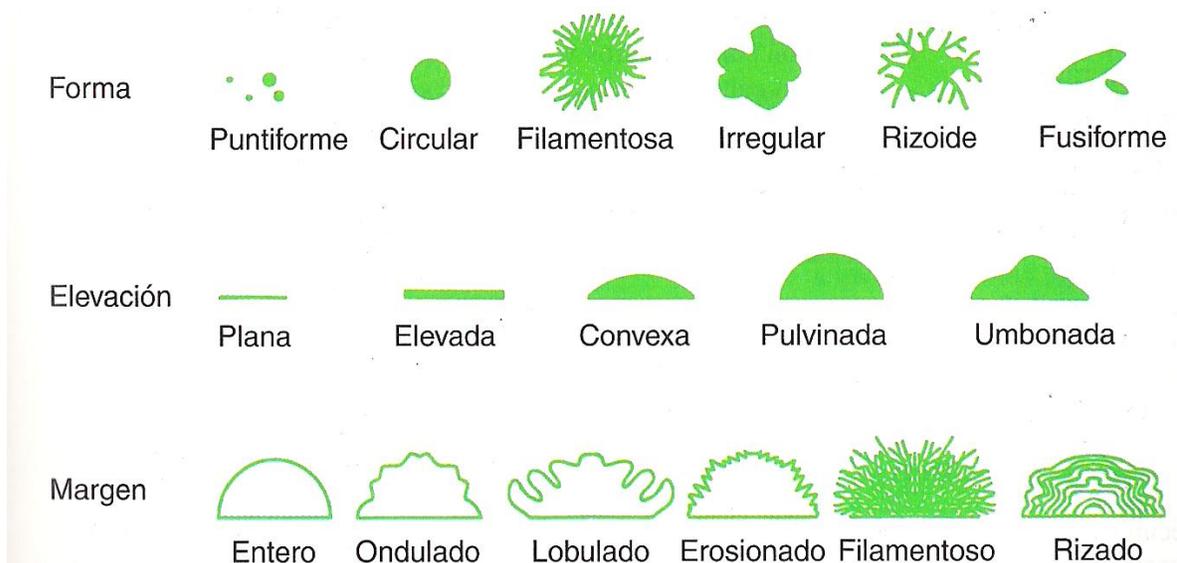


Fig. 3.7 Ejemplos de morfología macroscópica en medio sólido. (Prescott y col., 2008).

Existen algunos microorganismos que en agar sangre dan una hemólisis típica, que puede orientar para la identificación de los microorganismos, esta hemólisis puede ser:

Alfa (α): Coloración verde del agar sangre alrededor de las colonias con ligera aclaración.

Beta (β): Zona de aclaración completa del agar sangre alrededor de las colonias.

Gama (γ): hay cambio en el medio que rodea a las colonias, no hay lisis de los glóbulos rojos.

MATERIAL

- Cultivos de microorganismos en medios simples, enriquecidos, selectivos y diferenciales en caja Petri con colonias aisladas.
- Estereoscopios.
- Regla o Vernier.

MÉTODO

1. Realizar las observaciones pertinentes tales como: Forma, elevación y bordes con ayuda del estereoscopio de 3 diferentes colonias en medios sólidos.
2. Describir las características culturales de los microorganismos cultivados en tubo.
3. Familiarizarse con la correcta descripción de las características hemolíticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Díaz R., Gamaso, C. López-Goñi, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ª Edición. MASSON. Barcelona. 2005.
- Escobar Gutiérrez A. Atlas de Bacteriología. 2ª Edición. Barcelona. Editorial Scheramex.1999.
- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Janda W.M., Sommers H.M., Winn.W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. 6ª Edición. USA. Ed. Médica Panamericana.2008.
- Tortora, Funke, Case. Microbiología. 9ª Edición. San Francisco. Ed. PEARSON, 2007.



CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Curva de crecimiento.
2. Medición del crecimiento
3. Manejo y tratamiento de sustancias químicas peligrosas

OBJETIVO GENERAL

- Conocer los métodos utilizados para cuantificación de microorganismos, así como analizar sus ventajas y desventajas

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las múltiples técnicas utilizadas comúnmente para la cuantificación de microorganismos.
- Identificar y evaluar el método de vertido en placa por duplicado para cuenta de células vivas

INTRODUCCIÓN

Existen dos procedimientos para contar a los microorganismos en una muestra dada, los métodos de cuenta de células totales y los métodos de cuenta de células vivas Fig. 1. Los resultados de este tipo de ensayos tienen múltiples aplicaciones, tales como determinar la ausencia o presencia de la cantidad en que se encuentran estos microorganismos.

Los métodos de cuenta de células totales establecen la población total de los microorganismos existentes en una muestra, tienen la ventaja de ser rápidos, sin embargo, a través de ellos es imposible diferenciar a las células vivas de las muertas. La estimación del número total de microorganismos se realiza por turbidimetría, microscópicamente o con contadores electrónicos. Para el recuento microscópico se puede hacer por 2 métodos, el método de Bred o en la cámara de Petroff-Hauser.

Los métodos basados en la **turbidimetría** son ampliamente usados en los laboratorios de microbiología, se fundamenta en que, en una suspensión microbiana, la cantidad de microorganismos está directamente relacionada con la turbiedad o densidad óptica (D.O.) de la misma e inversamente relacionada con la cantidad de luz que pasa por la misma.

Los métodos de cuenta de células vivas únicamente determinan a los microorganismos vivos. El postulado en el que se fundamenta es que cualquier célula viva inoculada en un medio de cultivo se multiplica y produce datos de fácil identificación tales como: la formación de colonias en placas de agar, la producción de gas y cambios de pH. Algunos de ellos son el método de asa calibrada, el método de dilución y vaciado en placa, recuento por filtración de membrana, método de siembra en tubo o recuento de número más probable (NMP) y la reducción de colorantes.

Los métodos de dilución y vaciado en placa involucran la dispersión de la muestra que se estudia, en un medio de agar. Se basa en el supuesto de que cada célula bacteriana, fúngica o espora incluida en el medio con agar o en su superficie, al multiplicarse dará origen a un cúmulo de células que producen una colonia.

1er DÍA

A) ESCALA DE MCFARLAND

MATERIAL

- 5 tubos con capacidad de 10 mL con tapón
- 1 pipeta de 1.0 mL y una de 10 mL
- pipetas estériles de 5 y 10 mL
- cultivo de *Escherichia coli* en caldo nutritivo
- espectrofotómetro
- filtro de $\lambda = 625$ nm
- solución de cloruro de bario al 1%, ácido sulfúrico al 1%

PROCEDIMIENTO

1. Marcar los tubos correspondientes a la tabla de la escala.
2. Adicionar las cantidades establecidas en la tabla 1 de las sustancias indicadas.
3. Calibrar el espectrofotómetro con agua destilada y determinar la absorbancia de las diferentes mezclas.
4. Graficar en el eje de las ordenadas los valores de la DO y en las abscisas el número de bacterias

Tabla 1. ESCALA DE Mc FARLAND

CLAVE DEL TUBO	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	NÚMERO APROXIMADO DE BACTERIAS POR 10 ⁶ /mL	DENSIDAD ÓPTICA
0.5	0.05	9.95	150	0.08-0.13
1	0.1	9.9	300	
2	0.2	9.8	600	
3	0.3	9.7	900	
4	0.4	9.6	1200	
5	0.5	9.5	1500	
6	0.6	9.4	1800	
7	0.7	9.3	2100	
8	0.8	9.2	2400	
9	0.9	9.1	2700	
10	1.0	9.0	3000	

B) CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS TOTALES

PROCEDIMIENTO

1. Marcar los tubos con las concentraciones correspondientes según indique el profesor.
2. En condiciones de asepsia agregar a cada tubo el volumen necesario de cultivo de *Escherichia coli* para obtener un volumen de 10 ml
3. Calibrar el espectrofotómetro con agua destilada y determinar la turbiedad de las diferentes mezclas.
4. Calcular el número de microorganismos por mL que existe en cada tubo, interpolando las lecturas obtenidas en la gráfica obtenida con la escala de Mc Farland.
5. Verter 0.1 mL de la suspensión en el medio sólido, extender, incubar 24 horas y contar el número de UFC.

C) CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS VIVAS

MÉTODO POR ASA CALIBRADA

MATERIAL

- 2 Cajas con Agar Tripticasa de Soya y Agar Mueller Hintón
- Cultivo de *Escherichia coli* en caldo nutritivo
- Asas calibradas de 0.001 mL

MÉTODO

1. En condiciones de esterilidad el asa calibrada estéril y fría se introducirá a la suspensión problema.
2. Se inoculará la caja trazando una línea recta en el centro del agar.
3. Distribuir la descarga en la superficie del medio, en ángulo de 90 grados con respecto al inóculo.
4. Incubarlo a 37°C, invirtiendo la caja.
5. Contar las unidades formadoras de colonias (UFC) por mL.

2do DÍA

1. Revisión del gráfico de valores de la DO vs el número de bacterias.
2. Cálculo del número de unidades formadoras de colonias, escogiendo la caja de cuantificación por calibrado de bacterias vivas (sesión anterior) en la que puedan ser contables las colonias.

MÉTODO POR VACIADO EN PLACA

MATERIAL

- Cajas de Petri estériles
- Agar esterilizado para Métodos Estándar

MÉTODO

1. Se debe de tener la cantidad de cajas de Petri necesarias para el vertido en placa
2. Se debe de considerar que el volumen adecuado para cada caja es de aprox. 20 mL
3. Una vez esterilizado el medio, se deja enfriar a una temperatura entre 40 y 50°C.
4. Cada una de las cajas deben de estar identificadas con el nombre o siglas del medio.
5. Se vierte 1 mL de la suspensión problema a la base de la caja de Petri.
6. El medio se deposita en la base de la caja de Petri, evitando la formación de burbujas.
7. Se homogeniza la mezcla y se deja reposar hasta su solidificación.
8. Se incuba a 37°C, invirtiendo la caja, por 24h.

RECuento DE MICROORGANISMOS POR DILUCIONES SERIADAS

(VERTIDO EN PLACA)

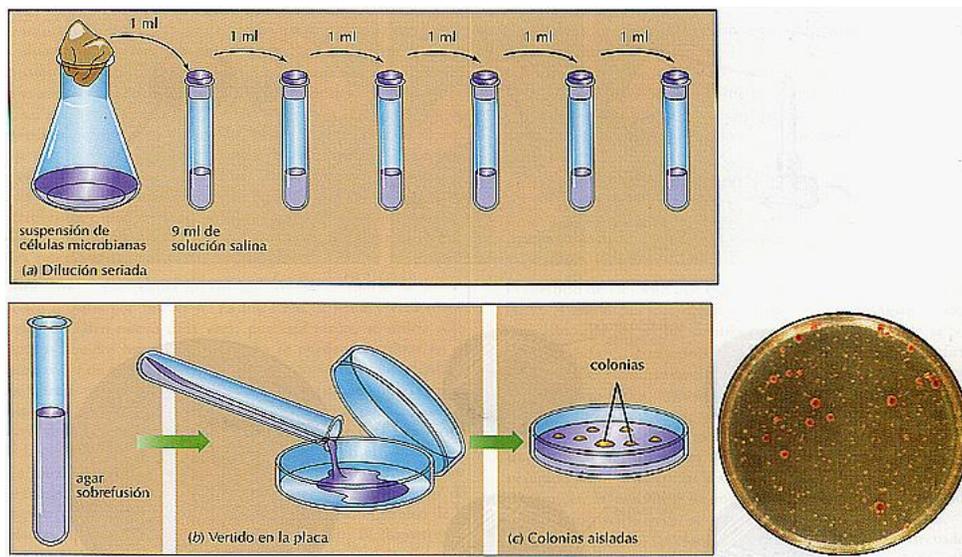


Fig. 4.1 Cuantificación de bacterias vivas.

3er DÍA

3. Revisión de las cajas de vaciado en placa (sesión anterior) para la cuantificación de bacterias vivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Díaz R., Gamaso, C. López-Goñi, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ª Edición. MASSON. Barcelona.2005
- Tortora, Funke, Case. Microbiología. 9ª Edición. San Francisco. Ed. PEARSON. 2007.



ACTIVIDAD BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Fundamentos del metabolismo microbiano
2. Generación heterotrófica del ATP
3. Fermentación
4. Catabolismo de proteínas y lípidos
5. Pruebas bioquímicas para identificar microorganismos comunes

OBJETIVO GENERAL

- Conocer, comprender y analizar las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación correcta de diferentes microorganismos

OBJETIVOS PARTICULARES

- El alumno pondrá en práctica las técnicas de siembra aprendidas en la siembra de pruebas bioquímicas para identificación de microorganismos
- El alumno analizará los resultados obtenidos debido a la actividad metabólica de los microorganismos en estudio y concluirá para emitir un resultado

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos tienen la capacidad de efectuar una serie de reacciones que les permiten incorporar y transformar a diversos compuestos. El término metabolismo se refiere al conjunto de reacciones que se dan en la célula y que conducen a la transformación de diversos compuestos, en estas transformaciones participan diferentes enzimas que catalizan reacciones (tablas 1-5). La mayor parte de las pruebas que se utilizan para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de bacterias, por medio de lo cual puede hacerse una identificación final de especie, se lleva a cabo mediante el subcultivo del aislamiento primario en una serie de medios diferenciales, cuyos resultados de incorporar o transformar los nutrientes de cada medio se interpretan para lograr la identificación del microorganismo problema al cabo de 24 hrs. de incubación a 37°C. (Fig. 1, 2 y 3).

1er DÍA

A) INOCULACIÓN Y SIEMBRA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

EJERCICIO.- PRUEBAS BIOQUÍMICAS

MATERIAL

1. Lápiz graso o marcador
2. Mechero de Bunsen
3. Asas y portaojetos
4. Gradillas
5. Pruebas bioquímicas: A. Citrato de Simmons, A. Hierro de Kligler, A. FEA, A. LIA, Medio SIM, Gelatina, Medio MIO, C. Urea, C. Malonato y Medio VP-RM.
6. Reactivos reveladores de pruebas bioquímicas: oxidasa (clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina), solución de rojo de metilo, α -naftol, hidróxido de potasio, peróxido de hidrógeno, reactivo de Kovacs o reactivo de Ehrlich.
7. Cultivo de 18-24 horas de: *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, *Enterobacter sp.*, *P. mirabilis* y *P. vulgaris*, *Serratia marcescens*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y ECN y otros.

MÉTODO

1. Se manejarán dos cultivos por persona (control y problema) los cuales para poder verificar que están puros se observarán sus características macroscópicas culturales y se les hará tinción de Gram, para efectuar las diferentes pruebas bioquímicas, a los microorganismos en estudio. (Figura 6.1)
2. Si después de la identificación se tienen un microorganismo presente sugestivo de enterobacteria, se procede a la siembra en las pruebas bioquímicas, primero debemos sembrar en citrato de Simmons, para después sembrar en medios líquidos, después sembramos en medios semisólidos por picadura y por último en medios sólidos en pico de flauta.
3. Incubar los tubos de las pruebas bioquímicas (37°C) con excepción de la prueba de gelatina (se debe dejar a temperatura ambiente), los cuales se observarán a las 24 horas (siguiente sesión).
4. Se les coloca los reactivos reveladores de la reacción bioquímica que se llevó a cabo, se realiza la interpretación de los resultados comparando con los cambios con pruebas bioquímicas control o bien con las de sus compañeros.

A.- UTILIZACIÓN DE CITRATO

MÉTODO

1. Marcar los tubos y gradillas con el nombre y equipo.
2. Identificar los tubos como control (iniciales del microorganismo) y problema.
3. En condiciones de asepsia, tomar una asada (asa en punta) del cultivo, inocular el tubo con el microorganismo correspondiente.
4. Incubar a 37°C durante 24h.
5. Después de la incubación, observar si hubo desarrollo.
6. El medio se alcaliniza y se torna azul, indicando una prueba positiva

B.- PRUEBA DE ROJO DE METILO

MÉTODO

1. Identificar los tubos como control (iniciales del microorganismo) y problema.

2. En condiciones de asepsia, tomar una asada del cultivo, inocular el tubo con el microorganismo correspondiente.
3. Incubar a 37°C durante 24h.
4. Agregar a cada uno de los tubos 5 gotas del indicador rojo de metilo.
5. La presencia de un pH menor a 4.4 da una coloración roja indicando una prueba positiva.

C.- PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER

MÉTODO

1. Identificar los tubos como control (iniciales del microorganismo) y problema.
2. En condiciones de asepsia, tomar una asada del cultivo, inocular el tubo con el microorganismo correspondiente.
3. Incubar a 37°C durante 24h.
4. Al finalizar el período de incubación, añadir 0.6 mL de alfa-naftol y 0.2 mL de hidróxido de potasio (es esencial que se agreguen los reactivos en este orden).
5. Agitar cuidadosamente los tubos para exponer el medio al oxígeno y dejarlos reposar durante 10 a 15 minutos.
6. Después del tiempo de reposo el desarrollo de un color rojo indica una prueba positiva.

D.- PRUEBA DE LA UREASA

MÉTODO

1. Identificar los tubos como control (iniciales del microorganismo) y problema.
2. En condiciones de asepsia, tomar una asada del cultivo, inocular el tubo con el microorganismo correspondiente.
3. Incubar a 37°C durante 24h.
4. Observar los cambios, el desarrollo de un color rosa intenso indica una prueba positiva.

E.-INDOL

MÉTODO

1. Identificar los tubos como control (iniciales del microorganismo) y problema, la prueba se puede valorar en los medios semisólidos SIM (Sulfhídrico-Indol-Movilidad) ó en el medio MIO (Movilidad- Indol-Ornitina).
2. En condiciones de asepsia, tomar una asada (asa en punta) del cultivo, inocular el tubo con el microorganismo correspondiente.
3. Incubar a 37°C durante 24h.
4. Al finalizar el período, añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs, si se emplea el reactivo de Erlich, este paso debe ser precedido por la adición de 1 mL de cloroformo.
5. El desarrollo de un anillo color fucsia en la parte superior del medio segundos después de añadir el reactivo indica una prueba positiva.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

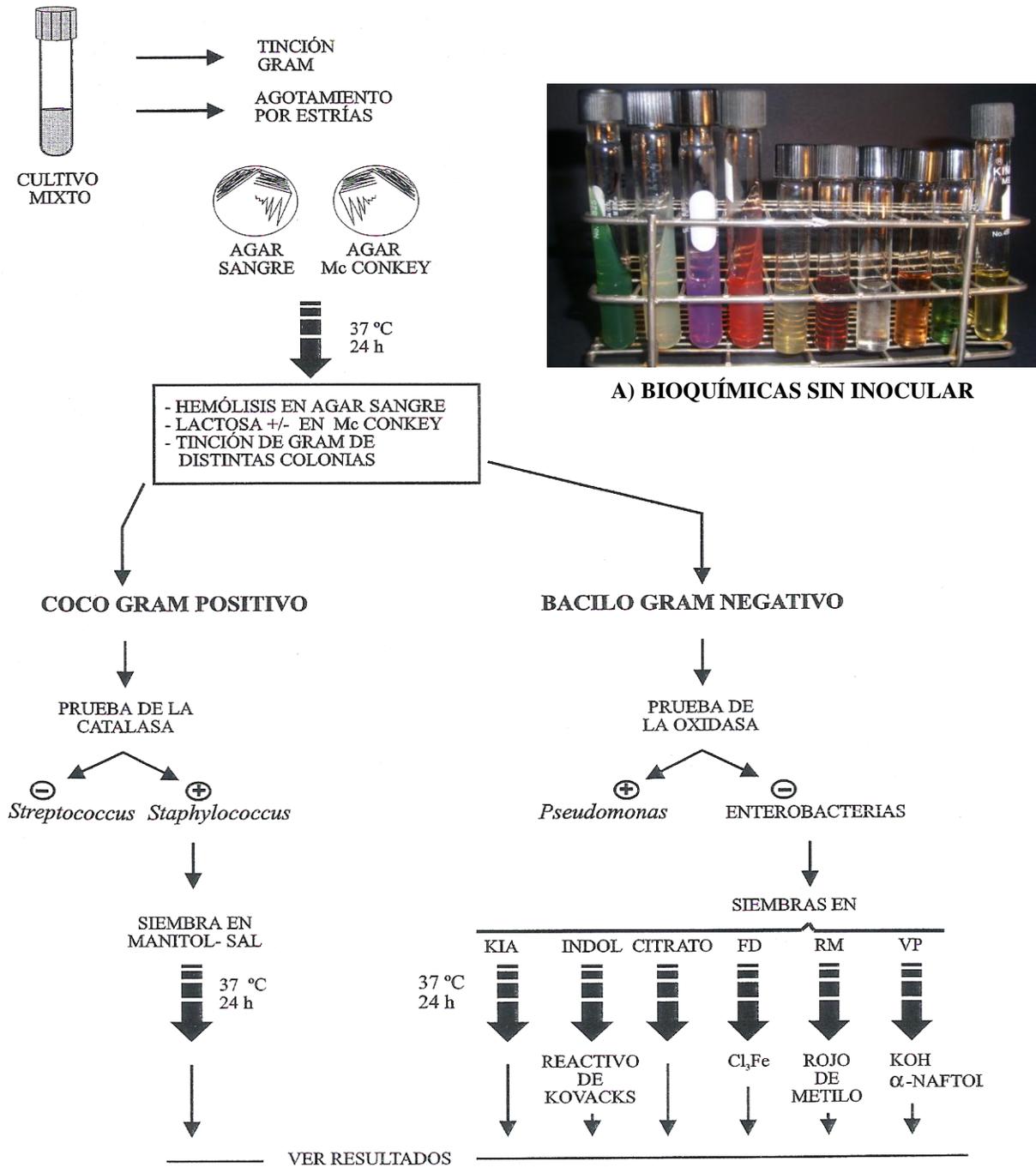


Fig. 5.1 Cultivo, tinción de Gram, siembra e identificación bacteriana. (Díaz y col., 2005). A) Bioquímicas sin inocular.

2do DÍA

B) REVELADO DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

1. Observación de todos los tubos después de 18 - 24 horas y se compararan los cambios con pruebas bioquímicas sin sembrar.
2. Se les coloca los reactivos reveladores de la reacción bioquímica que se llevó a cabo e interpretamos nuestros resultados. (Te puedes ayudar con la Tabla 2, 3, 4)

TABLA 1 DESCRIPCIÓN Y APLICACIÓN DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba bioquímica	Descripción	Aplicación en el laboratorio
Fermentación de hidratos de carbono	Durante el crecimiento fermentativo con azúcares o alcoholes de azúcares se produce ácido y/o gas.	La fermentación de azúcares específicos se emplea para diferenciar bacterias entéricas así como otros géneros o especies.
Catalasa	Detecta la presencia de catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y O ₂ .	Se emplea para diferenciar <i>Streptococcus</i> (-) de <i>Staphylococcus</i> (+) y <i>Bacillus</i> (+) de <i>Clostridium</i> (-)
Coagulasa	Detecta la presencia de coagulasa. La coagulasa hace que el plasma se coagule.	Es una prueba importante para diferenciar <i>Staphylococcus aureus</i> (+) de <i>S. epidermidis</i> (-).
Utilización de citrato	Cuando se emplea citrato como fuente exclusiva de carbono, alcalinizando el medio.	Se emplea en la clasificación de las bacterias entéricas. <i>Klebsiella</i> (+), <i>Enterobacter</i> (+), <i>Salmonella</i> (a menudo +), <i>Escherichia coli</i> (-), <i>Edwardsiella</i> (-).
Descarboxilasas (arginina, lisina, ornitina)	La descarboxilación de aminoácidos libera CO ₂ y amina.	Se emplea en la clasificación de las bacterias entéricas.
Prueba de la β-galactosidasa (ONPG)	Demuestra la presencia de una enzima que escinde la lactosa en glucosa + galactosa.	Se emplea para diferenciar bacterias entéricas. (<i>Citrobacter</i> +, <i>Salmonella</i> -) y para identificar <i>Pseudomonas</i> .
Licuefacción de gelatina	Detecta si una bacteria produce o no proteasas que hidrolizan la gelatina y causan licuefacción de un medio sólido de gelatina.	Se emplea en la identificación de <i>Clostridium</i> , <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Flavobacterium</i> .
Ácido sulfhídrico (H ₂ S)	Detecta la formación de sulfuro de hidrógeno a partir del aminoácido cisteína por la desulfurasa de cisteína.	Importante en la identificación de <i>Edwardsiella</i> , <i>Proteus</i> y <i>Salmonella</i> .
IMV:C (indol; rojo de metilo; Voges-Proskauer; citrato)	El "Indol", si la bacteria tiene la enzima triptofanasa detecta la producción de indol a partir del aminoácido triptófano. El "Rojo de metilo" es un indicador de pH para determinar si la bacteria ha producido ácido a partir de la glucosa, por la vía de la fermentación ácida mixta. El "Voges-Proskauer" detecta la producción de acetoína como principal subproducto y menos cantidad de ácidos fuertes.	Se emplea para diferenciar <i>Escherichia coli</i> (RM +, VP -, indol +) de <i>Enterobacter sp.</i> (RM -, VP +, indol -) y <i>Klebsiella pneumoniae</i> (RM -, VP +, indol -); también se emplea para caracterizar a los miembros del género <i>Bacillus</i> .
Reducción de nitratos	Detecta si una bacteria puede emplear nitrato como aceptor de electrones.	Se emplea en la identificación de bacterias entéricas que habitualmente son +.
Oxidasa	Detecta la presencia de citocromo c oxidasa, que es capaz de reducir el O ₂ y aceptores artificiales de electrones.	Importante para diferenciar <i>Neisseria</i> y especies de <i>Moraxella</i> (+) de <i>Acinetobacter</i> (-) y bacterias entéricas (todas-) de <i>Pseudomonas</i> (+).
Ureasa	Detecta la enzima que desdobra la urea en NH ₃ y CO ₂ .	Útil para diferenciar <i>Proteus sp.</i> , <i>Providencia rettgeri</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> (+) de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella sp.</i> y <i>Escherichia coli</i> (-).

Los resultados de las pruebas bioquímicas se leen de acuerdo a las tablas siguientes, para identificar el microorganismo presente sugestivo de enterobacteria.

TABLA 2

PRUEBA	INTERPRETACIÓN
Fermentación de glucosa en medio de kligler	(+) es enterobacteria
Oxidasa	(-) es enterobacteria
Reducción de nitratos a nitritos	(+) es enterobacteria

TABLA 3

LACTOSA POSITIVA EN AGAR MAC CONKEY		
PRUEBA	RESULTADO	RESULTADO
Lactosa en medio Kligler	(+)	Tribu <i>Escherichiae</i> , <i>Klebsiellae</i>
Citrato	(-)	<i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> (lactosa negativo)
Movilidad	(-)	<i>Klebsiella</i> y <i>Shigella</i> (lactosa negativo)
Voges Proskauer	(+)	Enterobacter, <i>Serratia</i> y <i>Klebsiella</i>
Pigmento rosa propio	(+)	<i>Serratia marcescens</i>

TABLA 4

LACTOSA NEGATIVA EN AGAR MAC CONKEY		
PRUEBA	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Lactosa en medio Kligler	(-)	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> y <i>Morganella</i>
H ₂ S en Kligler, SIM o LIA	(+)	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Citrobacter</i> (generalmente lactosa positivo).
	(-)	<i>Morganella</i>
Finilalanina desaminasa	(+)	<i>Proteus</i> y <i>Morganella</i>
	(-)	<i>Salmonella</i>
Urea de Stuart	(+)	<i>Proteus</i> y <i>Morganella</i>
Movilidad	(-)	<i>Shigella</i>
	(V)	<i>Morganella</i>
	(+)	<i>Proteus</i> y <i>Salmonella</i>
Malonato	(+)	<i>Salmonella arizonae</i>
	(-)	<i>Salmonella sp.</i>

TABLA 5.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA DIFERENCIACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Other Shigella</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Typical Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella anthonae</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
Indol	+	-	<	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	<	<	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato de Simmons	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido Sulfidrico	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KCN	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina (22°C)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina descarboxilasa	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	V	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	V	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas de D-glucosa	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	V	-	V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manitol	+	+	V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	V	-	V	-	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	V	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
i (meso) Inositol	-	-	-	-	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	V	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	+	+	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	V	-	V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnosa	V	+	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

PRUEBAS BIOQUÍMICAS TRADICIONALES PARA ENTEROBACTERIAS



Fig. 5.2 También se utilizan para bacilos Gram negativos oxidasa positivo ej. *V. cholerae* O1

Api 20 E pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas con una base de datos para enterobacterias y otros Bacilos Gram Negativos



Fig. 5.3 Tira con 20 sustratos que además de identificar enterobacterias permite la identificación de otros Bacilos Gram negativos oxidasa positivos como *V. cholerae* y *Pseudomonas sp.* etc.

3er DÍA

C) INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Discusión de la relevancia del microorganismo encontrado e interpretación de la prueba API

BIBLIOGRAFÍA

- Koneman/Allen/Dowell/Janda/Sommers/Win. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. USA: 6ª. edición. Ed. Médica Panamericana. USA 2008.
- Mac. Faddin Jean F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª. edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina. 2003.
- Prescott, Harley, Klein. Microbiología. 7ª edición. Ed. Mc Graw-Hill. España. 2008.



SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Generalidades sobre los antibióticos y su clasificación
2. Mecanismos de acción de los antibióticos
3. Métodos estandarizados para realizar pruebas de susceptibilidad

OBJETIVO GENERAL

- El alumno conocerá los diferentes métodos para realizar pruebas de susceptibilidad basados en lineamientos internacionales.

OBJETIVOS PARTICULARES

- El alumno desarrollara habilidades para la realización de las pruebas de susceptibilidad por el método de difusión en placa (Kirby-Bauer) apegados a la CLSI
- Realizará e interpretará la técnica por dilución en tubo para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB), apegados a la CLSI

INTRODUCCIÓN

La medicina moderna depende de los quimioterapéuticos, productos químicos que se emplean para tratar las enfermedades. La mayoría de estos agentes son **antibióticos**, productos microbianos o sus derivados que pueden matar a los microorganismos. El descubrimiento de los antibióticos y el desarrollo de nuevos fármacos más potentes han transformado la medicina moderna y ha aliviado el sufrimiento humano, además de que se han revelado excepcionalmente útiles en la industria, la investigación, etc.

El éxito de un antibiótico depende de su toxicidad selectiva, es decir debe de matar al microbio patógeno causando el menor daño posible en el huésped. Estos agentes tienen efectos indeseables sobre el huésped denominados efectos secundarios, por ello la administración de antibióticos debe de ser controlada.

Los antibióticos tienen un espectro de acción determinado según sus características y su mecanismo de acción, es decir la forma en que van a inactivar a los microorganismos. Esta acción puede ser de amplio espectro que significa que es eficaz contra una gran gama de microorganismos o de espectro reducido, que actúan contra determinados microorganismos. Para un tratamiento correcto es necesario determinar la eficacia antimicrobiana de uno o varios antibióticos frente a los patógenos, lo cual se estima con las pruebas de sensibilidad, que pueden ser por dilución de un solo antibiótico (Fig. 1) contra un determinado microorganismo o difusión en agar en las que se ponen diferentes antibióticos contra un solo microorganismo (Fig. 2)

Dentro de las pruebas de dilución se encuentra la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Tabla 1), la cual es la concentración más baja de un fármaco que impide el crecimiento de un determinado patógeno, esto detectado por la ausencia de turbidez. En la actualidad se han desarrollado varios sistemas automatizados para realizar CMI.

De las pruebas de sensibilidad por difusión en agar, la más empleada es el método de **Kirby-Bauer**, el cual consiste en estandarizar la cantidad de microorganismo (estándar de Mc Farland) e inocular el microorganismo en un medio sólido (Mueller-Hinton), el cual deberá cumplir con condiciones específicas de pH, nutrientes y espesor de 4mm, para posteriormente colocar pequeños discos de papel impregnados de los antibióticos de interés (sensidiscos), la actividad de estos antibióticos ante el microorganismo se determina comparando en tablas los diámetros de la zona de inhibición con los diámetros obtenidos en el medio 24h después de su incubación, de esta comparación se va a determinar si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente a cada uno de los fármacos analizados.

1er DÍA

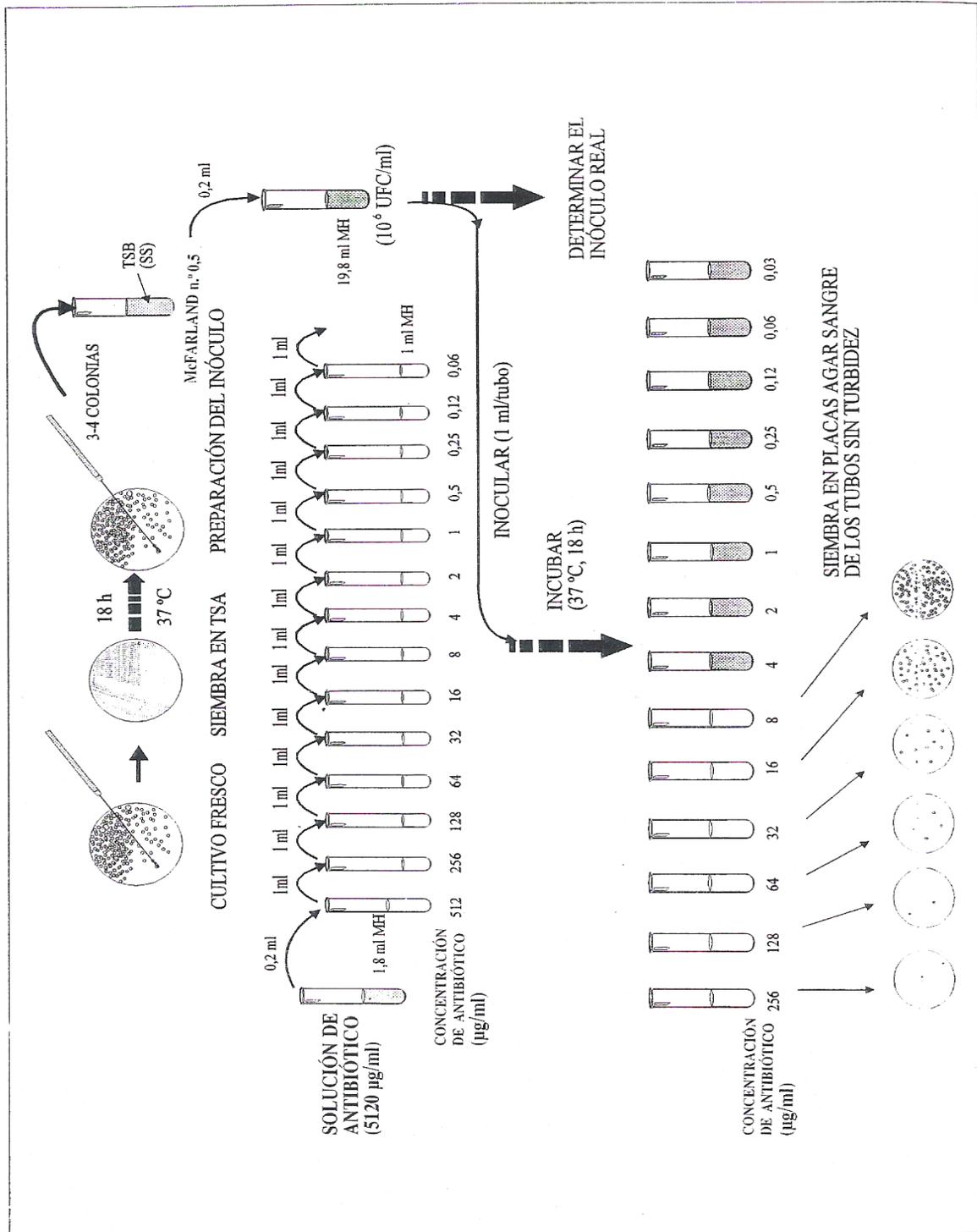
A) CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

MATERIAL

- Lápiz graso o marcador
- Gradillas
- 15 tubos de ensayo de 13 x 100
- Pipetas serológicas de 10, 5 y 1mL estériles
- Cultivo de 24 h. de *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*
- Estándar de Mc Farland del tubo 0.5 como referencia para determinar la concentración de microorganismos a usar. Antibiótico: Amikacina
- 15 mL de caldo Mueller Hinton

MÉTODO

1. Marcar los tubos del número 1 al 15.
2. Preparar la solución de antibiótico a una concentración de 512 µg / mL.
3. Preparar la suspensión bacteriana con el de Mc Farland de 0.5.
4. Agregar a los tubos 1 y 2, 1 mL del antibiótico (Amikacina 512 µg / mL).
5. Adicionar del tubo número 2 al 15, 1 mL de caldo Mueller Hinton
6. Realizar diluciones seriadas transfiriendo 1 mL del tubo 2 al tubo 3 hasta el tubo13, el mL sobrante del tubo 13 se desecha.
7. Agregar 1 mL de la suspensión de microorganismo del tubo 1 al tubo 14. El tubo 15 es el control negativo.
8. Incubar de 35 a 37°C, por 18 a 24h.
9. Interpretar la turbidez y comparar el punto de corte para la CMI. (Figura 1).
10. Para la CMB sembrar los tubos sin turbidez incluyendo los controles + y -.



Determinación de la CMI y CMB. Método de dilución en caldo.

Fig. 1 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida. (Díaz y col., 1999).

TABLA 1 CMI. MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

TUBO NÚMERO	CALDO DILUYENTE (mL)	ANTIBIÓTICO AGREGADO (mL)	SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMO (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL DE ANTIBIÓTICO (µg/mL)
1	NADA	1	1	512
2	1	1	1	256
3	1	1	1	128
4	1	1	1	64
5	1	1	1	32
6	1	1	1	16
7	1	1	1	8
8	1	1	1	4
9	1	1	1	2
10	1	1	1	1
11	1	1	1	0.5
12	1	1	1	0.25
13	1	1	1	0.12
14	1	NADA	1	Control (+)
15	1	NADA	NADA	Control (-)

2do. DÍA

Revisar los resultados de la sesión anterior, determinando cuál es el tubo donde se observa el punto de corte (CMI) y sembrar para obtener la CMB.

B) TÉCNICA DE KIRBY-BAUER O DE DIFUSIÓN EN PLACA**MATERIAL**

- Lápiz graso o marcador
- 1 caja de agar Mueller-Hinton
- Hisopo estéril
- 1 tubo estéril con solución salina al 0.85%
- Cultivo de 24 h de *Escherichia coli* o *Serratia marcescens*
- Estándar de Mc Farland del tubo 0.5
- Pinza metálica de disección
- Sensidiscos

MÉTODO

1. Marcar la caja con el nombre del microorganismo, fecha, hora y nombre del alumno que realiza la prueba.
2. Preparar la suspensión del microorganismo, en un tubo con 3 mL de solución salina estéril, comparando la turbidez con el estándar de Mc Farland de 0.5.
3. Impregnar el hisopo en la suspensión del microorganismo, quitando el exceso en las paredes internas del tubo e inocular la caja de agar Mueller Hinton con 4mm de grosor por técnica invasiva cubriendo la totalidad de la superficie del agar.
4. Esterilizar las pinzas metálicas con alcohol de 96° flamear de 2-3 veces y enfriar.
5. Con la pinza tomar los sensidiscos y colocarlos en la superficie del agar presionando.
6. Cuidar la distribución de los sensidiscos e invertir la caja y incubar a 37°C, por 24h.

7. Medir en milímetros los halos de inhibición con un vernier o regla convencional y comparar los resultados en las tablas de referencia de la CLSI. Anexo 2
8. Reportar sensible, intermedio o resistente, según corresponda (Fig. 6.1)

MÉTODO DE DIFUSIÓN DE KIRBY-BAUER

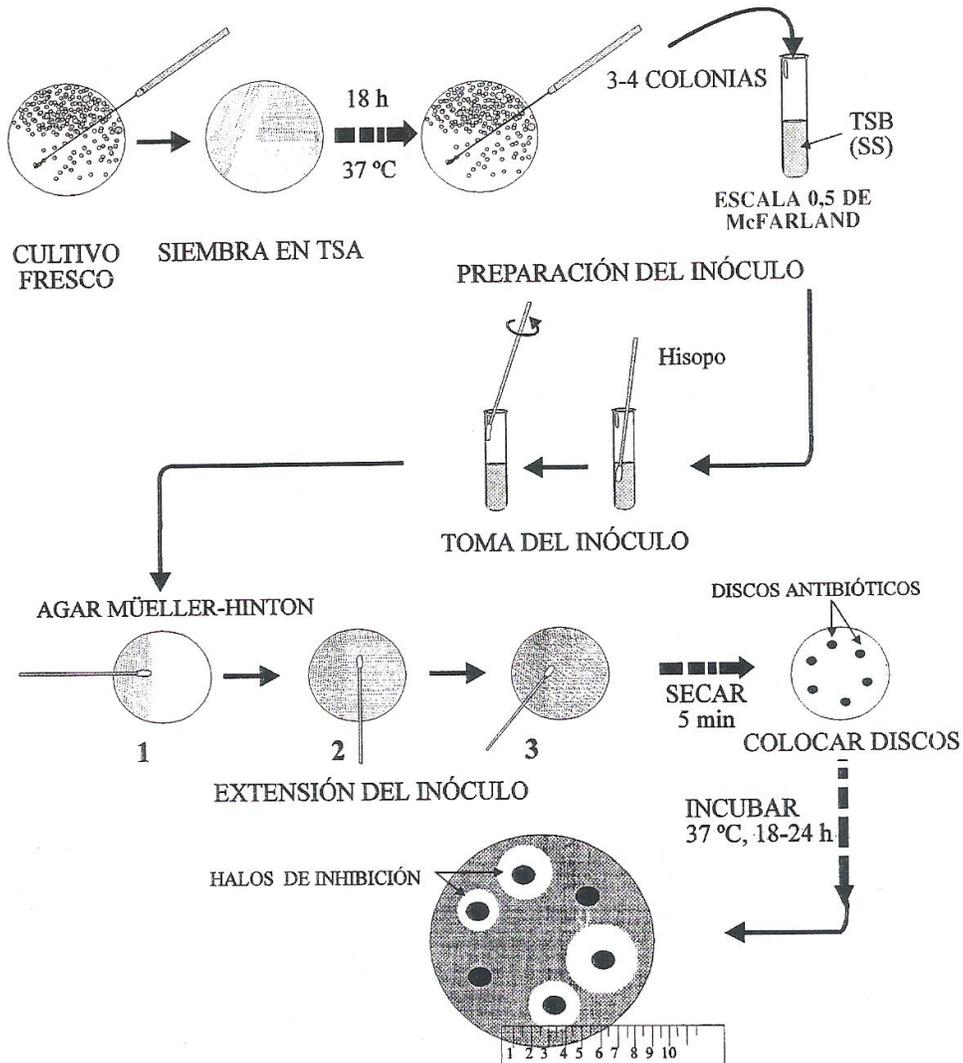


Fig. 6.1 Antibiograma. (Díaz y col., 2005).

3er DÍA.

Revisión de los resultados del método de difusión de Kirby-Bauer.

BIBLIOGRAFIA

- Díaz R., Gamaso, C. López-Goñi, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ª Edición. MASSON. Barcelona. 2005
- Koneman/Allen/Dowell/Janda/Sommers/Win. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. USA: 6ª. edición. Ed. Médica Panamericana. USA 2008.
- Prescott, Harley, Klein. Microbiología. 7ª edición. Ed. Mc Graw-Hill. España. 2008.



PARASITOLOGÍA

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Generalidades sobre protozoos y helmintos.
2. Formas parasitarias de helmintos y protozoos comunes.
3. Principios básicos sobre microscopía.

OBJETIVO GENERAL

- Realizar la búsqueda de formas parasitarias de protozoarios y helmintos intestinales en hortalizas, agua y suelo por métodos de concentración y sedimentación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la búsqueda de formas parasitarias de protozoarios y helmintos intestinales en:
 - Hortalizas expandidas en mercados públicos y privados de la ciudad de San Luis Potosí; mediante la técnica de centrifugación.
 - Muestras de agua potable, de grifo o estancada; mediante la técnica de centrifugación.
 - Muestras de tierra de diferentes sitios mediante la técnica de reposo con solución salina, aplicando el método de concentración por sedimentación con Birj-35 al 0.3%

A) BUSQUEDA DE PARÁSITOS INTESTINALES EN HORTALIZAS

INTRODUCCION

El consumo de frutas y hortalizas es vital para la salud humana puesto que poseen innumerables propiedades alimenticias, son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía. Sin embargo, por sus características físicas, algunos de estos productos están expuestos a contaminación de tipo biológico y químico, situación que genera un riesgo para la salud humana. Al momento de la compra, las frutas y hortalizas aparte de parecer frescas y apetitosas, también deben estar libres de residuos químicos, hongos, parásitos o insectos, que aunque en ocasiones no destruyen los productos macroscópicamente si perturban silenciosamente la salud del consumidor, que sin conocer estos riesgos compra el producto sin mayor atención.

Las buenas prácticas agrícolas garantizan la obtención de frutos de alta calidad, la protección del medio ambiente, la salud de los trabajadores y la inocuidad de los productos agrícolas. Sin embargo, se presentan casos de contaminación producidos por el uso de agua de riego contaminada con heces fecales humanas y animales, por los procesos inadecuados en los campos de cultivo, practicas deficientes de desinfección,

condiciones inapropiadas durante el empaqué, higiene deficiente de los trabajadores y el mal manejo durante su almacenamiento, estos alimentos son transportados directamente desde los cultivos a los puntos de distribución donde el consumidor los compra de manera libre, siendo llevados a los hogares donde no son lavados de manera adecuada generando de esta forma que los alimentos se conviertan en un riesgo para la población.

Los parásitos intestinales son una de las consecuencias de la ingesta de estos productos, por este motivo se deben las prácticas agrícolas al momento de la distribución de los productos frutihortícolas a las ciudades y exigir estas pruebas a los comercializadores para disminuir el riesgo.

Una vez vendido el producto se hace muy difícil garantizar la manipulación adecuada y los riesgos epidemiológicos solamente irían dirigidos hacia el manejo de los alimentos en el hogar cerrando el ciclo de concientización de la comunidad del buen lavado y buena cocción de los alimentos.

La identificación de parásitos en frutas y hortalizas en una forma de disminuir y prevenir la parasitosis causada por los alimentos contaminados, por esta razón vigilando los puntos críticos de los procesos de producción y buscando la forma de removerlos antes de que el producto salga a la venta o antes del consumo son estrategias de prevención de este tipo de infección.

Sin embargo, los métodos conocidos para estos procesos no están validados lo que hace que no se tenga registro de calidad y se conviertan en un problema de salud pública en cualquier país del mundo.

MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

MATERIAL

Gradillas
Pipetas de plástico con dispensador
Pisetas
Probeta 1000ml
Portaobjetos y cubreobjetos
Tubos de centrifuga de 13 x 100mm
Vasos de 600ml

EQUIPO

Centrifuga
Microscopio

Balanza analítica

3.3 REACTIVOS

Soluciones
Solución salina isotónica
Solución de Lugol

3.4 OTROS

Preparaciones fijas permanentes
Preparaciones en fresco

3.5 ESPECIMEN

Hortalizas

BUSQUEDA DE PARÁSITOS INTESTINALES (PROTOZOARIOS Y HELMINTOS) MEDIANTE LA TECNICA PROPUESTA POR ALVAREZ et al, MODIFICADA.

COLECTA Y CONSERVACIÓN DE LAS HORTALIZAS

Las muestras de hortalizas (lechuga romana, lechuga orejona, chile serrano, espinaca, acelga, cilantro, zanahoria, papa, calabaza, perejil) se colectan en mercados públicos, privados y tianguis, en cantidad aproximada de 100g.

Preparación de muestras:

1. Las hortalizas deben estar frescas y en perfecto estado macroscópico al momento del muestreo.
2. Las muestras de hortalizas se dejan en remojo en solución salina 0.85% por 24 horas en vasos de vidrio limpios.
3. Se le coloca a cada uno de los vasos una etiqueta con los datos de la muestra (número y tipo de hortaliza).
4. Las hortalizas se deshojan y se cortaran en trozos.
5. Se pesaran 40g de cada una de las hortalizas en una balanza Granataria.
6. Se colocaran en los vasos de vidrio y se les agregara 400ml de solución salina 0.9%.
7. Se agitara el contenido fuertemente y dejar en reposo 24 horas.

PROCEDIMIENTO

Fundamento

Este método se puede aplicar para la recuperación de parásitos intestinales tanto en la fase de quiste, trofozoito, huevo y larva en legumbres. La técnica es la propuesta por Álvarez y colaboradores, Universidad de Zulia, Venezuela 1981.

Técnica:

1. Trascorridas las 24 horas se retiraran las muestras
2. Dejar el agua de reposo una hora mas
3. Decantar el agua 9/10 partes de la solución (sobrenadante)
4. El sedimento se coloca en tubos de vidrio de 13 x 100.
5. Se lleva a centrifugación por 10 minutos a 3000rpm.
6. Se descarta el sobrenadante para obtener la muestra final para la revisión microscópica
7. Con una pipeta de plástico con dispensador se toma una cantidad del sedimento el cual se coloca en un portaobjetos previa adición de una gota de lugol.
8. Mezclar, colocar el cubreobjetos y observar al microscopio con el objetivo 10X Y 40X toda la preparación en forma de acordeón de izquierda a derecha o de arriba hacia abajo.
9. Registrar los resultados obtenidos en su instructivo de prácticas o bitácora.

BIBLIOGRAFIA

- Camargo A, Campuzano S. Estudio piloto de detección de parásitos en frutas y hortalizas expandidas en los mercados públicos y privados de la ciudad de Bogotá D.C: 77-81.
- Traviezo L, Davila J, Rodríguez R, et al. Contaminación enteroparasitaria de lechugas expandidas en mercados del estado Lara. Venezuela Parasitol. Latinoam. Jul 2004; 59(3):167-170.

B) BÚSQUEDA DE PARASITOS INTESTINALES EN AGUA

INTRODUCCION

Los suministros de agua deben ser protegidos de contaminantes fecales ya que puede con facilidad ser portadores de formas infectantes como bacterias, virus, parásitos (protozoos y helmintos), ya que estos pueden provocar diarreas, parasitosis, fiebre tifoidea hasta epidemias como el cólera.

Entre los agentes parasitarios los protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp*, *Microsporidias* y *Cyclospora sp*, son agentes etiológicos más frecuentemente identificados en los casos de transmisión por agua contaminada.

Para disminuir en la población los riesgos de contraer enfermedades gastrointestinales, es necesario contar con un programa de control de calidad del agua y que las viviendas cuenten con instalaciones hidráulicas eficientes; ya que les permitirían contar con agua para su consumo y poder realizar actividades de higiene personal, preparación y manejo de alimentos. A demás, deben contar con drenaje, letrinas, sanitarios para la eliminación de excretas humanas.

Ante la escasez de recursos hídricos, la exposición demográfica y el desarrollo industrial, la utilización de aguas residuales es una importante alternativa como fuente adicional de suministro, particularmente para riego agrícola. Sin embargo, dicha actividad tiene implicaciones negativas desde el punto de vista sanitario, ya que representa un riesgo a la salud de los trabajadores agrícolas y de los consumidores de los productos, en especial cuando se trata de aquellos que se consumen crudos como las hortalizas.

Una de las desventajas del uso de agua residual sobre todo cuando esta se emplea en el riego de cultivos, es que puede contener parásitos en especial del grupo de los helmintos ya que estos representan un elevado riesgo a la salud humana debido a que sus diversos estudios infecciosos (huevos embrionarios o larvas) y que son altamente persistentes en el agua contaminada; por lo que agua constituye un vehículo directo o indirecto de diseminación de helmintos, aun cuando se encuentran en bajas concentraciones, dando lugar a enfermedades gastrointestinales, (NMX-AA-113-SCFI-1999).

Por todo lo anterior, el abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales y otras, para lo cual se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas, químicas y radiactivas, (NO-127-SSA1-1194).

MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

MATERIAL

Crisol de Gooch

Caja de Petri

Filtros de Microfibra de vidrio

Gradillas

Pipetas de plástico con dispensador

Pisetas

Probeta 1000ml

Portaobjetos y cubreobjetos

Tubos de centrifuga de 13 x 100mm
Matraz Kitazato

EQUIPO

Centrifuga

Microscopio

Balanza analítica

Bomba de vacío a una presión
de 180-200mm Hg

3.3. REACTIVOS:

Soluciones

Solución Salina Isotonica

Solución de Lugol

Solución de Brij. 35 al 0.3%

3.4 OTROS

Preparaciones fijas permanentes

Preparaciones en fresco

3.5 ESPECIMEN

Agua

BUSQUEDA DE PARASITOS INTESTINALES (PROTOZOARIOS Y HELMINTOS) MEDIANTE LA TECNICA PROPUESTA POR HERRERA Y COLS, MODIFICADA.

PREPARACION DEL MATERIAL PARA LA COLECTA DE AGUA:

- Los recipientes para la colecta de la muestra de aguas fueron de polietileno; con capacidad de 4 litros.
- Los recipientes fueron lavados con detergente y enjuagados con agua destilada.
- Los lavados se efectuaron repetidas veces para asegurar la limpieza de los mismos.
- Los frascos se etiquetan y se identifican con número de muestra, fecha, hora, lugar de procedencia y condiciones de toma.

PROCEDIMIENTO

FUNDAMENTO

Este método se puede aplicar para la recuperación de parásitos intestinales tanto en la fase de quiste, trofozoito, huevo y larva en muestras de agua. La técnica es la propuesta por Herrera Zaragoza Liliana del Roció y colaboradores, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Parasitología, 2009.

TÉCNICA

1. Un 1L de agua problema, se filtra por el sistema de vacío, utilizando los filtros de microfibra de vidrio grado GF/C con retención de partículas de 1.2 μm .
2. Una vez que se filtra el total del volumen de 1L, los litros se retiran y se colocan en una caja Petri, los cuales se lavan con solución de Brij-35 al 30% para recuperar el sedimento obtenido; esto se realiza varias veces hasta recuperar el total del sedimento.
3. El sobrenadante de los lavados se centrifugan a 1500 rpm. durante 2 minutos.
4. Al finalizar la centrifugación, se decanta el sobrenadante y del sedimento se toma una gota con la pipeta Pasteur, depositándolo sobre un portaobjetos adicionado con una gota de Lugol diluido (1:5), se mezcla y se procede a la observación microscópica con los objetivos 10X y 40X, siguiendo un recorrido de acordeón en busca de formas parasitarias o agentes contaminantes.
5. Los resultados se registraron en la bitácora de control o en el reporte.

BIBLIOGRAFÍA

- Lura M.C, Beltramino D., Abramovich B., Carrera E., 2000. Programa de Actualización Continua en Infectología 2005.
- Biagi F., Enfermedades Parasitarias, Ed. Manual Moderno, 2004.
- Sánchez-Pérez HJ, Vargas –Morales MG 2000.
- Norma Mexicana NMX-003-1980 Aguas residuales-Muestreo.
- Norma Mexicana NMX-AA-113-SCFI-1999, Análisis del Agua y Determinación de Huevos de Helminto- Método de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental, Agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

C) BÚSQUEDA DE PARÁSITOS INTESTINALES EN EL SUELO

INTRODUCCION

En poblaciones urbanas y periurbanas, la presencia, persistencia y diseminación de parásitos intestinales (PI) se relacionan en forma directa con las características geográficas y ecológicas específicas del lugar así como con las condiciones de saneamiento básico disponibles, con factores socioeconómicos y culturales.

Las variables climáticas (temperatura, humedad, vientos) y las características del suelo son determinantes en la viabilidad y maduración de huevos y larvas de geohelminthos patógenos, mientras que los quistes y ooquistes de protozoos son relativamente más resistentes a las condiciones ambientales adversas.

La distribución en espacio y tiempo de formas infectivas de parásitos intestinales en el suelo se encuentra relacionada con las características estructurales del mismo, la presencia de cobertura vegetal y las condiciones climáticas del medio.

El éxito en la continuidad del ciclo evolutivo del parásito consistiría en la capacidad para persistir en el ambiente mediante mecanismos de resistencia inherentes a la especie.

La contaminación fecal del suelo, el agua y los alimentos, las deficientes condiciones de vida, la falta de adecuados hábitos higiénicos y un bajo nivel de instrucción son factores que favorecen la transmisión de parásitos intestinales.

La presencia de estadios parasitarios en el suelo indica la existencia de una fuente de contaminación del mismo que puede ser el agua, los animales o los humanos parasitados. Los suelos contaminados entonces, se constituyen en un factor de riesgo importante para la transmisión de parásitos a la población.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en la descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

1.1 MATERIAL

Gradillas

Pipetas de plástico con dispensador

Pisetas

Probeta del 1000 ml

Portaobjetos y cubreobjetos

Tubos de centrifuga de 13 x 100 mm

1.2 EQUIPO:

Centrifuga

Microscopio

Solución de Brij-35 al 0.3%

Balanza analítica

Bomba de vacío a una presión de 180-200 mm Hg

1.4 OTROS:

Preparaciones fijas y permanentes

Preparaciones en fresco

1.3 REACTIVOS:

Soluciones:

Solución Salina Isotónica

Solución de Iodol

1.5 ESPECIMEN:

Agua.

BÚSQUEDA DE PARÁSITOS INTESTINALES EN SUELO (PROTOZOARIOS Y HELMINTOS) MEDIANTE LA TÉCNICA PROPUESTA POR EL LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA, DE LA FCQ, UASLP, MODIFICADA.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA LA COLECTA DE SUELO

Bolsas de polietileno con cierre hermético

Etiquetas, Pala o espátula

Regla

PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA

- Delimitar las áreas haciendo un recorrido por la finca, si es posible dibujar un croquis sencillo.
- Registrar detalles importantes como: tipo de suelo, apariencia física, presencia o ausencia de vegetación, color, humedad o encharcamientos de agua, época de muestreo.
- Registrar en la etiqueta de la bolsa el número o clave de identificación de la muestra así como procedencia y el nivel del muestreo superficial o profundo.
- Retirar hojarasca o basura que cubra la superficie.
- Al recolectar tierra superficial se debe raspar de 2 a 5 centímetros de profundidad con la espátula y colocarla en la bolsa.
- Para recolectar suelo profundo se deberán retirar 30 centímetros de tierra antes de comenzar a muestrear. Una vez que se ha hecho se puede comenzar a raspar con la espátula la muestra y colocarla en la bolsa correspondiente.

TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las bolsas de las muestras se deberán guardar en hielera de unicel y transportarse al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Previo al procesamiento de la muestra por el método de Brij-35 al 30%, se deberá tratar como se describe a continuación:

- Pesar 50 g de la muestra en un vaso de precipitado de 100ml.
- Agregar 50 ml. De solución salina 0.9% y homogenizar.
- Dejar reposar 1 hora.
- Con una pipeta Pasteur tomar una muestra para montar una preparación y observar al microscopio en 10 y 40 X.
- El resto de sobrenadante deberá permanecer en reposo 1 hora más, para posteriormente procesarlo por el método de Brij-35 al 30%.

TÉCNICA

MÉTODO COPROPARASITOSCÓPICO DE CONCENTRACIÓN POR SEDIMENTACIÓN BRIJ-35 AL 30%

- El sobrenadante se hace pasar a través de una gasa a un tubo de ensaye 13 x 100 mm.
- El filtrado se centrifuga 1500 r.p.m. por 2 minutos.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento con solución salina 0.9% con la finalidad de lavar la muestra.
- Se centrifuga a 1500 r.p.m. por 2 minutos y se repite en paso anterior hasta obtener un sobrenadante claro.
- Después de decantar el ultimo liquido de lavado resuspender el sedimento con la solución Brij-35 al 30%, centrifugar a 1500r.p.m. por 2 minutos.
- Decantar el sobrenadante.
- Con un aplicador se toma la muestra del sedimento y se coloca en un portaobjetos, previa adición de una gota de lugol y se mezcla con el ángulo de un cubreobjetos, mismo que se coloca sobre la preparación.
- Observar al microscopio con el objetivo de 10X y 40x siguiendo un recorrido en acordeón.

RESULTADOS

Para determinar el resultado de las muestras de suelo se consideraron varios criterios de identificación: forma, tamaño aproximado, fase evolutiva y características morfológicas específicas para cada uno de los parásitos observados, y su clasificación

de acuerdo a su patogenicidad (parásito patógeno y no patógeno), procedencia de humano, de vida libre o de animales, basándose en la literatura.

BIBLIOGRAFÍA

- Silvia V. Soriano, Ana M. Manacorda, Nora B. Pierangeli, María C. Navarro, Alejandro L. Giayetto, Liliana M. Barbieri, Lorena E. Lazzarini, Marta C. Minvielle, María S. Grenovero y Juan A. Basualdo; Parasitol. Latinoam. Vol. 60 no. 3-4 Santiago Parasitosis intestinales y su relación con factores socioeconómicos y condiciones de hábitat en niños de Neuquén, Patagonia Argentina, Dic.2005.
- Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos de la ciudad de Neuquén, Patagonia, Argentina Nora Beatriz Pierangeli, Alejandro Lorenzo Giayetto, Ana María Manacorda, Liliana Marta Barbieri, Silvia Viviana Soriano, Alicia Veronesi, Betina Cecilia Pezzani, Marta Cecilia Minvielle y Juan Angel Basualdo. Cat. de Microbiología y Parasitología, Carrera Tropical Medicine and International Health, Volumen 8 No 3 pp 256-263 Marzo 2003.



MICOLOGÍA MORFOLOGÍA GENERAL DE LOS HONGOS

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Generalidades y clasificación de hongos comunes en el ambiente.
2. Técnicas de siembra para cultivo e identificación de hongos.
3. Características macroscópicas y microscópicas de hongos contaminantes.

OBJETIVO GENERAL

- El alumno conocerá algunos hongos comunes en el ambiente y aprenderá a cultivarlos e identificarlos basándose en características macroscópicas y microscópicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Capacitar al alumno para seleccionar los medios de cultivo y las técnicas apropiadas para el aislamiento de hongos a partir de diferentes sustratos.
- Que el alumno conozca los criterios, condiciones y técnicas usadas en Micología para la identificación de los hongos.
- Que el alumno aplique sus conocimientos en la descripción de las características macro y micromorfológicas útiles para la identificación de los hongos.

AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE SUSTRATOS NATURALES:

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los hongos viven de manera natural en el suelo, en él juegan un papel importante para la degradación de la materia orgánica; aunque algunos de ellos invaden las plantas, causándoles enfermedades. Otros hongos, al encontrarse en el aire, pueden generar problemas de contaminación en diferentes tipos de industrias. Hay otros hongos que al penetrar al organismo por diferentes vías (cutánea, traumática, respiratoria, digestiva, etc.), pueden implantarse en los tejidos causando enfermedades.

Existen varias técnicas para aislar diferentes tipos de hongos, de diversos sustratos. Por ejemplo: La técnica de dilución y vaciado en placa, que se utiliza para sustratos muy contaminados (con una gran diversidad de hongos), en los que es difícil separar las especies de hongos, por la gran cantidad de ellas.

Otra técnica es la de inoculación por punto, que se utiliza para aislar hongos a partir de muestras clínicas y para sustratos poco contaminados (con poca diversidad de hongos).

También existe la técnica de exposición de placa, que se utiliza para el aislamiento de hongos del medio ambiente.

Existen varios medios en los cuales se pueden cultivar los hongos. Algunos como el Agar Extracto de Malta ó el Agar Papa Dextrosa, sirven para cultivar una gran variedad de hongos. Para el aislamiento y mantenimiento de algunas clases de hongos, se requiere de medios de cultivo especiales.

Las condiciones de incubación también son importantes para el aislamiento y cultivo de los hongos. La mayoría de ellos se desarrollan bastante bien a una temperatura de 28°C.

MATERIAL

Cajas con Agar Papa Dextrosa adicionado de Rosa de Bengala.

Tubos con 4.5 ml. de agua peptonada al 1% estéril.

Tubos con Agar Papa Dextrosa en pico de flauta.

Caja de Petri con Agar Papa Dextrosa.

Pipetas estériles.

Asa con punta doblada en ángulo recto.

Sustratos para aislamiento: Tierra de jardín ó de maceta. Alimento contaminado por hongos.

1er. DIA

A) TÉCNICA DE DILUCIÓN Y VACIADO EN PLACA

PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar 0.5 gr. de tierra de jardín ó maceta y colocarla en un tubo con 4.5 mL de agua peptonada estéril al 1%; para obtener de esta manera una dilución 1:10. Este tubo se rotulará con el número 1.
- 2) Homogeneizar el contenido del tubo No. 1. Con pipeta estéril, tomar 0.5 ml. de este tubo y colocarlo en otro tubo, rotulado con el número 2.
- 3) Homogeneizar el contenido del tubo No. 2. Con pipeta estéril, tomar 0.5 mL. de este tubo y colocarlo en el tubo rotulado con el número 3, con 4.5 ml. de agua peptonada estéril al 1%.
- 4) Continuar así sucesivamente, hasta llegar al tubo rotulado con el número 5.
- 5) Tomar, con pipeta estéril, 1 mL de la suspensión del tubo No. 4 y colocarla en una caja de Petri conteniendo Agar Papa Dextrosa con Rosa de Bengala. Realizar lo mismo con la suspensión del tubo No. 5, colocándola en otra caja de Petri, con el mismo medio de cultivo. Por medio de rotación de las cajas de Petri, distribuir lo más uniformemente posible la suspensión.
- 6) Incubar a 28°C durante 7 días.
- 7) Contar por separado las colonias de hongos miceliales, de levaduras y de bacterias; calculando el número de propágulos por gramo de muestra.

2do. DIA

B) TÉCNICA DE INOCULACIÓN POR PUNTO

- 1) Raspar con una asa doblada en ángulo recto y estéril un fragmento del material (alimento) contaminado.
- 2) Inocularlo, por picadura, en un tubo con Agar Papa Dextrosa en pico de flauta.

- 3) Incubar a 28°C durante 7 días.

3er. DIA

C) TÉCNICA DE EXPOSICIÓN DE PLACAS

- 1) Colocar una caja de Petri con medio Agar Papa Dextrosa en el sitio donde se quiera hacer el aislamiento.
- 2) Destaparla y exponerla al medio ambiente de 5 a 10 minutos. Después tapparla.
- 3) Registrar fecha y hora del muestreo.
- 4) Incubar a 28°C durante 7 días.

ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA DE LOS HONGOS

INTRODUCCIÓN

Los hongos presentan una gran variedad de formas, tamaños y colores. Pueden vivir en sustratos y condiciones muy diversas y se pueden desarrollar en medios naturales ó sintéticos.

Existen condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos, así como características fundamentales que permiten su identificación; principalmente su macromorfología (morfología colonial) y su micromorfología.

Para el desarrollo óptimo de los hongos, deben encontrarse en el medio de cultivo todas las sustancias y condiciones necesarias, entre las que destacan: Una base nitrogenada (peptona, nitratos, etc.); carbohidratos (glucosa, maltosa, etc.); pH ligeramente ácido; humedad relativa entre 60 y 90%; temperatura de incubación de 20-30°C (hongos saprobios) y 35-37°C (hongos patógenos); además de que algunos de ellos requieren de alguna vitamina ó minerales.

MORFOLOGÍA COLONIAL DE LOS HONGOS:

Las colonias fúngicas se pueden clasificar de acuerdo a sus características, de la siguiente manera:

- a) COLONIAS DE LEVADURAS (Ó LEVADURIFORMES): De consistencia cremosa, crecimiento rápido (2-4 días) y se resiembran por estría.
- b) COLONIAS FILAMENTOSAS: Se presentan como mohos, con filamentos aéreos; forman una especie de "costra" recubierta de vello filamentoso. Su crecimiento puede variar desde 5 días (hongos contaminantes), hasta 3 ó 4 semanas (hongos patógenos).

Los criterios más importantes a tomar en cuenta en la morfología colonial fúngica son:

- a) Tiempo de crecimiento.
- b) Aspecto: Puede ser aterciopelado, pulverulento, granuloso, algodonoso, rugoso, plegado para la mayoría de los hongos filamentosos y aspecto cremosos para las colonias de levaduras.

- c) Relieve: Pueden ser planas ó elevadas sobre el medio de cultivo. Si son elevadas, pueden ser acuminadas, crateriformes ó cerebriiformes.
- d) Pigmentación: El color de las colonias fúngicas es muy variable. El reverso de la colonia puede presentar pigmento, que incluso puede ser difusible al medio de cultivo.
- e) Consistencia: Dura, suave, membranosa.

MATERIAL

Tubos de ensayo y cajas de Petri con colonias de hongos filamentosos.

PROCEDIMIENTO

Observar las colonias de hongos filamentosos y describir algunas de ellas, de acuerdo a los criterios señalados.

MATERIAL

Tubos de ensayo y cajas de Petri con **colonias de hongos levaduriformes.**

PROCEDIMIENTO

Observar las colonias de hongos levaduriformes y describir algunas de ellas, de acuerdo a los criterios señalados.

MATERIAL

Cultivos fúngicos obtenidos la semana anterior por los alumnos.

PROCEDIMIENTO

Observar los resultados obtenidos de los cultivos realizados en la sesión No. 1 de la práctica.

De la técnica de dilución y vaciado en placa, contar el número de colonias de hongos filamentosos y levaduriformes en cada una de las cajas de Petri y calcular el número de propágulos por gramo; para cada uno de los 2 tipos de colonias.

De la técnica de inoculación por punto, describir la colonia obtenida, de acuerdo a los criterios antes mencionados.

De la técnica de exposición de placas, determinar si se considera que hay un desarrollo escaso, moderado ó abundante de colonias fúngicas; reportando también el lugar y hora de muestreo.

TIPOS DE MICELIO Y FORMAS DE REPRODUCCIÓN DE LOS HONGOS

INTRODUCCIÓN

Los hongos tienen como unidad anatómica fundamental, estructuras filamentosas llamadas HIFAS. Al conjunto de hifas se le conoce como MICELIO. Este micelio se clasifica de acuerdo a diversos criterios:

- FORMA: a) Multicelular ó filamentosos (A su vez puede ser tabicado ó cenocítico).
- b) Unicelular (levaduras).

- ORIGEN: Micelio verdadero.
Pseudomicelio (en el caso de las levaduras).
- FUNCIÓN: a) Vegetativo (De nutrición).
b) Aéreo (De reproducción).
- PIGMENTO: a) Hialino (No pigmentado).

b) Pigmentado (Melánico ó carotenoide).

Por otra parte, los hongos pueden presentar reproducción asexual y reproducción sexual. Sin embargo, a muchos de ellos solamente se les conoce su reproducción asexual.

Existen 2 tipos de unidades de reproducción:

1.- ESPORAS: Son las estructuras de reproducción sexual de los hongos. Este tipo de reproducción se lleva a cabo por medio de la meiosis. Los productos de la reproducción sexual de los hongos se pueden llamar zigosporas, ascosporas ó basidiosporas, dependiendo del tipo de hongo del que se trate.

Existe también un tipo de esporas asexuales, que se llaman esporangiosporas, que se forman por fragmentaciones sucesivas dentro de una estructura llamada esporangio.

Las esporas sexuales se producen con menor frecuencia y en menor número que las esporas asexuales y solamente se producen en condiciones muy especiales y es difícil observarlas en medios de cultivo de manera ordinaria.

2.- CONIDIOS: Estructuras de reproducción asexual de los hongos. Se pueden producir por transformación (macroconidios, microconidios) ó por fragmentación de una hifa (holoartroconidios, enteroartroconidios).

Otro tipo de conidios se producen a partir de una estructura preexistente llamada célula conidiogénica, de las cuales se conocen varias. Este tipo de conidios se nombran dependiendo de la célula conidiogénica que les dio origen: Fialoconidios, poroconidios, etc.

MATERIAL

Preparaciones fijas de hongos.

PROCEDIMIENTO

Observar al microscopio las preparaciones fijas de hongos, para diferenciar el micelio y las estructuras de reproducción.

BIBLIOGRAFÍA

- Bonifaz A. Micología Médica. 5ª ed. México:McGraw-Hill;México;2015.



VIROLOGÍA

A) AISLAMIENTO Y VALORACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Generalidades y clasificación de los virus.
2. Técnicas básicas para transporte, aislamiento y cuantificación de virus.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el título de un bacteriófago aislado de un ambiente natural usando el método de dilución y plaqueo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- El alumno aprenderá a aislar un bacteriófago de un ambiente natural (moscas).
- Determinar el título del bacteriófago simple usando los métodos de dilución y plaqueo.

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos son definidos como virus que atacan a una bacteria de manera específica. Algunos bacteriófagos, o fagos, como los bacteriófagos T-even, tienen una estructura compleja. La proteína de cubierta consiste de una cabeza poliédrica y una cola helicoidal, al que están unidas otras estructuras. La cabeza contiene los ácidos nucleicos. Para iniciar una infección, el bacteriófago se adsorbe sobre la superficie de la célula bacteriana por medio de sus fibras de la cola y el plato base. El bacteriófago inyecta sus ácidos nucleicos dentro de la bacteria durante la *penetración*. La cola de la cubierta se contrae, dirigiéndola hacia la pared celular e inyectando el ácido nucleico dentro de la bacteria.

Los bacteriófagos pueden crecer en cultivos bacterianos líquidos o sólidos. El uso de medios sólidos hace posible la localización de los bacteriófagos por medio del método formación de placas o calvas. La bacteria anfitriona y el bacteriófago son mezclados juntos en agar fundido, el cual después es vertido dentro de una caja de Petri con agar nutritivo solidificado. Cada bacteriófago que infecta una bacteria libera varios cientos de nuevos virus. Los nuevos virus infectan otras bacterias y más virus son producidos. Todas las bacterias en el área alrededor del virus original son destruidas, dejando un área clara, una placa o calva, contrastando con el crecimiento continuo de la bacteria. El crecimiento continuo de las bacterias se produce por la presencia de células bacterianas no infectadas.

En esta práctica, nosotros aislaremos un bacteriófago de células anfitrionas en un ambiente natural (moscas de casa). Desde que el número de fagos en un recurso natural está bajo, la deseada bacteria anfitriona y los nutrientes adicionales son agregados como un proceso de enriquecimiento. Después de la incubación, el bacteriófago puede ser aislado por centrifugación del medio enriquecido y filtración con membrana. En la actualidad existen ejemplos de virus que son transmitidos por artrópodos que están causando serios problemas de salud pública, tales como: Zika, Dengue y el virus de Chikungunya, los cuales generan procesos infecciosos característicos que pueden llegar a la muerte.

En el caso de los bacteriófagos, estos son inocuos para el hombre, permitiendo entender su mecanismo de ataque, aunado a ello se pretende conocer el título o concentración. En el método de dilución y plaqueo, la concentración se determina por el conteo de placas o calvas. Cada placa teóricamente corresponde a un virus infeccioso solo en la suspensión inicial. Algunas placas podrían surgir desde más de una partícula viral, y algunas partículas virales pueden no ser infecciosas. Por lo tanto, la concentración es determinada por el conteo del número de unidades de placas formadas (upf). La concentración (expresada en unidades de placas formadas por mililitro) es determinada por el conteo del número de placas y dividida por la cantidad de veces plateadas la dilución. Por ejemplo, 32 placas con 0.1 mL plateado de una dilución es igual a:

$$\frac{32}{0.1 \times 10^{-3}} = 3.2 \times 10^5 \text{ upf/mL}$$

MATERIALES

Aislamiento de bacteriófagos

- 20-25 moscas caseras
- 20mL Caldo desoja triptica
- Mortero y pistilo
- Matraz Erlenmeyer 125mL
- Pipeta estéril de 5mL
- Tubos de centrifuga
- Tubo de tapón de rosca
- Filtro de membrana estéril (0.45 µm)
- Lentes de seguridad y guantes

Valoración de bacteriófagos

- 6 tubos con 9mL de caldo de soya tripticasa
- 6 tubos con 3mL de caldo de soya tripticasa (0.7% agar semisólido)
- 6 cajas de Petri con agar nutritivo
- 7 pipetas estériles de 1mL
- Cultivo de *E. coli*

PROCEDIMIENTO

Aislamiento de bacteriófagos

1. Colocar en el mortero las moscas y la mitad del caldo de soya tríptica y moler hasta obtener una pulpa fina.
2. Transferir la mezcla al matraz estéril y añadir la otra mitad del caldo.
3. Adicionar 2mL de *E. coli* a una concentración de 0.5 de la escala de McFarland
4. Incubar el enriquecimiento por 24horas a 35°C.
5. Decantar 10mL del enriquecimiento dentro del tubo de centrifuga y centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos para remover bacterias y materiales sólidos.
6. Filtrar el sobrenadante mediante el filtro de membrana.
7. Decantar el líquido claro dentro de un tubo de tapón de rosca. Almacenar a 5°C

Valoración de bacteriófagos

1. Etiquetar las cajas de Petri y los tubos de caldo desde el 1 hasta el 6.
2. Añadir asépticamente 1mL de suspensión de fagos al tubo 1 y mezclar cuidadosamente aspirando hacia arriba y abajo tres veces con la pipeta.
3. Usando una pipeta diferente, transferir 1mL al segundo tubo, mezclar bien y después poner 1mL dentro del tercer tubo y continuar este procedimiento hasta el quinto tubo.
4. Después de mezclar este tubo, descartar 1mL dentro de un contenedor de desinfectante.
5. Con una pipeta, añadir 0.1mL de *E. coli* a los tubos de agar suave y colocarlos de nuevo al baño de agua (43°-45°C).
6. Con la pipeta restante, comenzar con el tubo de caldo 6 y asépticamente transferir 0.1mL del tubo 6 al tubo con agar suave. Mezclar por remolino, y rápidamente colocar el agar inoculado uniformemente sobre la superficie de la caja de Petri 6. Después usando la misma pipeta, transferir 0.1mL del tubo 5 al tubo de agar suave, mezclar, y verter sobre la caja de Petri 5. Continuar hasta el tubo 1.
7. Después añadir 2 asadas de *E. coli* a cada remanente de los tubos de caldo y mezclar. Incubar los tubos a 35°C. Observarlos tras un par de horas. En los tubos de caldo, recuerda que el tubo con la mayor dilución es nuestro parámetro. La concentración es el recíproco del parámetro.
8. Incubar las cajas a 35°C hasta que se desarrollen las placas
9. Seleccionar la caja con 25-25^o placas. Calcular el número de unidades de placas formadas por mililitro. Reporta tus resultados.

BIBLIOGRAFÍA

Johnson TR & Case CL. Laboratory Experiments in Microbiology. 10th Edition. USA: Pearson; 2013.



VIROLOGÍA

B) INMUNOCROMATOGRAFÍA APLICADA A LA DETECCIÓN DE VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Generalidades sobre virus con énfasis en la familia Retroviridae
2. Toma y manejo en el transporte de muestras
3. Técnicas básicas para el diagnóstico serológico

OBJETIVO GENERAL

- Realizar la identificación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) por el método de inmunoensayo de uso único, basado en la detección cualitativa de anticuerpos contra VIH-1 y VIH-2 en suero, plasma y sangre completa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Que el alumno ponga en práctica las medidas de seguridad en la toma de muestras
- Reafirmar las condiciones ideales para manejo y transporte de muestras

INTRODUCCION

La inmunocromatografía es una de las técnicas de inmunodiagnóstico más modernas cuyas principales ventajas son la simplicidad y rapidez de la prueba. Cada vez son más las aplicaciones de esta técnica, tanto en el ámbito de los test, debido a que no es necesario reactivos ni instrumentación adicional, como en el campo clínico.

Se puede realizar mediante un dispositivo simple desarrollado para detectar la presencia (o la ausencia) de un compuesto objetivo en la muestra (la matriz). Este tipo de pruebas son utilizadas comúnmente para el diagnóstico médico tanto para pruebas en casa, o de empleo en el laboratorio. Se presenta en un formato de tira, en el cual la muestra problema fluye a lo largo de un sustrato sólido por medio de una acción capilar.

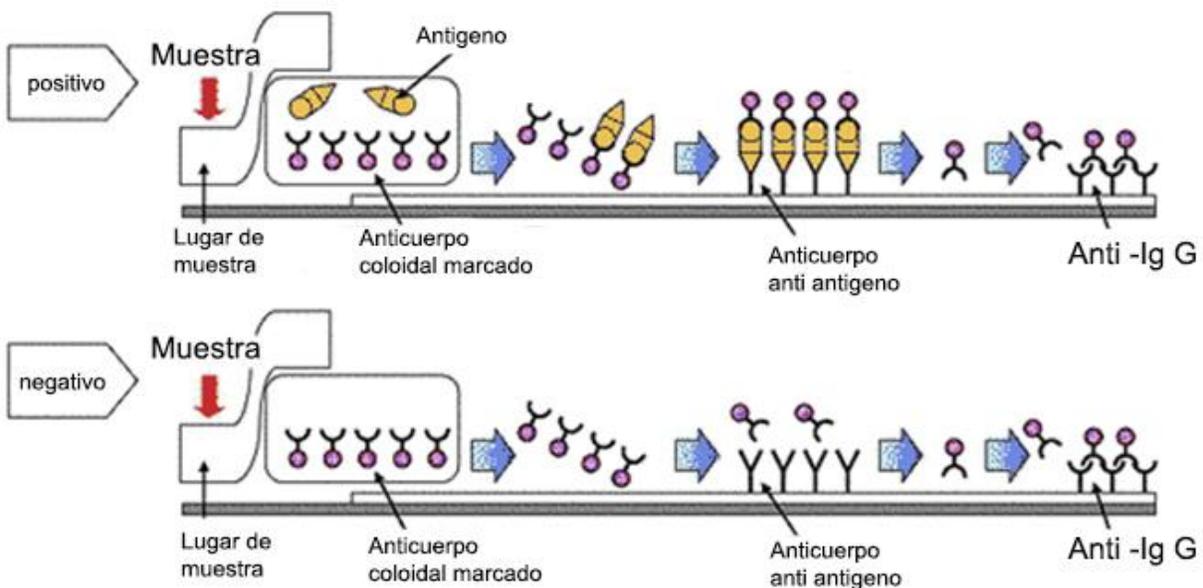
El VIH es una de las causas del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). El SIDA es la fase final de un proceso en el que el sistema inmune de una persona infectada y su capacidad de controlar infecciones o trastornos proliferativos malignos se destruyen de forma progresiva.

El VIH se transmite desde individuos con VIH sobre todo por relaciones sexuales sin protección, uso de drogas intravenosas o transmisión de madre a hijo. Frecuentemente, la infección por VIH se diagnostica mediante pruebas que evalúan si el sistema inmune de un individuo ha producido una respuesta inmunespecífica de VIH (anticuerpos al VIH)

Fundamento de la técnica de cuantificación viral mediante Hemaglutinación.

La prueba para VIH Uni-Gold™ es un inmunoensayo rápido basado en el principio del sándwich inmunocromatográfico. Se inmovilizan las proteínas recombinantes que representan las regiones inmunodominantes de las proteínas de la envoltura de VIH-1 y VIH-2, las glucoproteínas gp41, gp120 (VIH-1) y la glucoproteína gp36 (VIH-2), respectivamente, en la región de prueba de la tira de nitrocelulosa. Estas proteínas también están ligadas a oro coloidal y quedan impregnadas debajo de la región de prueba del dispositivo. También se sensibiliza una banda estrecha de la membrana de nitrocelulosa como región de control.

1.- INMUNOCROMATOGRAFIA



MATERIAL

- Cronómetro.
- Dispositivos de recogida de muestras sanguíneas, para pruebas de venopunción, sangre entera, suero o plasma.
- Contenedor para residuos con riesgo biológico.
- Guantes desechables y/o ropa de protección.
- Lanceta: Se requiere una lanceta de flujo de sangre alto con una profundidad de entre 1,5 y 2,0 mm para producir 60 µl de gotas de sangre
- Paños y gasas estériles.
- Vendas adhesivas.
- Kit Uni-Gold™ HIV

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA PARA PUNCIÓN DE DEDO DE SANGRE ENTERA

1. Los kits que se almacenan a temperatura ambiente se deben usar inmediatamente. Deje que los kits que se hayan almacenado en un refrigerador alcancen temperatura ambiente. Una vez a temperatura ambiente, retire el número de dispositivos Uni-Gold™ HIV requerido de sus bolsas. Los dispositivos se deben utilizar en un periodo de 20 minutos tras abrir la bolsa de aluminio.
2. Realice una prueba cada vez.
3. Deje el dispositivo en una superficie limpia.
4. Etiquete el dispositivo con la información / identificación de paciente adecuadas.
5. Con un paño estéril, limpie el dedo de la persona a la que se realiza la prueba. Deje que el dedo se seque bien o séquelo con una gasa estéril.
6. Con una lanceta estéril que pueda producir 60 µl de sangre, perfora la piel en el centro de la almohadilla del dedo. Sostenga el dedo hacia abajo.
7. Haga un poco de presión junto al punto de punción. No estruje el dedo para que sangre. Limpie la gota de sangre con una gasa estéril. Deje que se forme una gota de sangre. Si el flujo de sangre es inadecuado, el dedo del sujeto podrá masajearse suavemente en la base del dedo para producir una gota de volumen suficiente. No "ordeñe" el dedo.
8. No aplique las gotas de sangre directamente de la punta del dedo sobre el dispositivo, ya que puede variar el tamaño de las mismas.
9. Para recoger la sangre en la pipeta desechable de punción de dedo, presione con suavidad el bulbo de la pipeta y sujete la pipeta en horizontal con respecto a la muestra.
10. Esto es importante, ya que la muestra puede no ser adecuada si la pipeta se sostiene en Vertical. Deje de presionar poco a poco en bulbo para obtener la muestra. Sostenga la pipeta en vertical por encima del puerto de la muestra, estruje el bulbo y descargue dos gotas de sangre entera en la almohadilla de muestra. Deje que la muestra se absorba completamente. Asegúrese de que no haya burbujas de aire en el puerto de la muestra. Si no sostiene la pipeta en vertical podrían obtenerse resultados erróneos. No toque la almohadilla de la muestra con la pipeta desechable. Deseche la pipeta como residuo con riesgo biológico.
11. Sostenga el cuentagotas de la solución de lavado en vertical por encima del puerto de la muestra y añada dos gotas de solución de lavado al puerto de la muestra. Realice el ensayo en este momento. Asegúrese de que no se introduzcan burbujas de aire en el puerto de la muestra. Si no sostiene el cuentagotas en vertical se

- podrían obtener resultados erróneos. No toque la almohadilla de la muestra con la punta del cuentagotas.
12. Lea los resultados de la prueba 10 minutos después, pero nunca pasados 12 minutos después del tiempo de incubación.
 13. Para leer e interpretar los resultados, consulte la sección de interpretación de muestras de sangre entera, suero y plasma.

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO



PROCEDIMIENTO DE PRUEBA PARA SANGRE ENTERA DE VENIPUNCIÓN, SUERO Y PLASMA

1. Deje que el kit (dispositivos sin abrir y solución de lavado) alcance la temperatura ambiente si se ha almacenado previamente en el refrigerador.
2. Una vez a temperatura ambiente, retire el número de dispositivos Uni-Gold™ HIV requerido de sus bolsas. Los dispositivos se deben utilizar en un periodo de 20 minutos tras abrir la bolsa de aluminio.
3. No realice más de 10 pruebas a la vez.
4. Deje los dispositivos en una superficie limpia.

5. Etiquete cada dispositivo con la información / identificación de paciente adecuadas.
6. Llene la pipeta desechable que viene con el kit con la muestra. Asegúrese de que no haya burbujas de aire. Use solo la pipeta que se incluye en el kit y no la reutilice.
7. Sostenga la pipeta en vertical por encima del puerto de la muestra, estruje el bulbo y descargue dos gotas de sangre entera, plasma/suero en la almohadilla de muestra. Deje que la muestra se absorba completamente. Asegúrese de que no se introduzcan burbujas de aire en el puerto de la muestra. No toque la almohadilla de la muestra con la pipeta desechable. Si no sostiene la pipeta en vertical podrían obtenerse resultados erróneos.



8. Deseche la pipeta como residuo con riesgo biológico.
9. Sostenga el cuentagotas de la solución de lavado en vertical y por encima del puerto de la muestra, y añada dos gotas de solución de lavado al puerto de la muestra. Realice el ensayo en este momento. Asegúrese de que no se introduzcan burbujas de aire en el puerto de la muestra. Si no sostiene el cuentagotas en vertical se podrían obtener resultados erróneos. No toque la almohadilla de la muestra con la punta del cuentagotas. Añada la muestra de forma vertical. Añada la solución de lavado con respecto al dispositivo de forma vertical.
10. Lea los resultados de la prueba 10 minutos después, pero nunca pasados 12 minutos después del tiempo de incubación.



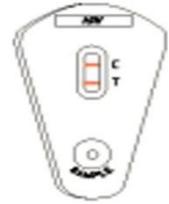
11. Para leer e interpretar los resultado

INTERPRETACION DE RESULTADOS

INTERPRETACIÓN PARA MUESTRAS DE SANGRE ENTERA, SUERO Y PLASMA

Resultado reactivo de la prueba

Dos líneas rosas/rojas de cualquier intensidad en la ventana del dispositivo, la primera junto a la letra “T” (test) y la segunda junto a la letra “C” (control). Esto indica que la muestra es reactiva, es decir, que debe interpretarse como un positivo preliminar a los anticuerpos del VIH



Resultado no reactivo de la prueba

Una línea rosa/roja de cualquier intensidad junto a la letra “C” (control), pero sin línea rosa/roja junto a la letra “T” (test). Esto indica que la muestra no es reactiva, es decir, que debe interpretarse como un negativo a los anticuerpos del VIH



Resultado no válido

No aparece ninguna línea rosa/roja en la ventana del dispositivo junto a la letra “C” (control), independientemente de que aparezca una línea rosa/roja junto a la letra “T” (test) en la pantalla del dispositivo. Este resultado debe considerarse no válido y no podrá interpretarse de ninguna forma.



Líneas rotas

Línea de prueba: Cuando una muestra produce una línea de prueba rota con Uni-Gold™, se considera reactiva inicialmente (dependiendo de la presencia de una línea de control), pero la muestra se debe volver a probar en duplicado. Cuando los resultados duplicados son un línea completa o rota en uno o ambos duplicados, la muestra se interpretará como positivo preliminar. Si ninguno de los duplicados muestran una línea en la zona “T” (test), el resultado se considerará negativo.

Línea de control: Una línea de control rota no afecta la validez de la prueba.

BIBLIOGRAFIA

1. Guillem P. Microbiología Clínica. Barcelona: Editorial Médica Panamericana; 2006.
2. Schupbach et al. Clinical Virology Manual. 3rd Edition. 2000; 37: 513-541.
3. Scaling up services for key populations at higher risk of HIV infection. Global HIV/AIDS Response, Progress Report 2011. Published by WHO, UNAIDS & UNICEF.



MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Recolección, manejo y transporte de muestras
2. Conocer normatividad vigente para el manejo microbiológico de alimentos

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar habilidades en el alumno para la realización de estudios microbiológicos en productos alimenticios de consumo humano

OBJETIVOS PARTICULARES

- El alumno conocerá los diferentes métodos que existen para la realización del análisis bacteriológico de agua, lácteos y jugos.
- Determinar la potabilidad de una muestra de agua por el método de filtración por membrana, y evaluar con base a norma si es apta para el uso y consumo humano.

INTRODUCCIÓN

La gran versatilidad de los microorganismos hace que los podamos encontrar prácticamente en cualquier entorno. Los alimentos son fácilmente colonizados (contaminados), ya sea en forma natural, en el origen o por manipulación durante su procesamiento o elaboración. El agua es el principal componente de los alimentos, la calidad del agua con que se procesan estos alimentos indudablemente repercutirá en la calidad de éstos. En la actualidad es muy importante y complicado mantener la calidad del agua para consumo humano dado el crecimiento de la población y la escasez de este recurso.

El agua que beben la mayoría de las comunidades se obtiene de fuentes superficiales, ríos, corrientes y lagos, las cuales pueden ser contaminadas con desechos domésticos e industriales, por lo que se establecieron sistemas de potabilización para asegurar la calidad del agua y por lo tanto la salud de la comunidad, incluyendo aquellas donde se obtiene el agua de mantos acuíferos profundos (pozos) y que las personas utilizan en todas sus necesidades personales y de recreación.

Los métodos de evaluación de la calidad microbiológica del agua para consumo humano según la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización son:

A. Cuenta por vaciado en placa para conocer el total de la población microbiana.

- B. Número más probable (NMP), que es estimado de la población microbiana de organismos coliformes totales y fecales.
- C. Filtración por membrana, que es una técnica para cualquier tipo de microorganismos, pero más aceptada por el volumen de muestra usada, la sensibilidad y reproducibilidad.

A) TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) EN ALIMENTOS, LÁCTEOS Y JUGOS

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico.

La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. El primero, es que *Escherichia coli* es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperadas en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad.

El número de organismos se establece mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa) o el uso de la técnica del número más probable. Esta última, también llamada técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

1. CAMPO DE APLICACIÓN

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para estimar el número de coliformes presentes en productos alimenticios, por medio del cálculo del número más probable (NMP) después de la incubación a 35°C de la muestra diluida en un medio líquido.

Este procedimiento puede aplicarse a agua potable, agua purificada, hielo y alimentos procesados térmicamente, así como a muestras destinadas a evaluar la eficiencia de

prácticas sanitarias en la industria alimentaria. Este procedimiento debe seleccionarse cuando la densidad esperada es como mínimo de una bacteria en 10 mL de producto líquido o una bacteria por gramo de alimento sólido.

Cuando la densidad bacteriana sea menor que la aquí citada y si la naturaleza del alimento lo permite, utilizar el método de filtrado en membrana. Si la densidad microbiana se espera sea mayor a 100 por mililitro o gramo de muestra, ampliar el intervalo de diluciones o utilizar el método en placa Fig.1.

RECuento DE MESÓFILOS AEROBIOS

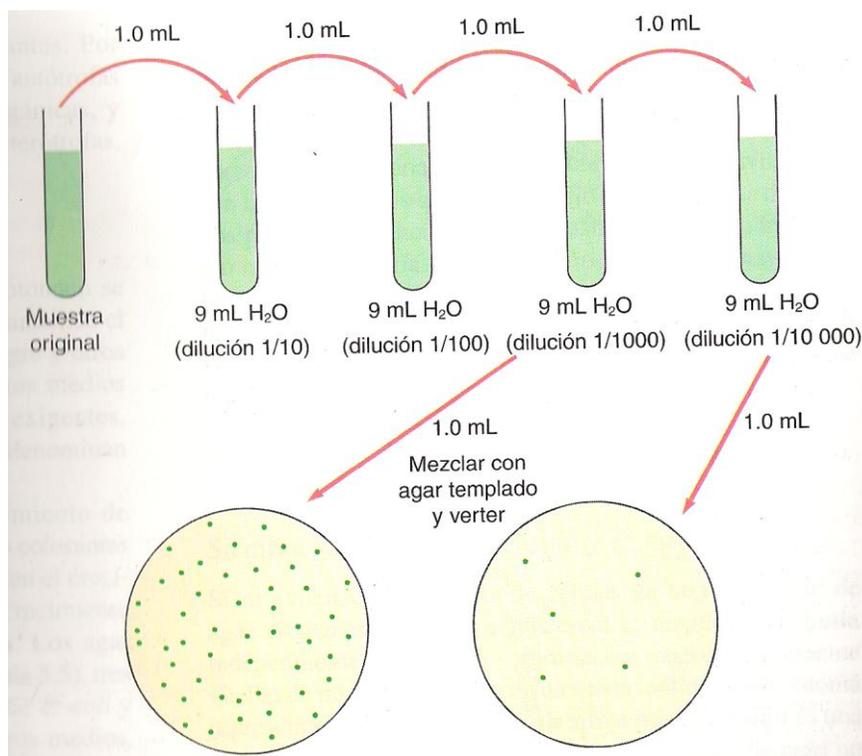


Fig. 1 Técnica de vertido en placa. (Prescott, 2000) p110.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. FUNDAMENTO

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en los tubos de fermentación.

1er. DIA

MATERIAL

- 9 tubos de 18x150 con tapón de rosca y tubo de fermentación con 10 mL de caldo lactosado.
- 2 tubos estériles 9 mL de agua peptonada pH 7.
- 2 cajas de Agar EMB.
- Muestra de agua.
- Potenciómetro.

MÉTODO

1. Diluir el agua en estudio 1:10 y 1:100 en tubos con 9 mL de agua peptonada pH=7.
2. Inocular 1 mL del agua en estudio sin diluir a 3 tubos con caldo lactosado.
3. Inocular 1 mL del agua diluida 1:10 en 3 tubos de caldo lactosado.
4. Inocular 1 mL de agua problema diluida 1:100 en 3 tubos con caldo lactosado.
5. Incubar a 37°C durante 24-48 h.
6. Interpretar la presencia de gas en las 3 series de tubos.
7. Anotar los resultados por serie ej. 3 – 2 – 1 ó bien 0 – 0 – 0, según se observe el gas.
8. Los tubos que presenten gas se deben de sembrar en agar EMB para confirmar la presencia de *Escherichia coli*.

2do. DIA

B) TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA EN MUESTRAS DE AGUA

MATERIAL

- Matraz de vacío
- Bomba de vacío
- Filtros de membrana
- Medios de cultivo adecuados
- 300 mL de muestra problema.

MÉTODO

1. Preparación del equipo de filtración de aire que consta de las siguientes partes: matraz, portafiltros, rejillas metálicas, filtros de membrana, bomba de vacío.
2. Filtrar 100 mL de la muestra de agua problema mediante vacío, de manera que los microorganismos presentes queden retenidos en el filtro de membrana Fig. 2.
3. Retirar el filtro de membrana con ayuda de unas pinzas estériles y colocarlo en la superficie de un medio de cultivo apropiado para coliformes fecales o coliformes totales.
4. Incubar a 37°C por 24h para coliformes totales y coliformes fecales a 42.5°C por 48h
5. Realizar el conteo de UFC/100 mL de muestra.



Fig. 2 Técnica de filtración por membrana.



BIBLIOGRAFIA VANCOUVER

- Botero David, Restrepo Marcos. Parasitosis Humanas. 4ª Edición. Colombia. Corporación para Inv. Biol. 2009.
- Bonifaz A. Micología Médica. 4ª Edición., México. Mc Graw-Hill.2012.
- Brock. Madigan, Michael. Biology of Microorganism. 12ª Edición. EU. Pearson Prentice Hall. 2009.
- Díaz R. Gamaso, C. López-Goñi, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ª Edición. Barcelona. MASSON. 2005.
- Escobar Gutiérrez A. Atlas de Bacteriología. 2ª Edición. Barcelona. Editorial Scheramex. 1999
- Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Janda W.M., Sommers H.M., Winn.W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. 6ª Edición. USA. Ed. Médica Panamericana. 2008.
- MacFaddin. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ª Edición. Argentina. Editorial Panamericana. 2003.
- Prescott, Harley, Klein. Microbiología. 7ª Edición. España. Mc Graw-Hill. 2008.
- Romero Cabello Raúl. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª Edición. México. Medica Panamericana. 2007.
- Tortora, Funke, Case. Microbiología. 9ª Edición. San Francisco. Ed. PEARSON. 2007

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

1. L. Traviezo, J. Dávila, R. Rodríguez, et al. Contaminación enteroparasitaria de lechugas expandidas en mercados del estado Lara. Venezuela Parasitol. Latinoam. Jul. 2004; 59(3):167-170.
2. Nora Beatriz Pierangeli, Alejandro Lorenzo Giayetto, Ana María Manacorda, Liliana Marta Barbieri, Silvia Viviana Soriano, Alicia Veronesi, Betina Cecilia Pezzani, Marta Cecilia Minvielle and Juan Angel Basualdo. Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos de la ciudad de Neuquén, Patagonia, Argentina Cat. de Microbiología y Parasitología, Carrera Tropical Medicine and International Health, Volume 8 No 3 pp 256-263 March 2003.
3. Silvia V. Soriano, Ana M. Manacorda, Nora B. Pierangeli, Maria C. Navarro, Alejandro L. Giayetto, Liliana M. Barbieri, Lorena E. Lazzarini, Marta C. Minvielle, María S. Grenovero y Juan A. Basualdo; Parasitol. Latinoam. Vol. 60 no. 3-4 Santiago Parasitosis intestinales y su relación con factores socioeconómicos y condiciones de hábitat en niños de Neuquén, Patagonia Argentina, Dec. 2005.



NORMAS OFICIALES MEXICANAS

- 1.- Norma Oficial Mexicana NMX-003-1980. Aguas residuales-Muestreo
- 2.- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la Organización y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos.
- 3.- Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Determinación De Bacterias Coliformes. Técnica Del Número Más Probable.
- 4.- Norma Oficial Mexicana NMX-AA-113-SCFI-1999. Análisis del Agua. Determinación de Huevos de Helminto- Método de prueba.
- 5.- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.
- 6.- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental, Agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

REVISTAS

Journal of Clinical Microbiology
Enfermedades Infecciosas

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, 2014.
<http://www.cdc.gov/od/ohs>
- Occupational Safety & Health Administration, Washington D.C., U.S.A., 2014.
<http://www.osha.gov/>
- Secretaria de Salud, México. 2014 <http://www.ssa.gob.mx>
- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España. 2013. Protocolos. <http://www.seimc.org>



MANEJO ADECUADO DE LOS RESIDUOS INFECTOCONTAGIOSOS

En la legislación Mexicana los residuos biológicos infecciosos son clasificados como peligrosos por lo que su manejo, transporte, tratamiento y disposición desde el punto de vista ambiental, deben hacerse conforme a lo dispuesto en el reglamento de la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al ambiente en materia de residuos peligrosos. La Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental – residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo. Establece la clasificación de los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológicos infecciosos, con base al volumen de análisis que se realicen al día; con base a estos lineamientos el laboratorio de Microbiología pertenece al NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2.

Los residuos biológicos infecciosos pueden clasificarse de la siguiente manera:

1. DESECHOS ANATÓMICOS HUMANOS incluyendo tejidos y fluidos corporales que se generen durante procedimientos médicos. Se excluyen dientes, cabellos y uñas.
2. DESECHOS DE ANIMALES Y MATERIALES con las que hayan tenido contacto el animal en el hospital veterinario y que hayan sido expuestos a agentes infecciosos.
3. CULTIVO Y CEPAS DE AGENTES INFECCIOSOS provenientes de laboratorios industriales y de investigación, además de desechos de la producción de elementos biológicos, tales como vacunas descartadas, placas de cultivo y dispositivos utilizados para transferir, inocular o mezclar cultivos y medios de cultivo.
4. DESECHOS ANATÓMICOS derivados del tratamiento de pacientes, en pruebas o análisis de laboratorio, así como los productos generados durante la investigación o desarrollo de productos farmacológicos. Se excluye la orina y materia fecal.
5. INSTRUMENTOS PUNZO CORTANTES desechados y que han sido usados en pacientes humanos o animales, infectados durante su cuidado o investigación tales como jeringas, pipetas, ampollitas, agujas hipodérmicas, porta objetos, etc.
6. DESECHOS NO ANATÓMICOS que hayan sido contaminados con sangre, excreciones, exudados, secreciones humanas, medios o cepas microbianas provenientes de las diferentes actividades que se desarrollan en el laboratorio.



TERMINOLOGÍA

Residuos peligrosos

Todos aquellos residuos, en cualquier estado físico, que por sus características corrosivas, reactivas explosivas, tóxicas, flamables y biológicamente infecciosas representan un peligro para el equilibrio ecológico.

Residuo Biológico Infeccioso (RBI)

Todo aquel residuo que ha estado en contacto con sangre o cualquier fluido biológico; o material que contiene virus, bacterias u otros organismos así como sus toxinas.

Contaminación

Toda materia en cualquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su comportamiento y condición natural.

Descontaminación

Destrucción o remoción de microorganismos a un nivel más bajo, pero no necesariamente la destrucción total. El objetivo de la descontaminación es hacer un material contaminado seguro para posterior manipulación, ya sea un instrumento que va a lavarse y esterilizarse para usarse nuevamente o material que va a tirarse.

Esterilidad

Implica la muerte de todo agente vivo.

Desinfección

Implica el uso de un agente antimicrobiano sobre objetos inanimados (superficies de trabajo, equipo, objetos, etc.). La desinfección puede llevarse a cabo para propósitos de seguridad y propósitos de calidad.

Sustancias químicas peligrosas

Son aquéllas que por sus propiedades físicas y químicas al ser manejadas, transportadas, almacenadas o procesadas, presentan la posibilidad de inflamabilidad, explosividad, toxicidad, reactividad, radiactividad, corrosividad o acción biológica dañina, y pueden afectar la salud de las personas expuestas o causar daños a instalaciones y equipos. (NOM- 005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.)



PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS

Lavado de manos

Este procedimiento es muy importante, sencillo y eficaz para prevenir y controlar la diseminación de los microorganismos o agentes infecciosos. El protocolo es el siguiente: **a)** abrir el grifo y mojarse las manos con agua, **b)** colocar el jabón sobre las manos, **c)** extender el jabón alrededor de las manos y entre los dedos, **d)** lavar las manos por 20 segundos con frotamiento vigoroso empezando por unos centímetros antes de las muñecas y extendiendo hacia abajo entre los dedos y alrededor y bajo las muñecas, **e)** enjuagar con agua corriente, empezando con la sección arriba de la muñeca y hacia los dedos, **f)** secar las manos con papel y cerrar el grifo usando el papel con el que se secó.

Cuidados de las superficies de trabajo

Se recomienda que las superficies de trabajo se descontaminen cada mañana antes y después de trabajar. Los compuestos cuaternarios de amonio y el alcohol al 70% son apropiados para los laboratorios que manejan agentes infecciosos de bajo riesgo. La solución debe aplicarse con un atomizador y pasar una toalla de papel, el equipo y material interno debe moverse para que toda la superficie se limpie.

Derramamientos

La persona que va actuar en el derramamiento deberá portar bata, cubre bocas, guantes, lentes, etc. y usar un germicida que debe de colocarse de la siguiente manera: cubrir con sanitas o papel de reúso sobre la sustancia derramada para evitar la formación de aerosoles y posteriormente aplicar el germicida sobre el área. El germicida debe permanecer al menos 20 minutos para asegurarse de su acción sobre los microorganismos. Al término del procedimiento se juntan los materiales derramados y se colocan en botes de plástico para posteriormente esterilizarlos en la autoclave.

Descontaminación desechos infecciosos

Los residuos peligrosos biológicos infecciosos generados en el laboratorio (placas petri, tubos de cultivo, líquidos corporales, instrumentos y vidriería en general, así como residuos no anatómicos, etc.) pueden descontaminarse en autoclave a 15 lb de presión, 121°C, y 45 minutos para bacterias, para hongos 90 minutos. Se deja enfriar la autoclave y el material está listo para lavarse o para irse a la basura municipal.

NOTA:

El laboratorio cuenta con un almacén temporal (refrigerador y botes colectores) para los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos generados, no anatómicos, cultivos y cepas y con recipientes adecuados para el desecho de punzocortantes.