



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Prácticas Profesionales

"COMPENDIO DE MICROBIOLOGIA PRACTICA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N ;
MARIA GUADALUPE VERA GABRIEL
CARLOS HERNANDEZ ALCANTARA

ASESORA: QFB. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Compendio de Microbiología Práctica

que presenta el pasante: Carlos Hernández Alcántara
con número de cuenta: 8840634-7 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Septiembre de 2003

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. Tonatihu Cruz Sánchez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.B.P. Amparo Londoño Orozco</u>	



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Compendio de Microbiología Práctica

que presenta el pasante: Carlos Hernández Alcántara

con número de cuenta: 8840634-7 para obtener el título de :

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Septiembre de 2003

PRESIDENTE	M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya	
SECRETARIO	Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez	
PRIMER SUPLENTE	Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez	
SEGUNDO SUPLENTE	Q.B.P. Amparo Londoño Orozco	

AGRADECIMIENTOS

A TI SEÑOR

Por haberme permitido concluir otra etapa de mi vida y estar siempre presente en ella.

PARA TI CARMEN MADRE MIA

Que has sido siempre mi inspiración.

A MI PADRE AVELINO Y A MIS HERMANOS: EFRAÍN, JOSÉ LUIS, JOEL, RAMON, RENE Y LUIS ANGEL

Por su apoyo y comprensión.

A MI ESPOSO MARTIN

Por esa paciencia que te caracteriza, gracias por tu apoyo.

A MIS HIJOS: MARÍA FERNANDA Y JESÚS EDUARDO

Con todo el cariño.

A CARLOS HERNÁNDEZ ALCANTARA

Por su apoyo y colaboración en la realización del presente trabajo.

A DIOS

Por todo y principalmente por la oportunidad de seguir adelante.

A MIS PADRES: MERCEDES Y SALVADOR.

Por que a pesar de las limitaciones y dificultades siempre se han preocupado por mi.

A MIS HERMANOS: LILIA, SALVADOR, LUIS Y RAUL

Por su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A LA MEMORIA DE MI PADRINO GENEROSO ALCANTARA SALGADO (q.e.p.d)

Quien con su ejemplo de vida me guió y motivó para seguir adelante.

A ANA MARIA

Por su amor, paciencia, comprensión y apoyo incondicionales.

A LA FAMILIA GONZALEZ RAMIREZ: ANA MARIA, GUILLERMINA, ELEUTERIO, MARTHA, CLAUDIA, BLANCA Y LUIS.

Por que con su amistad y amabilidad se han ganado mi respeto y cariño.

A MARIA GUADALUPE VERA GABRIEL

Por su apoyo y colaboración en la realización del presente trabajo.

A LOS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL LABORATORIO CENTRAL DEL CENSIDA: MARICELA, CRISTINA, PATRICIA, NANCY, INES, ILIANA, LAURA, MARCIA, GAUDENCIO, JAIME, JUANITA Y TODO EL EQUIPO DE TRABAJO.

Por su colaboración y apoyo en cada jornada de trabajo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

A NUESTRA ASESORA DE TESIS: QFB. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

Por sus enseñanzas, paciencia y apoyo para lograr la realización de este trabajo.

**A LOS SINODALES: MVZ. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ, QFI. ANDREA BECERRIL OSNAYA,
QFB. ANA LAURA VAZQUEZ MARTÍNEZ, QBP. AMPARO LONDOÑO OROZCO, DR. TONATIUH
CRUZ SÁNCHEZ.**

Por que con su revisión, comentarios y sugerencias enriquecieron el presente trabajo.

AL CENTRO NACIONAL PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DEL VIH / SIDA E ITS

Dra. Patricia Uribe Zúñiga

Dra. Griselda Hernández Tepichín

Dra. Xóchitl Terán Toledo

Dr. Eddie Antonio León Juárez

QFB. Martha Patricia Orozco Gómez

Elizabeth Contreras Nieto

Lic. Sixto Horacio Evaristo Marcial

AL INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS

QFB. Roberto Vázquez Campuzano

Y a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de VIH e ITS.

INDICE.

Presentación.	1
Objetivos.	3
Capitulo No. 1 “Bioseguridad”.	4
Bioseguridad en el Laboratorio	5
Prevención de las infecciones adquiridas en el Laboratorio. Precauciones estándar.	8
Identificación y envasado de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI's)	10
Diseño adecuado de un Laboratorio	11
Niveles de Bioseguridad	11
Capítulo No. 2 “Esterilización”.	17
Procesos de esterilización	19
Esterilización por calor	19
Ciclo de esterilización	21
Esterilización por filtración	22
Esterilización por agentes químicos	23
Esterilización por radiaciones	25
Capítulo No. 3 “Desinfección”.	33
Elección de un desinfectante	34
Mecanismos de acción de los agentes químicos	36
Agentes químicos usados en el control de microorganismos	37
Métodos para la evaluación de desinfectantes	39
Determinación del coeficiente fenólico	42
Capítulo No. 4 “Medios de Cultivo”.	46
Clasificación de los medios de cultivo	46
Control de calidad en los medios de cultivo	50
ANEXO 4.1. Sistemas de Crecimiento Anaerobio	57
Capítulo No. 5 “Técnicas de Sembrado”.	60
Inoculación en medio sólido en cajas Petri	60
Inoculación en medios semisólidos o sólidos en tubo	63

Inoculación en medios líquidos	64
ANEXO 5.1 Curva de Crecimiento y Conteo Celular	70
Capítulo No. 6 “Técnicas de Tinción”.	73
Clasificación de los colorantes	74
Tipos de tinciones	75
Elaboración de Frotis	77
Tinciones	78
ANEXO 6.1 Microscopio. Uso y cuidados	83
Capítulo No. 7 “Pruebas Bioquímicas”.	90
Métodos para la identificación de bacterias	90
Resumen de pruebas bioquímicas primarias	93
Resumen de pruebas bioquímicas secundarias	94
Resumen de pruebas bioquímicas especiales	96
ANEXO 7.1 Indicadores ácido-base	102
Capítulo No. 8 “Pruebas de Susceptibilidad a Antibióticos”.	103
Mecanismos moleculares de los antibióticos	104
Técnica de difusión en agar	104
Técnica de dilución en caldo o en agar	105
ANEXO 8.1 Nefelómetro de Mac Farland	111
Capítulo No. 9 “Parasitología”.	112
Características principales de los protozoarios	113
Métodos para la detección de protozoarios	117
Recolección de muestras	117
Técnica microscópica directa	118
Técnica de Willis	118
Técnica de Faust	119
Técnica de Ritchie	120
Capítulo No. 10 “Micología”.	124
Estructuras micóticas	124
Reproducción de los hongos	125
Métodos para el estudio de los hongos	129

Microcultivo	131
Capítulo No. 11 “Virología”.	134
Estructura general de los virus	134
Replicación viral	135
Métodos para el estudio de los virus	139
Cultivo de virus	139
Capítulo No. 12 “Inmunología”.	148
Mecanismos de protección	148
Sistema inmune	150
Inmunoensayos	151
Pruebas de aglutinación	153
Pruebas de Inmunofluorescencia	158
Pruebas de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	159
Prueba de Inmunoelctrotransferencia (Western blot)	161
Capítulo No. 13 “Pruebas de Biología Molecular”.	168
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	169
Conclusiones.	172
Bibliografía.	173

INDICE DE CUADROS.

CUADRO 1.1 CLASIFICACION Y ENVASADO DE RPBI's	10
CUADRO 1.2 NIVELES DE BIOSEGURIDAD	12
CUADRO 3.1 AGENTES QUIMICOS USADOS EN EL CONTROL DE MICROORGANISMOS	37
CUADRO 4.1 CARACTERISTICAS Y CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	49
CUADRO 4.2 MEDIOS DE CULTIVO Y MICROORGANISMOS PARA VALIDACION	52
CUADRO 4.3 CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE ACUERDO A SUS REQUERIMIENTOS DE O ₂ Y CO ₂	57
CUADRO 7.1 RESUMEN DE PRUEBAS BIOQUIMICAS PRIMARIAS	93
CUADRO 7.2 RESUMEN DE PRUEBAS BIOQUIMICAS SECUNDARIAS	94
CUADRO 7.3 RESUMEN DE PRUEBAS BIOQUIMICAS ESPECIALES	96
CUADRO 10.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE HONGOS	125
CUADRO 10.2 ESTRUCTURAS MICOTICAS DE REPRODUCCION	126
CUADRO 11.1 CARACTERISTICAS DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE VIRUS CON IMPORTANCIA MEDICA	138
CUADRO 12.1 MECANISMOS DE PROTECCIÓN CONTRA AGENTES INFECCIOSOS	149
CUADRO 12.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS HUMANAS	152

INDICE DE TABLAS.

TABLA 3.1 DETERMINACIÓN DE DILUCIÓN MÍNIMA EFECTIVA Y COEFICIENTE FENÓLICO PARA EL HEXACLOROFENO.	39
TABLA 3.2 DESINFECTANTES EMPLEADOS Y SUS CONCENTRACIONES	43
TABLA 3.3 RESULTADOS OBTENIDOS PARA UN DESINFECTANTE	43
TABLA 3.4 CONCENTRACIONES Y DILUCIONES MINIMAS EFECTIVAS PARA LOS DESINFECTANTES EVALUADOS	44
TABLA 7.1 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS	100
TABLA 7.2 INDICADORES DE pH UTILIZADOS EN MICROBIOLOGÍA	102
TABLA 8.1 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS PARA ALGUNOS ANTIBIÓTICOS	108

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1.1 SIMBOLO UNIVERSAL DE RIESGO BIOLÓGICO	11
FIGURA 4.1 RECIPIENTES DE EXTINCIÓN CON VELA (VELOBIOSIS)	58
FIGURA 5.1 TÉCNICAS DE SEMBRADO EN PLACA	61
FIGURA 5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS DE BACTERIAS	61
FIGURA 5.3 SEMBRADO MASIVO	63
FIGURA 5.4 INOCULACIÓN DE MEDIOS EN TUBO	64
FIGURA 5.5 CURVA DE CRECIMIENTO	70
FIGURA 6.1 PARTES DEL MICROSCOPIO	86
FIGURA 8.1 INOCULACIÓN Y LECTURA DEL ANTIBIOGRAMA	107
FIGURA 10.1 ESTRUCTURAS MICÓTICAS	125
FIGURA 10.2 ESTRUCTURAS MICÓTICAS DE REPRODUCCION	127
FIGURA 10.3 MICROCULTIVO	131
FIGURA 11.1 ESTRUCTURA GENERAL DE LOS VIRUS	135
FIGURA 11.2 ESQUEMA GENERAL DE LA REPLICACION VIRAL	137
FIGURA 11.3 ESTRUCTURA DEL EMBRION DE POLLO DE 9 A 11 DIAS DE EDAD	140
FIGURA 11.4 VIAS DE INOCULACIÓN EN EL EMBRION DE POLLO DE 9 A 11 DIAS DE EDAD	143
FIGURA 12.1 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS POR AGLUTINACIÓN CON LÁTEX O GELATINA SENSIBILIZADO CON ANTICUERPOS	154
FIGURA 12.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR AGLUTINACIÓN CON LÁTEX O GELATINA SENSIBILIZADO CON ANTÍGENOS	155
FIGURA 12.3 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS POR HEMAGLUTINACIÓN CON ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTICUERPOS	155
FIGURA 12.4 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR HEMAGLUTINACIÓN CON ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON ANTÍGENOS	156
FIGURA 12.5 COAGLUTINACION. (DETECCION DE ANTIGENO)	157
FIGURA 12.6 FLOCULACION. (VDRL)	157
FIGURA 12.7 INMUNOFLUORESCENCIA	158
FIGURA 12.8 ELISA INDIRECTO- (DETECCION DE ANTICUERPOS)	159
FIGURA 12.9 ELISA DIRECTO-SANDWICH (DETECCION DE ANTIGENO)	160
FIGURA 12.10 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)	162
FIGURA 13.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	170

PRESENTACIÓN

La Microbiología surge de la necesidad de estudiar a los microorganismos y sus actividades, su estructura, reproducción, fisiología, metabolismo e identificación, su distribución en la naturaleza, sus relaciones con otros organismos, sus efectos benéficos o perjudiciales sobre los humanos, así como las alteraciones físicas o químicas que provocan en el medio ambiente. La Microbiología se encarga principalmente del estudio de los organismos vivos, microscópicos y unicelulares, sin embargo, también abarca organismos que se encuentran en la línea limítrofe de la vida (los virus). Para realizar el estudio de los microorganismos, se requieren técnicas básicas de laboratorio, las cuales se describen en este Compendio.

Un Compendio de Microbiología nace de la necesidad de que los estudiantes y profesionales relacionados con la Microbiología encuentren la información concentrada y actualizada de los métodos y técnicas microbiológicas aplicadas en las actividades profesionales diarias; de aquí que se elaboró un Compendio de Microbiología Práctica con base en los temas contemplados en el área de la Microbiología General. Estos temas se organizan en 13 capítulos, iniciando con "Bioseguridad" como la base indispensable para poder trabajar en un laboratorio, lo cual implica la existencia de riesgos, tanto para el personal como para todo lo que se relaciona con el Microbiólogo.

Luego se presentan los capítulos de "Esterilización" y "Desinfección" como dos metodologías básicas que deben realizarse en cualquier laboratorio de Microbiología para la prevención de contaminación e infecciones, así como para la reutilización de material para disminuir costos en insumos. Los capítulos de "Medios de Cultivo" y "Técnicas de Sembrado" representan actividades cotidianas e indispensables en un laboratorio de Microbiología donde se manipulan bacterias, hongos, parásitos y virus, por lo que dichas actividades deben ser debidamente descritas y realizadas.

Los capítulos de "Técnicas de Tinción", "Pruebas Bioquímicas" y "Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos" son procedimientos extremadamente útiles para el estudio e identificación de bacterias y algunos hongos de importancia en la industria y en el área clínica, así como para el establecimiento de tratamientos óptimos para combatir infecciones.

Los últimos cuatro capítulos se refieren a otras áreas de estudio de la Microbiología, tales como: "Parasitología", "Micología", "Virología", "Inmunología" y "Biología Molecular". En cada una de éstas áreas se pretende resaltar el uso de metodologías básicas para un óptimo estudio de parásitos

microscópicos, hongos y virus; además, en el capítulo referente a la Inmunología se resalta la importancia de los inmunoensayos como metodologías ampliamente usadas en la actualidad en todo laboratorio de Microbiología para el diagnóstico de infecciones de gran trascendencia, aprovechando todas las reacciones antígeno-anticuerpo posibles. Finalmente se presenta el capítulo de "Biología Molecular" como un área que está acaparando la atención de todos los microbiólogos y del personal de salud en general como una herramienta novedosa para el diagnóstico microbiológico.

Algunos capítulos cuentan con anexos de temas complementarios como: Sistemas de Crecimiento Anaerobio, Curva de Crecimiento y Conteo Celular, Microscopio, Indicadores Acido-Base y Nefelómetro de Mac Farland.

Cada uno de los capítulos del compendio, cuenta con introducción, objetivos, material y métodos, áreas para resultados, observaciones, análisis y conclusiones; además, se incluye un cuestionario complementario y de repaso, así como bibliografía básica.

Dentro de la introducción de cada capítulo se presenta una investigación bibliográfica del tema en cuestión, resaltando la importancia, de dónde y cuándo se emplea cada técnica, conceptos básicos, es decir, la información mínima necesaria para que el estudiante obtenga un panorama más amplio sobre el por qué de lo que se realiza y con esto despierte su interés por el tema.

Los objetivos de cada capítulo pretenden motivar al lector para que alcance las metas planteadas, de acuerdo a la información, material y métodos propuestos. El material, reactivos y equipos que se requieren representa lo mínimo necesario para llevar a cabo las metodologías propuestas y además, se considera que puede estar disponible en un laboratorio para la enseñanza de la Microbiología; sin embargo, esto puede ser flexible, dependiendo de lo que esté al alcance en el laboratorio.

Para realizar las actividades propuestas es necesario plantear y realizar cada técnica sustentada en la bibliografía, adaptada y estandarizada a los fines de cada laboratorio, lo cual permitirá obtener los resultados esperados de una manera confiable. Conociendo la importancia que tiene contar con una pauta a seguir para el registro de resultados y observaciones, se presentan áreas que pueden ser cuadros para estos fines, así como áreas para análisis de resultados y conclusiones.

Por último, se proporciona en cada uno de los capítulos una serie de bibliografías en las que se fundamenta cada capítulo y que pueden servir para profundizar en los temas.

Compendio de Microbiología Práctica.

Objetivos.

La elaboración del presente Compendio de Microbiología Práctica tiene la principal finalidad de concentrar los métodos básicos más empleados actualmente en dicha área, orientada al conocimiento, con el cual debe contar un profesional de la Salud.

- Proporcionar material didáctico que sirva como apoyo y consulta a estudiantes, con la finalidad de facilitar el aprendizaje de los métodos empleados en un laboratorio de Microbiología.
- Facilitar la obtención de conocimientos previos a la realización de las prácticas escolares y profesionales, y con esto mejorar el desempeño de los estudiantes y profesionales en un laboratorio.
- Permitir a los estudiantes que lo consulten tener concentrada la información del trabajo que pueden realizar en el laboratorio.
- Constituir una herramienta de consulta para el estudiante en estudios posteriores y avanzados así como en el ámbito laboral relacionados con la Microbiología.

CAPÍTULO No. 1

BIOSEGURIDAD

INTRODUCCIÓN

Toda actividad productiva se ve rodeada de peligros y aunque la ciencia de la seguridad es relativamente joven, la necesidad de seguridad, higiene y control ambiental cada día está siendo más importante en la sociedad y principalmente en la esfera laboral. Existen algunos términos de lo que es **seguridad** y algunos diccionarios definen a la seguridad como tranquilidad, calma y certeza, sin embargo, se puede decir que la **bioseguridad** es un estado del individuo que le permite vivir libre de los efectos del peligro.⁷

En la actualidad es tan importante la seguridad que se han creado programas de seguridad e higiene ocupacional. La alta competitividad de las empresas las ha llevado a la necesidad de reconocer los peligros, abatir los riesgos y por ende los accidentes. Los estudios de los efectos de accidentes muestran que las pérdidas y lesiones humanas, así como las pérdidas económicas son cuantiosas, y en una época como la actual, es de gran utilidad para las empresas e instituciones invertir en el control de los accidentes como fuente de ahorro.⁷

El gran reto que enfrentan los profesionistas de la seguridad es crear una **profunda conciencia** de prevención, la cual, debe iniciar a temprana edad, desde la formación inicial en la escuela se ha de hablar de seguridad y prevención como conceptos de vital importancia. La **bioseguridad** es de gran importancia en la actualidad, ya que se han hecho seguimientos y estudios de lesiones que se adquieren, las cuales, pueden ser de tipo moderadas, severas o letales. Los accidentes que ocurren debido a las deficiencias del lugar y prácticas inseguras por parte de las personas indican que los hechos que ocurren inmediatamente antes de que se produzca el accidente son: La práctica insegura y la condición insegura.⁷

Una **práctica insegura** es un acto ejecutado por una persona durante el cual no se respetan las medidas de seguridad, y se provoca un accidente o lesión. Una **condición insegura** es una situación en el medio ambiente que rodea a una persona en donde faltan medidas de precaución, lo cual puede ocasionar un accidente o lesión.^{1,7}

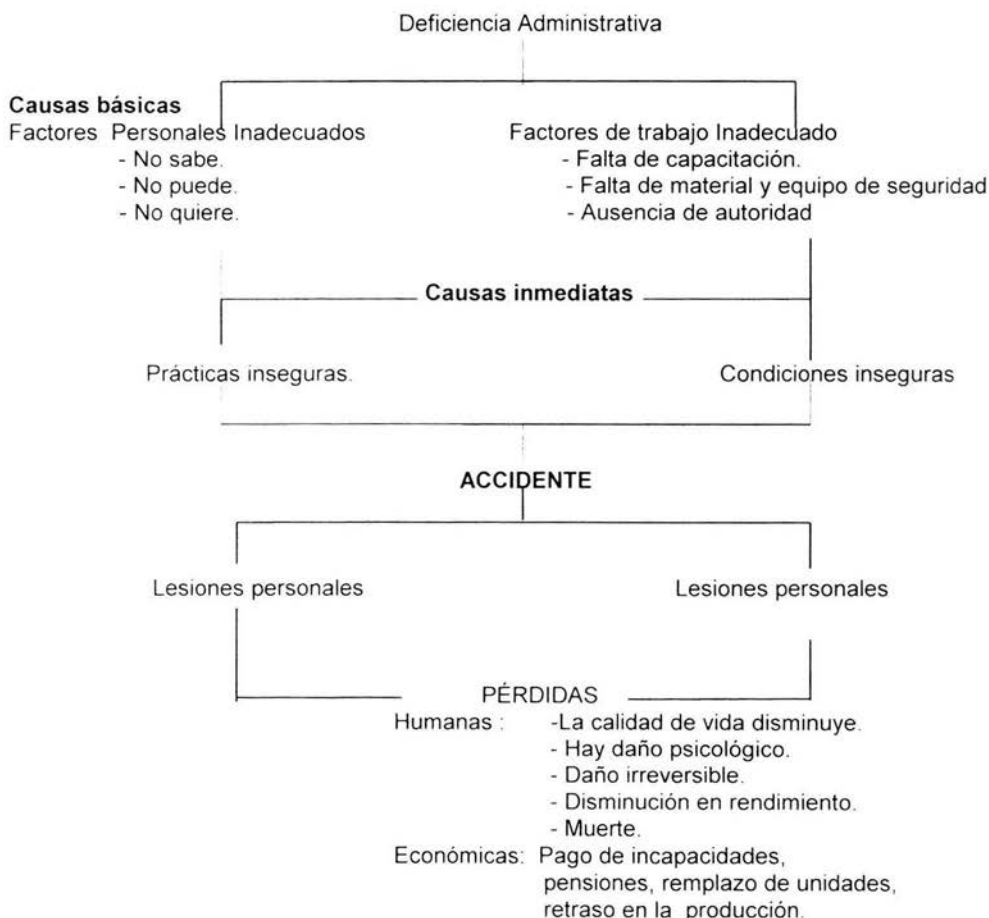
El estudio de los accidentes ha indicado que estos están dados por causas básicas e inmediatas que en consecuencia provocan el accidente que puede dar lugar a lesiones en el individuo o hasta provocar la muerte. Conjuntamente con esto se relacionan las pérdidas económicas para la

empresa o institución donde se presenta el accidente. La **bioseguridad** debe de existir en todas partes donde haya la presencia de individuos, es decir, desde el hogar, escuela, medio de transporte, lugar de trabajo, etc. Se ha visto que las normas de seguridad son diferentes dependiendo del lugar y de acuerdo a las necesidades del mismo.⁷

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

La seguridad debe estar presente desde traer puesta la bata hasta el aseo y desinfección hechos al finalizar la jornada de trabajo, lo cual incluye colocarse todos los accesorios requeridos para realizar las pruebas, manejar adecuadamente equipo y aparatos, así como las muestras de estudio, agentes químicos, además de trabajar en áreas que estén diseñadas específicamente para tratamiento de muestras y determinación o estudio de algún microorganismo.^{1,2,3,4,5,7,12,14}

MECANISMO DE ACCIDENTE.



Los agentes que se pueden considerar peligrosos para la seguridad en el laboratorio son:

Agentes biológicos: Bacterias, hongos, virus, parásitos, insectos.

Agentes químicos: Líquidos, gases, vapores, polvo, humo.

Agentes físicos: Radiaciones ionizantes y no ionizantes, temperatura, ventilación, ruido, presión, vibración.

Agentes ergonómicos: Mal diseño, condiciones y operaciones inadecuadas.

La Bioseguridad está enfocada a la prevención, reconocimiento, evaluación y control de microorganismos principalmente aquellos que causan daños, ya que al no ser detectados y controlados pueden causar lesiones irreversibles e incluso la muerte.^{1,4,6,7,10,11,12,13,14}

Dentro de las medidas de **bioseguridad**, se han establecido normas y procedimientos dependiendo del estudio y tipo del microorganismo para poder prevenir todas las consecuencias antes mencionadas, de acuerdo a lo anterior existen factores que se deben tratar de controlar y manejar para obtener una seguridad satisfactoria, tales como: el tipo de agente, vía de entrada, tiempo de exposición, así como la intensidad de exposición (Cuadro 1.2).^{1,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14}

1.- TIPO DE AGENTE:

- **AGENTE BIOLÓGICO:** Los agentes biológicos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas como resultado del contacto con éstos en el centro de trabajo. Los microorganismos varían en su capacidad para producir infecciones; éstos agentes pueden producir diferentes daños al organismo de mayor o menor gravedad y existe una clasificación de microorganismos con base al riesgo según la Organización Mundial de la Salud (Cuadro 1.2).^{1,2,4,5,6,9,10,11,12,14}

Grupo de Riesgo I.- (Bajo riesgo individual y comunitario). Microorganismo que es improbable que produzca enfermedad humana o enfermedad animal de importancia veterinaria.

Grupo de Riesgo II.- (Riesgo individual moderado, riesgo comunitario limitado). Patógeno que puede causar enfermedad humana o animal pero que es improbable que sea un riesgo grave para el personal del laboratorio, la comunidad, la ganadería o el medio ambiente. Las exposiciones de laboratorio pueden producir infección grave, pero son posibles el tratamiento efectivo y las medidas preventivas, siendo limitado el riesgo de difusión.

Grupo de Riesgo III.- (Riesgo individual alto, riesgo comunitario bajo). Patógeno que produce generalmente enfermedad humana grave, pero no se difunde de ordinario de un individuo infectado a otro.

Grupo de Riesgo IV.- (Elevado riesgo individual y comunitario). Patógeno que produce generalmente enfermedad humana o animal grave y puede transmitirse fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente.

- **AGENTE QUIMICO:** Existen en la actualidad más de 60 000 sustancias consideradas altamente peligrosas y se clasifican de acuerdo a ciertas características como sigue: ^{4,7}

I.- Estado físico.-

Por su estado físico los agentes químicos pueden ser sólidos, líquidos o gases.

II.-Vía de entrada.-

Oral, respiratoria, cutánea, mucosa.

III.-Toxicidad.-

Según los criterios de clasificación de toxicidad de la Organización Panamericana de la Salud, ésta se relaciona con la dosis:

Grado de toxicidad.	Dosis letal para el ser humano	
Inocuos.	15	g / kg
Ligeramente tóxicos .	5-15	g / kg
Medianamente tóxicos.	0.5-5	g / kg
Muy tóxicos.	50-500	mg / kg
Extremadamente tóxico.	5-50	mg / kg
Super tóxico.	Menos de 5 mg / kg	

IV.- **Estructura química.**-Según su estructura química pueden ser:

Metales.	Hidrocarburos.	Esteres.
Azufre y derivados.	Cianuro y nitrilos.	Acidos orgánicos.
Derivados del nitrógeno.	Semimetales.	Fenol y derivados.
Aldehidos.	Halógenos.	
Cetonas.	Alcoholes.	
Eteres.	Glicoles.	

- **AGENTE FÍSICO:** Son aquellos agentes que consisten en radiaciones ionizantes, no ionizantes, presión, temperatura, ruido, iluminación, etc. ^{1,4,7}

2.- VIA DE ENTRADA:

Ingestión: pueden penetrar al organismo a través de la **boca**; Pueden ser ingeridos, cuando se pipetea o mediante los dedos y artículos contaminados (comida, lápices, cigarrillos, etc.)

Inhalación: inhalación de partículas infectadas transmitidas por el aire, que se liberan durante muchas manipulaciones en el laboratorio.

Inyección: pueden ser consecuencia de heridas accidentales con punzocortantes, tales como agujas hipodérmicas, pipetas Pasteur o material de vidrio infectado y roto.

Mucosas: salpicaduras en ojos y boca de líquidos infectados

3.- TIEMPO DE EXPOSICIÓN:

El tiempo de exposición es determinante en el daño que puede producir un agente peligroso en un individuo, entre mayor sea este tiempo mayor será el daño.

4.- INTENSIDAD DE EXPOSICIÓN:

No es el mismo riesgo, el exponerse a un agente que tiene baja intensidad que a uno que tiene gran intensidad, por ejemplo la exposición a la luz ultravioleta de diferente intensidad.

Existen otros factores adicionales, que dependen del tipo de agente y su estado físico; así mismo se debe considerar que la capacidad de resistencia de cada persona o predisposición es diferente, por lo que dos personas sometidas al mismo agente, en el mismo tiempo de exposición y con la misma intensidad pueden tener respuestas diferentes.

PREVENCIÓN DE LAS INFECCIONES ADQUIRIDAS EN EL LABORATORIO.

PRECAUCIONES ESTÁNDAR.

Estas medidas de prevención se basan en las barreras que existen para aislar al microorganismo, para proteger al manipulador y a la comunidad. Dichas barreras son: ^{1,2,4,5,7 12,14}

- Barrera Primaria:

Son aquellas barreras alrededor de los microorganismos para impedir su dispersión en el laboratorio. Son las técnicas y equipo diseñados para la contención de los microorganismos y para impedir que accedan directamente al operador y a que se difundan como aerosol.

- a) Considerar todo líquido corporal y material biológico como potencialmente infectante.
- b) No pipetear con la boca, ni llevarse objetos a la boca dentro del laboratorio, así como no comer, beber, fumar o aplicarse maquillaje.
- c) Emplear materiales, envases y contenedores adecuados que estén en óptimas condiciones (gradillas, tubos de ensaye, frascos, cajas de Petri, criotubos, etc.)

- d) No sobrellenar los envases y contenedores.
- e) Emplear equipo adecuado y en óptimas condiciones de funcionamiento (instalación eléctrica, instalación de gas, refrigerador, congelador, campana de extracción, campana de flujo laminar, mechero, centrifuga, autoclave, horno, baño de agua, etc.)
- f) Realizar un correcto manejo, tratamiento, almacenamiento y disposición final de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), así como la desinfección de superficies de trabajo.
- g) Actuar de inmediato en caso de derrames o ruptura de envases y contenedores, cubriendo el área con un trapo o gasa y agregar un desinfectante que actúe durante 30 minutos.
- h) Empacar adecuadamente cualquier material biológico para su transporte o almacenamiento.
- i) Todo RPBI debe ser identificado y envasado adecuadamente antes de que salga del laboratorio.
- j) En caso de accidente con punzocortantes: Si es una herida se lava con agua y jabón y si fue salpicadura en membranas mucocutáneas lavar con agua, después se aplica un antiséptico y finalmente se realiza el reporte del accidente para evaluación médica y seguimiento.

- Barreras Secundarias:

Se encuentran alrededor del operario para que actúe como una red de seguridad en caso de que se fallen las barreras primarias. Estas medidas están encaminadas a proteger al personal.^{3,6,8,9,10,11,13}

- a) Uso de bata y/o delantal, guantes, cubrebocas, máscaras y lentes.
- b) Lavarse las manos después de manipular cualquier material infeccioso y antes de salir del laboratorio, incluso habiéndose usado guantes.
- c) Cualquier tipo de herida en el personal de laboratorio debe estar cubierta con material de curación adecuado.
- d) Debe de existir un departamento de atención y supervisión médica, y cualquier accidente o enfermedad deben ser reportados a dicho departamento, así como el consumo de esteroides y fármacos inmunosupresores.
- e) Recibir las vacunas disponibles para la profilaxis correspondiente.
- f) Se sugiere la realización de pruebas de detección periódica, voluntaria y confidencial, de los microorganismos infecciosos a los que se expone un trabajador en el laboratorio.

- Barreras Terciarias:

Impiden el alcance a la comunidad de cualquier germen que no sea contenido por las barreras primarias y secundarias. Estas barreras están pensadas para ofrecer una protección adicional, y consisten en un tratamiento y disposición final de los RPBI.^{4,7,11,13}

IDENTIFICACION Y ENVASADO DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS (RPBI).

Todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos generados en establecimientos de atención médica se deberán separar y envasar considerando sus características físicas y biológico-infecciosas como sigue: ^{4,6,9,11,12,13}

CUADRO 1.1 CLASIFICACION Y ENVASADO DE RPBI's.

TIPO DE RESIDUO	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	COLOR
Sangre, cultivo y cepas almacenadas de agentes infecciosos.	Sólidos	Bolsa de plástico	Rojo
Residuos no anatómicos derivados de la atención a los pacientes y los laboratorios.	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes Usados y sin usar.	Sólidos	Recipientes Rígidos de metal o plástico.	Rojo
Patológicos	Sólido	Bolsa de plástico	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo

Adaptado de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Las bolsas deberán de ser de polietileno e impermeables de calibre mínimo 300 para los residuos patológicos y de 200 para los demás, de acuerdo al color especificado anteriormente. Se llenará al 80% de su capacidad, cerrándose antes de ser transportada. Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deben de ser rígidos, de polipropileno resistente a fracturas y pérdida del contenido al caerse, destructibles por métodos fisicoquímicos y esterilizables, con una resistencia mínima de penetración de 12.5 N (Newton) en todas sus partes y tener tapa con o sin separador de agujas y abertura para depósito con dispositivo para cierre seguro. Deben ser de color rojo y libres de metales pesados y cloro, debiendo estar etiquetados con la leyenda que indique **"PELIGRO, RESIDUOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS"** y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Figura 1.1), como lo indica la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. ¹¹

FIGURA 1.1 SIMBOLO UNIVERSAL DE RIESGO BIOLÓGICO ¹¹



RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO–INFECCIOSOS

Se deberán establecer rutas de recolección para su fácil movimiento hacia el área de almacenamiento, el equipo mínimo de protección del personal que efectúa la recolección consistirá en uniforme completo, guantes mascarilla o cubreboca. Si se manejan residuos líquidos se deberán usar anteojos de protección. ^{11,13}

DISEÑO ADECUADO DE UN LABORATORIO.

Para el diseño de un laboratorio hay que evaluar, con qué material biológico se va a trabajar, que pruebas se van a realizar a dicho material, con cuánta gente se va a trabajar en el laboratorio. Lo más importante, que hay que evaluar es el tipo de microorganismo con el que se trabaja, a que grupo de riesgo pertenece; dependiendo de esto el laboratorio deberá de contar con condiciones adecuadas de seguridad y por lo tanto su diseño será mucho más estricto, de acuerdo a la normatividad actual. ^{1,3,5,7,14}

Algunas aspectos que se deben considerar en un laboratorio:

- Disponer de espacio amplio.
- Las paredes, techos y suelo deben de ser lisos, no absorbente, de fácil limpieza y desinfección, así como resistentes a los agentes químicos.
- La iluminación y la ventilación deben de ser adecuadas.

NIVELES DE BIOSEGURIDAD.

Dependiendo de los agentes específicos que se manejen en los laboratorios se han descrito cuatro **niveles de bioseguridad**, esto consiste en la combinación de técnicas y prácticas de laboratorio, equipo de seguridad, e instalaciones. Como anteriormente se ha mencionado esto depende del riesgo del microorganismo que se maneje regularmente en el laboratorio (Cuadro 1.2). ⁴

CUADRO 1.2. NIVELES DE BIOSEGURIDAD.

Microorganismo	Nivel de Bioseguridad	Prácticas Generales	Prácticas Especiales	Equipo de Contención	Instalaciones de Laboratorio
<p><i>Aerobacillus</i>, <i>Anzonia</i>, <i>Aeromonas</i>, <i>Bacteroides</i>, <i>Edwardiella</i>, <i>Eimeria</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Erwinia</i>, <i>Gambella</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Pedococcus</i>, <i>Photobacterium</i>, <i>Proteus</i>.</p>	<p>NIVEL 1</p> <p>Se trabaja con agentes viables bien caracterizados. No causan enfermedades en humanos sanos</p>	<p>-El acceso al laboratorio debe ser limitado y restringido</p> <p>-La superficie de trabajo debe descontaminarse una vez al día y cuando haya derrame de material biológico.</p> <p>-Todos los desechos, líquidos o sólidos deben descontaminarse antes de ser eliminados</p>	<p>-El material contaminado que haya que descontaminar en un lugar alejado del laboratorio debe colocarse en un recipiente cerrado, que no presente fugas antes de ser transportado.</p> <p>-Debe de existir un programa de control de insectos y roedores.</p>	<p>-No se requiere equipo de contención para este nivel</p>	<p>-El diseño del laboratorio debe permitir una limpieza fácil.</p> <p>-La superficie de la mesa debe ser impermeable a líquidos y resistente a ácidos, álcalis, solventes orgánicos y calor moderado.</p> <p>-Los muebles deben ser resistentes</p> <p>-El espacio entre las mesas, gabinetes y equipo debe permitir una limpieza adecuada</p> <p>-Debe de existir un lavamanos</p> <p>-Las ventanillas que se abran, deben de estar protegidas con mosquiteros</p>
<p><i>Virus de la Hepatitis B</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Toxoplasma</i>, <i>Bacillus anthracis</i>, <i>Bordetella</i>, <i>Erysipelothrix</i>, <i>Clostridium</i>, <i>C. fallax</i>, <i>C. sordelli</i>, <i>C. tetani</i>, <i>C. difficile</i>.</p> <p>NIVEL 2</p> <p>Se hace trabajo clínico, diagnóstico y enseñanza con una mayor variedad de microorganismos presentes en la comunidad que se asocian con enfermedades humanas de severidad diversa</p>	<p>-No pipetear con la boca, debe de usarse aparatos mecánicos</p> <p>-Se prohíbe comer, fumar y aplicarse cosméticos</p> <p>-La comida debe de guardarse en lugares especiales y fuera del área de trabajo</p> <p>-Lavarse las manos después de manipular material viable, animales y antes de salir del laboratorio.</p> <p>-Las técnicas deben de realizarse cuidadosamente para disminuir la posibilidad de crear aerosoles.</p> <p>-Utilizar uniforme para prevenir contaminación de ropa, uso de bata.</p>	<p>-No debe permitirse el acceso a personas que presenten algún factor de riesgo.</p> <p>-Deben de establecerse reglas y procedimientos que indiquen al personal del riesgo potencial presente en el área, para que determinen la pertinencia del mismo como podría ser la aplicación de alguna vacuna.</p> <p>-Utilizar el uniforme adecuado para esta área, además de la bata</p> <p>-Al salir del laboratorio debe quitarse la ropa protectora y dejarse en el laboratorio.</p> <p>-Utilización de guantes cuando se manipulen material y animales contaminados, evitando la contaminación de la piel.</p> <p>-Las agujas y jeringas deben ser de material desechable, deben de extremarse las precauciones para evitar la autoinoculación, después de su uso deben descontaminarse, estas solo se utilizan para inyecciones parenterales o aspiración de fluidos en animales.</p> <p>-Cualquier accidente, derrame de material infeccioso debe reportarse inmediatamente.</p> <p>-Debe elaborarse un Manual de Bioseguridad y difundirse el conocimiento del mismo entre el personal.</p>	<p>-Se requieren gabinetes de seguridad biológica Clase I y II.</p> <p>I.-Procedimientos que tengan un alto potencial de creación de aerosoles, como son: centrifugación, molino, licuado, agitación o mezcla vigorosa, sonicación, apertura de recipientes conteniendo material infeccioso y cuya presión interna pueda ser diferente de la presión ambiental, inoculación intranasal de animales, cosecha de tejidos infectados de animales o huevos</p> <p>II.-Cuando se empleen grandes concentraciones o grandes volúmenes de agente infeccioso. Tales materiales pueden ser centrifugados en recipientes cerrados y ser abiertos en gabinetes de seguridad</p>	<p>-Las instalaciones son similares a las del Nivel 1, solo se le agrega:</p> <p>-Disponer de una autoclave para descontaminar desechos infecciosos</p>	
<p><i>Legionella</i>, <i>Listeria</i>, <i>Mycobacterium</i>, <i>M. chelonae</i>, <i>M. fortuitum</i>, <i>M. ulcerans</i>, <i>Neisseria</i>, <i>N. gonorrhoeae</i>, <i>N. meningitidis</i>, <i>Pasteurella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>patógenos</i>, <i>Treponema pallidum</i>.</p>					

Adaptado de Letayf, J., et al. (1994) y Escobar, G. A. Vol. 3 (1995).

CUADRO 1.2 a NIVELES DE BIOSEGURIDAD. (continuación)

Microorganismo	Nivel de Bioseguridad	Prácticas Generales	Prácticas Especiales	Equipo de Contención	Instalaciones de Laboratorio
<i>Brucella</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Francisella</i> <i>Mycobacterium africanum</i> <i>M. avium</i> <i>M. bovis</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. xenopi</i> <i>Pseudomonas mallei</i> , <i>Salmonella paratyphi A</i> <i>S. typhi</i> <i>Yersinia pestis</i> , <i>Coccidiodies immitis</i> , <i>Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)</i> , <i>Virus de las encefalitis virales</i>	NIVEL 3 Se trabaja con agentes potencialmente más resistentes y que pueden producir consecuencias letales.	-El acceso al laboratorio debe ser limitado y restringido. -La superficie de trabajo debe descontaminarse una vez al día y cuando haya derrame de material biológico. -Todos los desechos, líquidos o sólidos deben descontaminarse antes de ser eliminados. -No pipetear con la boca, debe de usarse aparatos mecánicos. -Se prohíbe comer, fumar y aplicarse cosméticos. -La comida debe de guardarse en lugares especiales y fuera del área de trabajo. -Lavarse las manos después de manipular material viable, animales y antes de salir del laboratorio. -Las técnicas deben de realizarse cuidadosamente para disminuir la posibilidad de crear aerosoles. -Utilizar uniforme para prevenir contaminación de ropa y usar bata	-Las prácticas especiales para este nivel 3, son las mismas que para el nivel 2, agregando las siguientes prácticas -El personal que entre en este nivel debe de tener entrenamiento específico en el manejo de agentes patógenos, estar dirigido por un profesional competente con experiencia. -La puerta del laboratorio permanecerá cerrada cuando se este trabajando. -Todas las actividades con material infeccioso se realizarán en gabinetes de seguridad biológica o sistemas físicos de contención. -No realizar ningún trabajo en recipientes abiertos. -Las superficies de trabajo, equipo, y material, serán descontaminados al finalizar el trabajo. -Utilización de papel absorbente con un lado plastificado sobre la superficie de trabajo de los gabinetes de seguridad biológica, facilitan la limpieza. -La ropa de laboratorio debe ser descontaminada antes de ser lavada. -Debe de usarse máscaras o respiradores en cuartos en los que se encuentren animales infectados. -No se permite el acceso a plantas o animales, que no sean, de experimentación. -La líneas de vacío deben protegerse con filtros de partículas de alta eficiencia (HEPA) y trampas con desinfectantes. -Las agujas no deben de ser desoblodadas, reencapuchadas o removidas de la jeringa después de su uso. Las jeringas con aguja antes de descartarse o reutilizarse deben descontaminarse por autoclave. -Se mantendrá un registro médico del personal.	-El mismo utilizado en los niveles de bioseguridad 2 y 3.	-El laboratorio debe estar separado de áreas de paso no restringido del edificio. -Debe pasarse a través de dos puertas para tener acceso al laboratorio. -Tener un cuarto de cambio de ropa, que puede tener regaderas. -Las superficies interiores de techo, suelo y paredes deben ser resistentes a líquidos para que sean limpiadas fácilmente. -Para la descontaminación del área, esta debe ser fácilmente sellada o aislada. -El lavamanos debe de ser operado con el pie, el codo o automáticamente y debe estar localizado cerca de la puerta de salida del laboratorio. -Las ventanas deben estar selladas y cerradas, las puertas deben cerrarse automáticamente. -Debe de haber un sistema de ventilación por ductos de escape. Este sistema debe de crear flujo de aire direccional que jale, aire hacia el laboratorio de la entrada. -El aire de escape no debe recircularse a ninguna otra área del edificio, debe descargarse al exterior y dispersarse lejos de áreas ocupadas. -Debe de verificarse la dirección del flujo de aire. -El aire puede ser descargado sin necesidad de ser filtrado, pero cuando es filtrado a través de filtros HEPA de los gabinetes biológicos de seguridad I o II puede descargarse al exterior o a través del sistema del edificio. También puede ser reciclado en el laboratorio siempre y cuando los gabinetes sean probados y certificados por lo menos cada 12 meses

Adaptado de Lelayf, J., et al. (1994) y Escobar, G. A. Vol. 3 (1995).

CUADRO 1.2 b NIVELES DE BIOSEGURIDAD. (continuación)

Microorganismo	Nivel de Bio seguridad	Prácticas Generales	Prácticas Especiales	Equipo de Contención	Instalaciones de Laboratorio
<p>Virus Ebola Virus de la fiebre del Valle de Rift</p>	<p>NIVEL 4</p>	<p>-El acceso al laboratorio debe ser limitado y restringido -La superficie de trabajo debe descontaminarse una vez al día y cuando haya derrame de material biológico -Todos los desechos, líquidos o sólidos deben descontaminarse antes de ser eliminados -No pipetear con la boca, deben usarse aparatos mecánicos -Se prohíbe comer, fumar y aplicarse cosméticos -La comida debe de guardarse en lugares especiales y fuera del área de trabajo -Lavarse las manos después de manipular material viable animal y antes de salir del laboratorio -Las técnicas deben de realizarse cuidadosamente para disminuir la posibilidad de crear aerosoles -Utilizar uniforme para prevenir contaminación de ropa y usar bata</p>	<p>Para las prácticas especiales en el nivel 4 se consideran todas las anteriores hasta llegar al Nivel 3, en el Nivel 4 se considera también -El personal que aquí labore debe de tener conocimientos de las prácticas generales de laboratorio, entrenamiento de manejo de agentes patógenos de alto riesgo y debe entender las funciones de contención primarias y secundarias -El acceso al laboratorio es completamente restringido y controlado por el responsable -Todas las actividades se realizarán en gabinetes de seguridad biológica clase III, o en gabinetes clase I o II junto con trajes del personal, de una pieza, de presión positiva, ventilados por un sistema de soporte vital -El material biológico viable que tenga que ser sacado de los gabinetes clase III o del laboratorio se coloca en contenedores de material irrompible, sellado y a su vez colocado en un segundo contenedor, con las mismas características. El recipiente debe sacarse del laboratorio con un tanque de desinfección, cámara de fumigación o trampa de aire -No se sacará ningún material sin que haya sido autoclaveado o descontaminado -Antes de la entrada del personal debe ser avisado del riesgo e instruido sobre las medidas de seguridad, se controla la entrada y salida del personal -Deben establecerse protocolos de emergencia -Debe ducharse cada vez que salga de las instalaciones y cambiarse de ropa en los cuartos de cambio</p>	<p>-Todos los procedimientos que se lleven a cabo en estos laboratorios de Bioseguridad Nivel 4 se realizarán en gabinetes de clase III conjuntamente con trajes de presión positiva del personal con sistema de soporte vital -Las actividades con agentes virales como el virus de la fiebre del Valle del Rift requieren nivel 4, uso de traje de presión positiva</p>	<p>-Se consideran las instalaciones del Nivel 3, agregando lo siguiente -El laboratorio de máxima contención debe de estar en un edificio separado o en una zona perfectamente delimitada y aislada del mismo -Deben de existir cuartos internos y externos de cambio de ropa, separados por un cuarto de regaderas para el ingreso al laboratorio -Los materiales que entren lo harán a través de un autoclave, de doble puerta, una cámara de fumigación o un cuarto de aire -La superficies interiores deben ser selladas con algún material para facilitar la fumigación y evitar la presencia de animales o insectos -Cualquier drenaje debe contener trampas conteniendo desinfectantes para la eliminación de los agentes en cuestión -Todas las líneas de ventilación deben tener filtro HEPA, se colocan lo más cerca posible, los filtros deben ser fácilmente descontaminados y reemplazados -Las estructuras internas luces, ductos de aire, etc., deben de estar colocadas de tal manera que su superficie horizontal sea mínima para evitar acumulación de polvo -Los servicios de otros líquidos o de gas deben estar protegidos por un sistema que prevenga el regreso de estos -Deben de existir bebederos, estos deben ser operados con el pie y son localizados en el corredor y fuera del laboratorio, el agua del mismo no debe de estar conectado al sistema de distribución de agua de laboratorio -Dispositivos de ventilación de emergencia para el personal que trabaja en los gabinetes y de la cámara de autoclave deben ser descontaminados -El aire que entra también es filtrado</p>

Adaptado de Letayf, J. et al (1994) y Escobar, G. A. Vol. 3 (1995).

OBJETIVOS.

- Adquirir los conocimientos necesarios sobre bioseguridad, para llevar a cabo un desempeño adecuado dentro del laboratorio.
- Prevenir y evitar accidentes a través del seguimiento de las normas y reglas de seguridad.

MATERIAL Y METODO.

Este capítulo se puede desarrollar a manera de una plática descriptiva en la que se utilice material didáctico, tal como transparencias, láminas, etc. Además, debe inducirse la participación en simulacros de accidentes y las acciones a realizar.

CONCLUSIONES.

Cuestionario.

- a) Describa la importancia de la bioseguridad para un profesionalista en el área de la Microbiología.
- b) ¿Qué tipo de agentes se consideran peligrosos en un laboratorio de Microbiología?
- c) Enumere las precauciones más importantes para mantener la bioseguridad en un laboratorio de Microbiología.
- d) Describa brevemente los niveles de bioseguridad considerados.
- e) ¿Qué haría usted en caso de sufrir un accidente (pinchazo o cortadura) con material punzocortante contaminado con algún agente infeccioso?

BIBLIOGRAFÍA.

1. Adelberg, E. A., et al. Biosafety in the Laboratory. National Research Council. National Academy Press. E.U. (1989) 212 p.
2. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs.16-19.
3. Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. Microbiological Methods. 7ª edición. Butterworth – Heinemann. Inglaterra. (1995), Págs. 1-9.
4. Escobar, G. A.; et al. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen 3. I.N.D.R.E.-Secretaría de Salud. México. (1995), Págs. BS5-BS46.
5. Gaviño de la Torre G., Juárez L. J. Carlos, Figueroa T. Hugo. Técnicas Biológicas. 2ªedición. Limusa. México. (1995). Págs.15-19.
6. IMSS. Manual de Procedimientos para el Control y Manejo de Residuos Biológicos-Infecciosos. Tóxicos-Peligrosos, Comunes y Reciclables. Secretaría de Salud.
7. Letayf, J.,González, G. C. Seguridad, Higiene y Control Ambiental. Mc Graw Hill. México. (1994) 388 págs.
8. López, M. C., Magis, R. C., Hernández, T. G. Guía de Prevención y Tratamiento para la Exposición Ocupacional al VIH. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA. Secretaría de Salud. México. (1998) 35 págs.
9. López, M. C., Hernández, T. G. Guía de Prevención y Tratamiento para la Exposición Ocupacional al VIH. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA. Secretaría de Salud. México. (2000) 80 págs.
10. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Secretaría de Salud. CONASIDA. México. (1993) Págs. 28-34.
11. Norma Oficial Mexicana. NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Secretaría de Salud. México. (2002).
12. Ponce de León, R. S., et al. Manual de Prevención y Control de Infecciones Hospitalarias. Organización Panamericana de la Salud – OMS. (1995) Págs. 70-91.
13. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1994. Secretaría de Desarrollo Social. México. (1994).
14. Rickwood, D. y Hames B. D. Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Vol. I Editado por T. A. Brown. Inglaterra. (1991). Págs. 14-15, 245-247.

CAPÍTULO No. 2

ESTERILIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el mantenimiento de un control en los procedimientos para la eliminación de microorganismos como prácticas sanitarias en el laboratorio es de gran importancia, ya que algunos microbios son capaces de destruir materiales valiosos, como madera y fibras textiles causando pérdidas que necesitan evitarse con medidas eficaces. Aún existen más razones para controlar los microorganismos, tales como: ⁷

- Prevenir la contaminación o proliferación de microorganismos.
- Prevenir el deterioro o destrucción de materiales por los microorganismos.
- Controlar la purificación del agua y la pasteurización de la leche.
- Conservación y preservación de los alimentos.
- Mantener el material y equipo de laboratorio estéril para su utilización.

Por todos estos motivos los microorganismos se eliminan por medio de agentes y procedimientos físicos, hoy en día se cuentan con una gran variedad de técnicas y agentes que actúan de manera diferente cada uno⁷, pero en general tienen como finalidad librar cualquier superficie, objeto y medio por remoción o muerte de todos los microorganismos que los contaminen, ya sea en estado vegetativo o esporulado, este proceso recibe el nombre de **esterilización**. ^{1,2,3,4,5,6,9,12,13,14}

Para llevar a cabo un proceso de esterilización hay que considerar lo siguiente:

1.-Tipo de material a esterilizar.

- Vidrio.
 - Plástico.
 - Ropa.
 - Materia orgánica
- | | |
|---|---|
| } | <ul style="list-style-type: none"> -Soluciones farmacéuticas -Leche. -Alimentos. -Agua. -Medios de cultivo |
|---|---|

2.-Tipo de microorganismo.

Las especies de microorganismos difieren en su susceptibilidad a los agentes químicos o físicos esterilizantes. Por ejemplo, las esporas son la forma orgánica más resistente, son capaces de sobrevivir en condiciones físicas o químicas muy adversas.

3.- Estado fisiológico.

Las células jóvenes por tener intenso metabolismo, son menos vulnerables que las células viejas, de menos actividad metabólica así como cambios en la membrana celular, ya que el envejecimiento afecta la permeabilidad de ésta.

4.- Ambiente en que se encuentra el microorganismo.

Las propiedades físicas y químicas del medio o de las sustancias que contiene el medio en que vive el microorganismo, tienen gran influencia en la velocidad y eficiencia de la destrucción microbiana. La presencia de materia orgánica extraña reduce notablemente la eficiencia del proceso de esterilización.

5.- Sitios de acción del proceso o agente esterilizante.

El daño a algunas estructuras celulares inicia las alteraciones que llevan a la célula a la muerte: ^{1,3,13}

- I.-La viabilidad de una célula está vinculada con el mantenimiento de las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos en su estado natural.
- II.-Una célula viva normal contiene múltiples enzimas indispensables para su proceso metabólico.
- III.-La membrana semipermeable citoplasmática mantiene la integridad del contenido celular, la membrana citoplasmática regula selectivamente el paso de sustancias entre la célula y el medio exterior e incluso es el sitio donde reaccionan algunas enzimas.
- IV.-La pared celular proporciona a la célula una cubierta protectora, además de participar en determinados procesos fisiológicos.

Con base en los agentes y procesos físicos se clasifican los diferentes procesos de esterilización.

Los requisitos de esterilización para hospitales, laboratorios e industrias farmacéuticas se traslapan en muchas formas. El tratamiento de bultos de hospital, instrumentos, aparatos de laboratorio, medios de cultivo y soluciones farmacéuticas requieren ciclos de esterilización y equipo que es común a cada rama del hospital. Los fabricantes de esterilizadores están, por lo tanto, diseñando equipo que se adapte fácilmente a sus necesidades. ^{1,8,10,11}

PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN.

ESTERILIZACIÓN POR CALOR.



Las actividades metabólicas de un organismo son el resultado de la suma de todas las reacciones químicas y como estas reacciones están influenciadas por la temperatura, en consecuencia el proceso vital también lo está. Los microorganismos, se desarrollan en una amplia gama de temperaturas desde las muy bajas, hasta muy altas, sin embargo las temperaturas superiores a los 100°C generalmente los matan.^{3,6,9,12,13}

I.-CALOR HÚMEDO.

Vapor bajo presión.

Fundamento.

La acción mortal del vapor se deriva del calor latente que se libera cuando se condensa sobre una superficie fría y, en consecuencia, eleva la temperatura del área de contacto o lo que es lo mismo el vapor entra en contacto con superficies más frías, cede su calor y se condensa el agua, coagulándose las proteínas del microorganismo; el vapor se condensa sobre las paredes de las esporas y aumenta su contenido de agua, provocando hidrólisis.^{1,2,3,6,9,12,13}

Equipo.

Autoclave, proporciona el vapor caliente, a presión de 15 libras/pulg.² y una temperatura de 121°C, el equipo debe de contar con medidor de temperatura y presión para poder regular estos parámetros; existe un intervalo que va de 108 a 147°C y presión de 15 libras/pulg.² El tiempo durante el cual se lleva a cabo el proceso va desde 15 minutos para medios de cultivo y material limpio, hasta 45 minutos para medios de cultivo y material contaminados.^{1,2,6,9,12,14}

Ventajas.

- La esterilización por calor húmedo es más rápida que por calor seco.
- Se esteriliza por calor húmedo instrumentos filosos ya que el vapor puede penetrar a esta parte del instrumento sin alterar la forma, mientras que el calor seco no, el calor seco hace que el material con filo lo pierda.
- Existe humedad en abundancia, por lo tanto existe coagulación segura de proteínas del microorganismo. ^{2,6,10,11}

Material que se esteriliza por este método:

- Medios de cultivo, soluciones.
- Instrumentos y recipientes de vidrio.
- Material quirúrgico.
- Material de curaciones.
- Ropa, guantes, gasas, etc.

Se debe considerar la cantidad y tipo de material sometido a esterilización, por que varía el tiempo que se deja para que esté estéril. ^{1,2,5,6}

Esterilización fraccionada o Tindalización.

Existen algunos medios que no pueden calentarse a más de 100°C, sin que resulten dañados, por lo tanto se utiliza la esterilización fraccionada, este método implica: ^{1,3,9}

- 1.-Calentamiento del material a 100°C 20 minutos cada día, durante 3 días, con sucesivos periodos de incubación. Las esporas resistentes germinarán durante esos periodos de incubación y en la siguiente exposición al calor las células vegetativas son destruidas.
- 2.-El equipo utilizado es el aparato de esterilización de Arnold.

Si se encuentran presentes esporas que no germinaron durante la incubación, el material no esta estéril.

Nota:

El agua hirviendo NO ESTERILIZA los objetos o material expuestos debido que la temperatura a la cual hierve el agua es a 100°C y algunas bacterias mueren a 121°C. **La pasteurización** es otro método que NO está dentro de los procesos de esterilización, ya que este método sólo elimina a algunos microorganismos quedando las esporas presentes, por lo tanto para este método hay que considerar lo expuesto anteriormente. ³

II.-CALOR SECO.

Aire caliente.

Fundamento.

En una atmósfera seca, libre de humedad, las bacterias con muchas proteínas, son resistentes al calor y no mueren hasta que ocurre una oxidación de los constituyentes de la célula, esto sucede a temperaturas más elevadas (170°C) de las que se requieren para la coagulación de proteínas. La esterilización que se lleva a través del calor seco es más lenta (2 hrs.) y solamente es útil para cierto material resistente y sustancias estables a la temperatura que se alcanza. ^{1,3,6,9,12,13}

Equipo.

El horno puede ser de gas, eléctrico o doméstico. ^{1,2,6,9,14}

Material.

Cuando se seleccionan objetos para la esterilización en seco, se debe tener en cuenta que se logran temperaturas de 160 a 180°C, que carbonizarán telas o gases y destruirá el hule y muchos plásticos. Sin embargo, el hule de silicón (jeringas, catéteres, tubos, etc.) pueden resistir estas temperaturas. ^{1,2,6,9,12}

Se recomienda un ciclo de esterilización de 180°C durante 30 minutos para vidriería, jeringas e instrumentos no cortantes, no se recomienda para objetos taponados con algodón, ya que este se puede tostar liberando ácidos grasos bactericidas. ^{1,2,6,9,12}

Incineración.

Por medio de incineradores calentados eléctricamente o por gas, se destruyen o matan a los microorganismos, esta es una práctica rutinaria en los laboratorios para la disposición final de residuos. Con esto podemos obtener de forma rápida y eficaz una esterilización. ^{1,4,7,9,10,12,14}

Flameado.

Este método consiste en colocar directamente los objetos en la flama del mechero y/o utilizando alcohol (ej. asas bacteriológicas, superficies, botellas, etc.). ^{1,2}

CICLO DE ESTERILIZACIÓN.

Varios factores influyen en el logro de un buen ciclo de esterilización y pueden ser considerados como: ^{1,2,3,9,11}

Tiempo de generación de calor.- Es el tiempo necesario para que el calor penetre en cada objeto de la carga y será siempre mayor que el tiempo requerido para que el autoclave llegue a la temperatura de esterilización. Otro factor que influye en la penetración del calor es la rapidez con la cual la cámara del autoclave llega a la temperatura de esterilización; entre más tardada sea ésta habrá más probabilidades de que la cámara y la carga lleguen a esta temperatura simultáneamente.

Tiempo de retención.- Es el tiempo necesario para asegurar que todos los microorganismos, ya sea en estado de spora o vegetativos mueran a la temperatura empleada.

Tiempo de seguridad.- Se agrega tiempo adicional como un factor de seguridad que es habitualmente la mitad del tiempo de retención y el período total constituye el tiempo o ciclo de esterilización.

III.- ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN

Existen sustancias líquidas que no pueden ser esterilizadas por calor ya que son termolábiles o sensibles a agentes físicos como la radiación, en consecuencia queda la opción de esterilizar por filtración. Existen en la actualidad filtros disponibles con poros de distintos tamaños en milimicrones, algunos para detener muchos de los virus y pueden detener bacterias que contengan toxinas. Los filtros utilizados para la esterilización están diseñados para retener a las bacterias, pero dejan pasar virus.^{1,9,13,14}

Fundamento.

La remoción de los microorganismos de los líquidos por filtración se lleva a cabo de muchas maneras y tiene muchas aplicaciones. El paso de los líquidos a través de filtros de esterilización es auxiliado mediante el uso de presión de aire negativa cuidadosamente regulada, generada por una bomba de agua tipo venturi o por una bomba eléctrica de vacío y frecuentemente con menos aire a presión positiva generada por aire comprimido o por una bomba compresora cíclica. La presión de aire negativa que se emplea, se regula mediante un manómetro con una válvula de vacío y debe estar de 2000 a 4000 mmHg. La eficiencia del filtrado no depende solamente de la porosidad del filtro sino también de la carga eléctrica del filtro y del microorganismo, así como la naturaleza de los líquidos que se filtran.^{1,2,4,5,11,12,13}

Material que se esteriliza por este método.

Este método es particularmente adaptable para la esterilización de las soluciones de antibióticos, líquidos termolábiles como el suero sanguíneo y algunas soluciones de carbohidratos que se usan para la preparación de medios (O-F, urea, medios para la utilización de carbohidratos), sustancias como enzimas y algunas vitaminas.

Tipos de filtros.



Filtro de disco de asbesto.

-Estos filtros también llamados filtro Seitz son fabricados de criolita, un tipo de asbesto, que químicamente está constituido por silicato de magnesio.

-El disco está sostenido en una montura de metal y es insertado con su lado áspero hacia arriba, asegurando la rejilla metálica de soporte en posición. El filtro se ajusta al frasco de vacío por medio de un tapón de hule de silicón.

-Resiste repetidas esterilizaciones en la autoclave.

-Existen diferentes tipos de filtro dependiendo de lo que se quiera remover como son pirógenos, remoción de pequeños microorganismos de líquidos muy infectados, para esterilización absoluta, empleando condiciones estándar para esterilizar y eliminar a la *Serratia marcescens*.^{1,4,9,12,13,14}

Filtros de membrana.

-Estos están constituidos por membranas porosas compuestas de ésteres puros de celulosa biológicamente inertes. Existen fabricados con nitrato de celulosa o con nitrato acetato de celulosa y tienen porosidades que fluctúan desde 5 milimicrones hasta 10 micrones, los filtros más utilizados en Microbiología son los filtros con poros de 0.22μ y 0.45μ , los cuales retienen las bacterias más pequeñas que existen.

-Cada tipo de filtro retiene sobre su superficie todas las partículas de bacterias y células cuyo tamaño exceda al del poro.

-Ciertos tipos de filtros de membrana deben ser esterilizados mientras que se folian entre discos de papel filtro y se instalan en la unidad filtrante, cuando así se requiere, empleándose una técnica aséptica.

-Evitarse temperaturas en exceso a 121°C , ya que las membranas no toleran calentamiento arriba de 125°C .^{1,2,3,4,13,14}

IV.- ESTERILIZACIÓN POR AGENTES QUÍMICOS.



Si se considera la mejor manera de manejar un problema relacionado con la destrucción de los microorganismos, el calor debe ser siempre el método de elección; sin embargo, hay muchos casos en los cuales el único modo satisfactorio y conveniente es con el uso de agentes químicos. Estos pueden afectar de diferente manera al microorganismo y su modo de acción puede ser:^{2,3,6,9,11,13}

- Coagulación de proteínas.
- Ruptura de la membrana celular.
- Remoción de los grupos sulfhidrilo libres.
- Antagonismo químico.

Gases.

Los agentes químicos que se vaporizan con facilidad pueden considerarse como elementos gasificantes utilizables para la esterilización, se consideran tres compuestos que son el óxido de etileno, formaldehído y la betapropiolactona.^{1,2,3,4,9,11,12,13}

Fundamento

Estos gases ejercen una potente acción letal sobre las bacterias y los virus por alquilación de grupos de enzimas y de estructuras bioquímicas complejas dentro de la molécula proteica.^{1,2,3,9,10,12,13}

Oxido de etileno.

- Es un líquido incoloro que a temperatura y presión normales es un gas muy penetrante con un dulce olor etéreo, la tendencia explosiva del gas se puede eliminar mezclándolo con gases inertes.
- Puede emplearse con equipo adecuadamente diseñado.
- Su uso principal es en la esterilización de material y equipo que no puede esterilizarse por otros medios.
- La ventaja del óxido de etileno radica en que puede penetrar sin dañar los materiales como son: vidrio, metales y superficies de papel, telas, plásticos, talcos, minerales, tierra, algunos alimentos y tabaco.
- Los factores que influyen sobre la acción esterilizante del óxido de etileno son: el tiempo, la temperatura, la humedad, la presión del gas, la naturaleza del material y el grado de contaminación.
- La acción del gas sobre el microorganismo radica en su poder alquilante sobre los grupos sulfhidrilo, amino, carboxilo o hidroxilo de la molécula proteica.^{3,2,6,9}

Formaldehído.

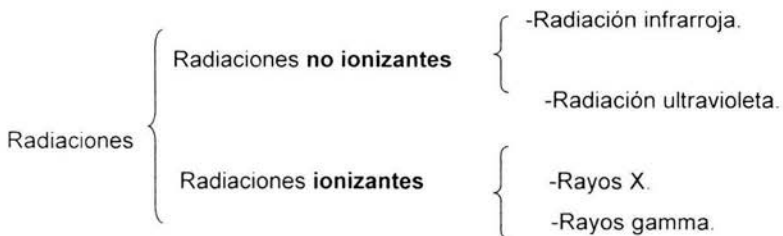
- El formaldehído es el más simple y se usa principalmente para la desinfección gaseosa.
- Es activo contra el grupo amino de las moléculas proteicas y en su forma acuosa es bactericida y esporicida, ejerce también un efecto letal sobre virus de la influenza y poliomielitis. ²
- La esterilización por este gas es reservada para aquellos artículos que no se deben mojar con soluciones o que no se puedan someter a altas temperaturas.
- En estado gaseoso tiene un uso limitado para la esterilización de instrumentos, ropa y en la fumigación de libros y habitaciones. ²
- Debe tenerse precauciones ya que es muy irritante y tóxico si se inhalan los vapores.

Beta-propiolactona.

- Gas penetrante y eficiente cuando se emplea para fumigar cuartos, capaz de matar a todos los microorganismos y es muy activo contra los virus, debido a esto se ha observado que es carcinógeno. por lo tanto debe limitarse su uso. ²

V.- ESTERILIZACIÓN POR RADIACIONES.

De las diversas clases de radiación, aquellas que se emplean con propósito de esterilización caen en dos grupos que difieren entre sí tanto en su naturaleza como en su magnitud de energía. ^{1,2,3,4,6,9,11,12,14}



Radiaciones No Ionizantes.

Son radiaciones con longitud de onda más larga que las de la luz visible y en gran medida son absorbidas como el calor, sin partículas. ^{2,3,12}

-Radiación infrarroja.

Este es un método muy conveniente para esterilizar grandes cantidades de jeringas en un lapso comparativamente bajo de tiempo, por lo general todo el proceso dura alrededor de 30 minutos. ^{2,3}

Fundamento.

La forma de esterilización es con aire caliente, ya que los microorganismos son muertos por oxidación como resultado del calor generado.

-Radiación Ultravioleta.

La aplicación de los rayos ultravioleta como agente de esterilización se fundamenta en la reducción de las bacterias en el aire, en el agua o en las superficies contaminadas, debido a que este tipo de radiación tiene un poder de penetración muy bajo pero un alto grado de transmisión. Los rayos ultravioleta de la luz solar tienen una longitud de onda de $2,900\text{Å}$, pero la longitud de onda más efectiva son más cortas y producidas por lámparas de vapores de mercurio con una emisión de $2,400$ a $2,800\text{Å}$, ya que toda clase de bacterias, virus, protozoarios y la mayoría de los hongos son vulnerables a los rayos ultravioleta con longitud menor a $3,000\text{Å}$.^{1,2,3}

Fundamento.

Las radiaciones ultravioletas son absorbidas por las proteínas y los ácidos nucleicos, matan a todos los microorganismos al provocar reacciones químicas que producen dímeros de timina dentro de los núcleos y de otros componentes de la célula, con lo cual se altera su material genético.^{1,2,3}

Radiaciones Ionizantes.

El tipo ionizante puede ser de radiación por partículas subatómicas como los rayos catódicos con electrones de alta energía producidos por generadores de alto voltaje (aceleradores lineales). Las radiaciones ionizantes son de corta longitud de onda, altamente letales y actúan ionizando moléculas a su paso, su poder de penetración es extremadamente alto por lo que los operadores deben estar protegidos con blindajes especiales.^{1,2,3,12,14}

Fundamento.

La acción letal de la radiación ionizante es debida a su efecto sobre el ADN del núcleo y los componentes vitales de la célula, no hay aumento en la temperatura y generalmente se le llama al método "esterilización en frío".^{1,3}

La bacterias vegetativas y los virus más grandes son muertos por fracción de la dosis esterilizante de 2.5 megarrads, siendo más susceptibles las bacterias Gram negativas que las Gram positivas. Las esporas bacterianas, hongos y los virus de 20 a 75 milimicrones, requieren radiaciones del orden de 1 a 2 megarrads.³

-Las radiaciones gamma.

La mayoría de los plásticos pueden ser esterilizados satisfactoriamente mediante este procedimiento, se usan dos fuentes de radiación gamma, el cobalto-60 con una energía de fotón de 1.3MeV y cesio-137 con una energía de fotón de 0.6MeV, ambos productos de reacciones atómicas. ^{1,3,13}

-Rayos X.

Presentan considerable energía y capacidad de penetración; y algunas desventajas para su uso son: No son prácticos para el control de poblaciones microbianas, por que cuesta mucho producirlos en cantidades suficientes y son difíciles de utilizar eficientemente ya que las radiaciones salen en todas direcciones a partir del punto de origen. ^{3,8,9,13}

OBJETIVOS.

- Conocer los diferentes métodos de esterilización, equipo y agente por el cual se obtiene la esterilización.
- Llevar a cabo los métodos de esterilización con calor húmedo, calor seco, filtración y radiación UV.
- Determinar qué método de esterilización es el más adecuado para cada tipo de material.
- Evaluar cuál de estos métodos de esterilización es el más efectivo de acuerdo a costo, tiempo y riesgo para el operador.

MATERIAL.

4 cajas de Petri grandes.

2 botellas de dilución o matraces.

4 tubos 13x100 con tapón de baquelita.

10 pipetas de cualquier volumen.

2 filtros millipore. (0.45 μ y 0.22 μ de nitrato o acetato de celulosa)

1 jeringa de 3 ó 5 mL.

10 cajas de Petri con agar soya tripticasa (AST).

10 hisopos.

Hojas de papel estraza.

Hojas de papel aluminio.

Gasa.

Algodón.

Cinta testigo.

Medios de Cultivo.

500 mL de AST estéril a 45°C.

500 mL de caldo soya tripticasa (CST) estéril a 45°C.

MATERIAL BIOLÓGICO.

1 tubo con suspensión bacteriana ajustada al 0.5 ó 1 del Nefelómetro de Mac Farland.

1 tubo con suspensión de esporas.

EQUIPO:

Autoclave.

Horno eléctrico.

Lámpara con luz ultravioleta.

MÉTODO.**Esterilización con calor húmedo.**

1. Envolver con papel estraza y cinta testigo 2 cajas de Petri y 5 pipetas en forma individual, para las botellas de dilución utilizar tapones de baquelita sin enroscar totalmente o en su defecto usar torundas envueltas con gasa y colocar un gorro de papel.
2. Llenar con agua el fondo del autoclave hasta la marca indicada por el fabricante o hasta el soporte de la canasta.
3. Introducir el material previamente preparado al autoclave dentro de la canasta del equipo (2 cajas Petri, 5 pipetas, 1 botella de dilución o matraz, 2 tubos de ensaye de 13X100, 1 tubo con suspensión bacteriana y 1 tubo con suspensión de esporas).
4. Llevar a cabo el proceso de esterilización de acuerdo a la tabla de resultados (Con purgado: 5lb/5min., 10lb/10min., 15lb/15min. Sin purgado: 5lb/5min., 10lb/10min., 15lb/15min).
5. Para purgar, abrir la válvula de salida de aire del autoclave e iniciar el calentamiento del autoclave vigilando la válvula de salida del aire hasta que aparezca un chorro de vapor y esperar de 3 a 4 minutos cuando el chorro de vapor sea uniforme y continuo, lo cual indica que el aire ha salido del autoclave (condición indispensable para alcanzar el efecto de esterilización).
6. En el caso de no realizar purgado, omitir el paso anterior y sólo iniciar el calentamiento del autoclave hasta el parámetro deseado.
7. Cerrar la válvula de salida del aire, verificar que la tapa esté bien cerrada y continuar el calentamiento regulando la temperatura hasta llegar al parámetro deseado.
8. Terminado todo el proceso, sacar todo el material, dejar que se enfríe y se seque.

9. Con hisopos estériles tomar de las suspensiones de bacterias y de esporas, y sembrarlas en cajas de AST, respectivamente.
10. Tomar una caja Petri y realizar un vaciado en placa utilizando AST.
11. Adicionar aproximadamente 20 mL de CST a una botella de dilución y 3 mL aproximadamente en cada uno de 2 tubos de 13X100 que no contengan medio y que hayan sido previamente esterilizados.
12. Introducir todo el material a la estufa (24hrs a 37°C)

Nota: Durante la manipulación del material estéril, medios estériles y las suspensiones de bacterias y de esporas se deben trabajar en área estéril, es decir, cerca del mechero a no más de 20 cm de distancia.

Esterilización con calor seco.

1. Preparar el material por esterilizar (2 cajas Petri, 5 pipetas, 2 tubos de 13X100 y una botella de dilución o matraz). Las cajas y las pipetas no se envuelven con papel y se colocan en cartuchos metálicos, los tubos y botellas o matraces se sellan con papel aluminio.
2. Aplicar el proceso de esterilización a 170°C durante tres tiempos diferentes (30, 60 y 90 minutos).
3. Terminado todo el proceso, sacar todo el material y dejar que se enfríe.
4. Tomar una caja Petri esterilizada previamente y realizar un vaciado en placa utilizando AST.
5. Adicionar aproximadamente 20 mL de CST a una botella de dilución y 3 mL aproximadamente en cada uno de 2 tubos de 13X100 que no contengan medio y que hayan sido previamente esterilizados.
6. Introducir todo el material a la estufa (24hrs a 37°C)

Esterilización por filtración.

1. Con la suspensión bacteriana ajustada a 10.5 ó 1 d el Nefelómetro de Mac Farland llenar dos jeringas con la suspensión en área estéril.
2. Colocar un filtro (0.45 μ ó 0.22 μ) en la jeringa y pasar las suspensiones por el filtros respectivamente.
3. Recibir los filtrados en un tubo estéril o en una caja de Petri con AST e incubar (24 Hrs./37°C).

Esterilización por radiación (U.V.).

1. Exponer una zona de la mesa de trabajo a la radiación U.V., durante diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120).
2. Con hisopo estéril tomar una muestra del área irradiada a los diferentes tiempos de exposición y sembrar en cajas de Petri con medio AST e incubar (24Hrs./37°C).

RESULTADOS.**CALOR HÚMEDO.**

CONDICIONES		CRECIMIENTOS (+) ó (-)				
		Vaciado en Placa	Vaciado en tubo	Vaciado en botella	Suspensión bacteriana	Esporas
Purgado	5 lb/in ² , 5 min					
	10lb/in ² , 10min					
	15lb/in ² , 15min					
Sin purgar	5 lb/in ² , 5 min					
	10lb/in ² , 10min					
	15lb/in ² , 15min					

CALOR SECO. A 170°C

TIEMPO	CRECIMIENTOS (+) ó (-)		
	En placa	En tubo	En botella
30 minutos			
60 minutos			
90 minutos			

FILTRACION.

FILTRO	CRECIMIENTOS (+) ó (-)	
	En placa	En tubo
0.22 micras		
0.45 micras		

LUZ ULTRAVIOLETA.

TIEMPO DE EXPOSICION	CRECIMIENTOS (+) ó (-)
0 minutos	
5 minutos	
10 minutos	
15 minutos	
30 minutos	
45 minutos	
60 minutos	
75 minutos	
90 minutos	
120 minutos	

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

CONCLUSIONES.

Cuestionario.

- a) ¿Qué es la esterilización?
- b) Describa brevemente los procesos de esterilización que conoce:
- c) ¿Qué tipo de esterilización es la más empleada en los laboratorios de Microbiología?

BIBLIOGRAFÍA.

1. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 20-30.
2. Block, S.S, Desinfection, Sterilization and Preservation. 4ª edición William & Wilkins. USA. (1995) págs.22-24, 32-33.
3. Breach, M. R., Esterilización. Métodos y Control. El Manual Moderno. México. (1976) Págs. 5-90.
4. Gaviño de la Torre G., Juárez L. J. Carlos, Figueroa T. Hugo. Técnicas Biológicas. 2ªedición. Limusa. México. (1995), págs. 26-28.
5. J. Tortora Genard., et al, Introducción a la Microbiología. 3ª. edición. Acribia. España. (1993) pags 170-189
6. Lennette H. Edwin. Manual de Microbiología Clínica. 4ª. Edición. Panamericana. Argentina. (1993) págs. 173-182
7. Letayf, J.,González, G. C. Seguridad, Higiene y Control Ambiental. Mc Graw Hill. México. (1994) 388 págs
8. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud. Serie Paltex. OPS – OMS. Colombia (1983) Págs. 33-38.
9. Pelczar, Jr. M. J. et al. Microbiología. 2ª edición. Mc Graw – Hill. México. (1982) Pág. 414-443.
10. Ponce de León, R. S., et al. Manual de Prevención y Control de Infecciones Hospitalarias. Organización Panamericana de la Salud-OMSS.(1995) Págs..49-61.
11. Rickwood, D. y Hames B. D. Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Vol. I Editado por T. A. Brown. Inglaterra. (1991). Págs. 16-17.
12. Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 2ª.edición.México.v (1999) págs. 20-26.
13. Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. Microbiología. Ediciones REPLA. México. (1986) Págs. 25-27.
14. William M. O Leary, Ph.D. Practical Handbook of Microbiology. 2ª. Edición. USA. (1990)págs.297-299.

CAPÍTULO No. 3

DESINFECCIÓN

INTRODUCCIÓN

Dentro del control de la contaminación microbiológica existe un proceso de destrucción y eliminación de microorganismos mediante el uso de agentes físicos y químicos, llamado **desinfección**, el cual se clasifica de acuerdo a la capacidad que posee un agente para destruir o eliminar un microorganismo en una área animada o inanimada, así como de la manera en la cual se lleve a cabo este proceso. ^{1,2,3,4,6,7,8,9,11,13,14,15}

Un agente desinfectante tiene como objetivo disminuir lo más posible la cantidad de microorganismos presentes en algún lugar determinado. Entre los agentes físicos que se emplean en la desinfección se encuentran el calor húmedo, la pasteurización, la ebullición, el vapor y el calor seco. ^{1,2,3,6,9,11,14}

Entre los agentes químicos tenemos algunos compuestos que se utilizan y poseen diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas, con las cuales se puede obtener una eficacia cercana al 100%, sin embargo presentan cierta toxicidad algunos más que otros por lo cual hay que tener cuidado en su manejo. Para cada superficie, lugar o medio en el cual se quiere realizar una desinfección se deben evaluar los compuestos disponibles, además de ver qué microorganismo se encuentra presente para el uso del compuesto químico que puede ser: **sanitizante, desinfectante, antiséptico o esterilizante**. ^{1,2,3,8,9,14}

Es importante llevar a cabo la **desinfección**, ya que con esto se puede prevenir y controlar la diseminación de un microorganismo. También se evitan pérdidas económicas en la industria así como la contaminación en áreas clínicas de hospitales que traen como consecuencias en ocasiones que se agraven más los pacientes que ahí se encuentran y también se vea afectado el personal que labora en dicho lugar.

Considerando la importancia de la **desinfección**, tanto en el área industrial como en el área clínica, existen lineamientos ya establecidos, los cuales describen la sanitización de edificios, disposición de desechos, limpieza y mantenimiento de equipo, es decir el control de la contaminación microbiológica. Algunos procesos de este control se llevan a cabo tomando en cuenta la aplicación de acciones preventivas, entre las cuales destaca el uso adecuado de agentes antimicrobianos para la eliminación de microorganismos. ^{7,11,13}

De acuerdo a su aplicación dichos agentes se clasifican en:

- Sanitizante**.- Es la sustancia capaz de matar en 30 segundos al 99.99% de una bacteria.
- Desinfectante**.- Agente empleado para la destrucción de microorganismos patógenos de superficies inanimadas.
- Antiséptico**.- Agente que es empleado para destruir patógenos sobre tejidos vivos.
- Esterilizante**.- Agente capaz de eliminar o destruir todo microorganismo presente.

Algunos términos relacionados con las propiedades biológicas de los agentes antimicrobianos son:

Bactericida	}	Eliminación del microorganismo.
Fungicida		
Virucida		
Bacteriostático	}	Detiene el crecimiento microbiano.
Fungistático		
Germicida	→	Elimina a todos los gérmenes.

ELECCION DE UN DESINFECTANTE.

Es de gran responsabilidad e importancia elegir el antimicrobiano adecuado para el área de trabajo, equipo, material y utensilios que ahí se encuentren. Como ya se mencionó existen procedimientos establecidos y diseñados de tal forma que prevengan la contaminación indeseable así como el proceso que evalúe si realmente se llevó a cabo la desinfección de un área dada (Cuadros 3.1 y 3.1 a).^{4,7,11,15}

FUENTES DE CONTAMINACIÓN Y SU REPERCUSIÓN EN LA INDUSTRIA, EN HOSPITALES Y LABORATORIOS.

FUENTE DE CONTAMINACIÓN.	CONSECUENCIAS.
Materias Primas. Instalaciones. Equipo. Personal. Material de Empaque.	} Contaminación y pérdidas económicas.
Areas Aisladas. Terapia Intensiva. Areas de Diagnóstico.	} Contaminación e infección.

Para elegir el antimicrobiano adecuado además de considerar el medio en el cual se va a realizar la **desinfección**, tipo de material y área es importante tomar en cuenta el tiempo en el cual cumple su función y qué tan resistente es al desinfectante el microorganismo presente. ^{7,11,12}

Actualmente se conoce el orden decreciente de resistencia de los microorganismos a los desinfectantes, como a continuación se describe: ⁴



Es necesario tomar en cuenta la capacidad de mutar que tiene el microorganismo presente y su resistencia a desinfectantes; conociendo esto se pueden considerar los criterios de selección de un desinfectante o características de un buen desinfectante, tales como: ^{2,3,4,15}

Eficacia. Con un espectro amplio de actividad en el menor tiempo, con actividad a temperatura ambiente y con poca afinidad por la materia orgánica.

Toxicidad. Que cause daño a los microorganismos a bajas concentraciones.

Seguridad en el uso o inocuidad. Que no sea tóxico para humanos y animales.

Estabilidad y facilidad de manejo. No debe perder su actividad germicida durante almacenamientos prolongados.

Agresividad a superficies o corrosión. No debe ser corrosivo, ni manchar.

Acción residual y capacidad de penetración. Con actividad desodorante y detergente.

Disponibilidad. Económico y de fácil adquisición.

No resistencia. Que los microorganismos no sean resistentes y que no generen resistencia.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGENTES QUÍMICOS

Los mecanismos de acción de los agentes químicos son: ^{2,3,4,9,11,14,15}

Alteración de la permeabilidad celular o ruptura de la membrana. Esto se produce por concentración y absorción del agente químico en la membrana con lo que se alteran sus propiedades físicas y químicas; y del grado de daño que se produzca depende el grado de inhibición del crecimiento o bien la muerte.

Alteración de la naturaleza coloidal del protoplasma. Se produce por precipitación o coagulación de las proteínas del protoplasma debido a su desnaturalización, lo cual conduce a la muerte celular.

Inhibición de actividad enzimática. Se produce por oxidación intensa de las enzimas celulares, por medio de la combinación de un agente químico con los grupos sulfhidrilo de la enzima alterando su estructura química y por lo tanto su función desaparece.

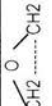
Antagonismo químico. Se da por la presencia de sustratos extraños a las enzimas celulares con similitud a los sustratos normales, los cuales pueden ser sustituidos y con esto se bloquea la reacción normal, viéndose afectada la función celular.

CUADRO 3.1 AGENTES QUÍMICOS USADOS EN EL CONTROL DE MICROORGANISMOS.

AGENTE QUÍMICO	ANTIASEPTICO O DESINFECTANTE	FORMULA O ESTRUCTURA	MECANISMO DE ACTIVIDAD	APLICACIONES	LIMITACIONES	VENTAJAS	ESPECTRO ANTI-MICROBIANO
CLORO	Gas cloro Hipoclorito de Sodio Cloraminas	Cl ₂ NaOCl NH ₂ Cl	Oxidación de proteínas. Lesiones en membrana	Tratamiento de agua. Antiséptico de piel. Rociado de equipo Procesamiento de alimentos.	Inactivado por materia orgánica	Efectivo a bajas concentraciones. Barato y accesible	Amplia variedad de bacterias, hongos, protozoarios y virus Esporicida.
YODO	Tintura de yodo Iodóforos	I ₂ + NaI + CH ₃ -CH ₂ -OH I ₂ + Agentes humectantes o tensoactivos	Halogena Irosimais en proteínas.	Antiséptico de piel. Procesamiento de alimentos. Preparación preoperatoria.	Inactivación por materia orgánica Olor desagradable e irritante.	Menos irritante que el cloro. Barato y accesible	Amplia variedad de bacterias, hongos, protozoarios y virus Es esporicida
FENOLES	Cresoles Hexacloroleno Hexylresorcinol Clorhexidina	CrH ₉ O C ₁₃ H ₁₁ O ₂ /Cl ₆ C ₁₇ H ₁₈ O ₂ C ₁₈ H ₁₇ N ₁₀	Coagula proteínas. Rompe membrana celular.	Conservador en general Antiséptico de piel con detergente.	Tóxico a tejidos. Olor irritante No esporocida Costosos	Estables. Poco efecto de la materia orgánica sobre su actividad.	Bacterias Gram positivas Algunos hongos
MERCURIO	Cloruro de mercurio Merthiolate Meraten	HgCl ₂	Combinación con grupos sulfhidrilo (-SH) en proteínas	Antisépticos de piel Desinfectantes Conservadores de sueros y vacunas.	Inactivado por materia orgánica. Tóxico a tejidos. Actividad lenta	Menos tóxico como merthiolate	Amplia variedad de bacterias, hongos, protozoarios y virus Esporicida
COBRE	Sulfato de cobre	CuSO ₄	Combinación con proteínas	Para control de algas en albercas. En agua municipal.	Inactivado por materia orgánica	-----	Algas y algunos hongos
PLATA	Nitrato de plata	AgNO ₃	Se enlaza a proteínas.	Antiséptico de piel y ojos de recién nacidos.	Irritación en piel.	-----	En tejidos afectados por gonococos.
ALCOHOL	Alcohol etílico al 70% Alcohol isopropílico	CH ₃ -CH ₂ -OH (CH ₃) ₂ CHOH	Desnaturalización de proteínas. Disolución de lípidos Deshidratación.	Desinfectante de instrumentos. Antiséptico de piel.	Se requiere prelimpieza Provoca irritaciones en piel. Volátil.	Accesible y económico Acción rápida y sin residuos. Estable.	Células bacterianas vegetativas, hongos, protozoarios y virus.

Modificado de Alcamo, I. E. (1991) y Lim, D. (1998).

CUADRO 3.1 a AGENTES QUIMICOS USADOS EN EL CONTROL DE MICROORGANISMOS. (Continuación)

AGENTE QUIMICO	ANTIASEPTICO O DESINFECTANTE	FORMULA O ESTRUCTURA	MECANISMO DE ACTIVIDAD	APLICACIONES	LIMITACIONES	VENTAJAS	ESPECTRO ANTI MICROBIANO
FORMALDEHIDO	Gas formaldehído Formalina	CH ₂ O	Reacciona con grupos funcionales en proteínas y ácidos nucleicos.	Embalsamamiento. Producción de vacunas. Esterilizante gaseoso.	Pobre penetración. Alérgico y tóxico a tejidos. Es neutralizado por materia orgánica.	Puede usarse como vapor o en solución.	Gran variedad de bacterias, hongos, parásitos y virus.
OXIDO DE ETILENO	Gas oxido de etileno		Reacciona con grupos funcionales en proteínas y ácidos nucleicos.	Esterilización de instrumentos, equipo y objetos sensibles al calor.	Explosivo. Tóxico a la piel. Requiere humedad constante.	Esporocida con excelente penetración.	Todos los microorganismos, incluyendo esporas.
GLUTARALDEHIDO	Glutaraldehído	C ₅ H ₈ O ₂	Reacciona con grupos funcionales en proteínas y ácidos nucleicos.	Esterilización de material quirúrgico.	Inestable. Tóxico a la piel.	Acción rápida. No le afecta la materia orgánica. No es corrosivo.	Todos los microorganismos, incluyendo esporas.
PEROXIDO DE HIDROGENO	Peróxido de hidrogeno	H ₂ O ₂	Crece medioambiente aeróbico. Oxida grupos de proteínas	Tratamiento de heridas.	Uso limitado.	Estable a bajas concentraciones. Barato y accesible.	Bacterias anaerobias.
DETERGENTES CATIONICOS	Detergentes comerciales. Cetrimida Benzal	C ₁₅ H ₂₉ N ⁺ -C _n H _{2n+1} Br C ₉ H ₁₃ N ⁺ -C _n H _{2n+1} Cl	Disolver lípidos en membranas celulares.	Sanitización industrial. Antiséptico de piel. Desinfectante.	Neutralizados por jabones	Poco tóxicos. Baratos y accesibles. No corrosivos.	Gran variedad de microorganismos.
COLORANTES DE TRIFENILMETANO	Verde de malaquita Cristal violeta	C ₂₃ H ₂₅ N ₂ Cl C ₂₅ H ₃₀ N ₂ Cl	Reaccionan con componentes citoplásmicos.	Heridas. Infecciones en piel.	Tinción residual.	Útiles a muy bajas concentraciones.	Staphylococcus. Algunos hongos. Bacterias Gram positivas.
COLORANTES DE ACRIDINA	Acriflavina Prolavina	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ C ₁₃ H ₁₁ N ₂ C ₁₃ H ₁₁ N ₃	Reaccionan con componentes citoplásmicos.	Infecciones en piel.	Tinción residual.	Útiles en infecciones de heridas.	Staphylococcus. Bacterias Gram positivas.
ACIDOS	Acido benzoico Acido salicílico Acido undecílimo Acidos láctico y propiónico	C ₇ H ₆ O ₂ C ₇ H ₆ O ₃ CH ₂ =CH(CH ₂) ₉ CO ₂ H C ₃ H ₆ O ₃ CH ₃ CH ₂ COOH	Alteran el pH	Infecciones en piel. Conservadores de alimentos	Irritación en piel.	Incrementan los efectos de los desinfectantes y antisépticos. Los hace más solubles.	Muchas bacterias y hongos.

Modificado de Alcamo, I. E. (1991) y Lim, D. (1998).

MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES

Existen algunos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de los desinfectantes, los cuales se realizan con respecto a un microorganismo testigo.

COEFICIENTE FENOLICO.

Un método efectivo para medir la efectividad desinfectante de un agente químico lo constituye la determinación del coeficiente o índice fenólico (CF), donde la efectividad de un desinfectante es comparada con la del fenol. El CF es una prueba comparativa usando un microorganismo estándar tal como Staphylococcus aureus, o bien Salmonella typhi.^{2,3,4,5,13,15}

Un CF mayor que 1 indica que el desinfectante es más efectivo que el fenol y si es menor que 1 indica que es menos efectivo. El CF se determina mediante diluciones del fenol y del desinfectante problema, las cuales son mezcladas con una bacteria estandarizada de las ya mencionadas; y mediante la observación de desarrollo bacteriano se determina qué diluciones han matado a los microorganismos después de una exposición de 10 minutos al desinfectante, pero no después de 5 minutos de exposición (Tabla 3.1).^{2,3,4,5,14}

TABLA 3.1 DETERMINACIÓN DE DILUCIÓN MÍNIMA EFECTIVA Y COEFICIENTE FENÓLICO PARA EL HEXACLOROFENO.

DESINFECTANTE	DILUCION	CRECIMTO. MINUTOS	CRECIMTO. MINUTOS	CRECIMTO. MINUTOS
		5	10	15
FENOL	1:10 - 1:70	--	--	--
	1:80	+	--	--
	1:90	+	+	--
	1:100	+	+	--
	1:110 - 1:500	+	+	+
HEXAFLOROFENO	1:10 - 1:150	--	--	--
	1:160	+	--	--
	1:170	+	+	+
	1:180	+	+	+
	1:190-1:500	+	+	+

El inverso de la dilución del desinfectante problema es luego dividido por el inverso de la dilución del fenol para obtener el CF del desinfectante. El CF es usado para desinfectantes mejores que el fenol, ya que el fenol es alergénico e irritante a los tejidos y por esto es raramente utilizado.¹⁵

$$\text{COEF. FENOL.} = \frac{\text{INVERSO DE LA DILUCIÓN DEL HEXACLOROFENO}}{\text{INVERSO DE LA DILUCIÓN DEL FENOL}}$$

$$\text{CF.} = \frac{160}{80} = 2.0$$

METODO DE GARDNER (MICROENSAYO).

Este método se realiza en condiciones de esterilidad, determinando la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en medio de cultivo. Se emplean trozos de materiales estériles tales como aluminio, madera y cartón; a los cuales se les agrega 0.01 mL de un cultivo bacteriano de *S. aureus*, se incuban 5 min. / 37°C, posteriormente se adiciona 0.04 mL de la solución desinfectante problema a cada material, se incuban 10 min. / 37°C. Cada uno de los trozos de material por separado se depositan en tubos con caldo BHI que se incuban 24 hrs. / 37°C. Los tubos en los que se presente turbidez (crecimiento) indican que el desinfectante no es efectivo, mientras que cuando no se presente turbidez el desinfectante si fue efectivo. Para comprobar lo anterior, se inoculan placas con medio enriquecido (agar soya tripticasa) con una asada del caldo turbio incubando 24 hrs. / 37°C permitiendo observar colonias de *S. aureus*.¹⁰

METODO DE PRUEBA EN USO.

Este método sirve para determinar la efectividad de un desinfectante de una manera más aproximada a la realidad; consiste en tomar muestras con hisopos estériles de diversas superficies en el laboratorio antes y después de la aplicación de un desinfectante a diferentes concentraciones de uso y posteriormente se inoculan las muestras tomadas en medios de cultivo enriquecidos para determinar si se produce crecimiento.¹

OBJETIVOS.

- Obtener los conocimientos básicos para poder elegir un desinfectante adecuado para el tipo de microorganismo, superficie y lugar donde se encuentre.
- Evaluar un desinfectante mediante la determinación de su concentración efectiva y su coeficiente fenólico.

MATERIAL. (Por equipo)

10 Tubos con tapón de rosca estériles.

Asa Bacteriológica.

1 Gradilla.

2 Mecheros.

Pipeta graduada de 1mL estéril.

Pipeta graduada de 5mL estéril.

5 cajas Petri con Agar de Lethen.

Hisopos estériles.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Bacteria Gram (-) *Salmonella typhi* o *Pseudomonas aeruginosa* en CST.

Bacteria Gram (+) *Staphylococcus aureus* en CST.

REACTIVOS.

- Desinfectantes.

Benzal concentrado.

Fenol al 5%.

Etanol absoluto o al 96%.

Cloro 5%.

Algún desinfectante comercial (opcional)

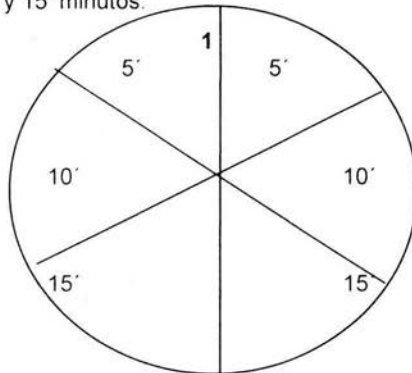
Formaldehido sol., al 37-39% (opcional)

- Agua destilada estéril.

MÉTODO.

CONSIDERACIONES.

1. Sobre la caja Petri en la parte que contiene el agar, marcar cada una de las 5 cajas del 1 al 5, marcar una línea que divida cada caja en dos, dividir cada parte de la caja en tres partes y marcar en cada parte 5', 10' y 15' minutos.



2. Cada caja va a utilizarse para dos tubos por lo cual hay que marcar cada parte con el número de tubo que va a ocuparse.
3. Al comenzar a trabajar hay que encender los mecheros, para mantener esteril el área de trabajo.
4. Al tomar el inóculo del medio con la pipeta estéril y llevarlo al tubo que contiene el desinfectante no se debe hablar ni alejarse más de 20 cm de los mecheros para evitar que se contaminen los medios de cultivo.

DETERMINACION DEL COEFICIENTE FENOLICO.

1. Las pruebas se realizan por bloques, trabajando con un desinfectante y 10 tubos con 4.5 mL de desinfectante previamente diluido para obtener determinadas concentraciones (Tabla 3.2).
2. Adicionar a cada tubo 0.5 mL de una bacteria ya sea Gram (+) ó (-) de un cultivo en caldo CST de 24 horas esperando 30 segundos entre cada adición de bacteria por tubo.
3. Cuando se llegue al tubo número 10 se habrán cumplido 5 minutos, para el tubo número 1 enseguida se toma muestra de este tubo y se siembra con hisopo estéril en la caja correspondiente para el tubo 1 en el tiempo de 5 minutos, y así sucesivamente cada 30 segundos hasta el tubo 10.
4. Se repite el procedimiento anterior en donde se cumplirán 10 minutos para cada tubo.
5. Se repite lo anterior para los 15 minutos.
6. Se incuban las cajas 24 horas a 37°C y se revisan si hubo crecimiento.
7. Se registran los resultados y se determina la concentración efectiva que mata en 10 minutos pero no en 5 (tablas 3.3).

8. Con los resultados de todos los desinfectantes se determinan los CF (Tablas 3.1 y 3.4).
9. Determinar el desinfectante y su concentración más adecuada para el empleo en el laboratorio de microbiología (Tabla 3.4).

TABLA 3.2 DESINFECTANTES EMPLEADOS Y SUS CONCENTRACIONES.

TUBO/ DESINFECT.	COLORO (%)	ALCOHOL (%)	FENOL (%)	BENZAL (%)
1	5	100	5	100
2	4	90	4	90
3	3	80	3	80
4	2	70	2	70
5	1	60	1	60
6	0.5	50	0.50	50
7	0.4	40	0.25	40
8	0.3	30	0.12	30
9	0.2	20	0.06	20
10	0.1	10	0.03	10

TABLA 3.3 RESULTADOS OBTENIDOS PARA UN DESINFECTANTE.

DESINFECTANTE: _____

CAJA	TUBO	CONC.	DILUCION	CRECIMTO. Mins.	CRECIMTO. Mins.	CRECIMTO. Mins.
				5	10	15
1	1					
1	2					
2	3					
2	4					
3	5					
3	6					
4	7					
4	8					
5	9					
5	10					

TABLA 3.4 CONCENTRACIONES Y DILUCIONES MINIMAS EFECTIVAS PARA LOS DESINFECTANTES EVALUADOS.

DESINFECT.	CLORO	ALCOHOL	FENOL	BENZAL
CONCENTR.				
DILUCION				
COEF.FENOL.				

OBSERVACIONES:

ANALISIS DE RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

Cuestionario.

- ¿Qué es la desinfección?
- Defina brevemente los siguientes términos: desinfectante, sanitizante y antiséptico.
- ¿Qué formas microbianas son más resistentes y cuáles menos resistentes a los desinfectantes?
- Describa brevemente cómo se determina el coeficiente fenólico de un desinfectante:

BIBLIOGRAFIA.

1. Alcamo, I. E. *Fundamentals in Microbiology*. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1991) Págs. 733-760.
2. Alvarez Manrique, C. I., Mendoza Elvira, S. E. *Manual Básico de Bacteriología*. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 31-43.
3. Block, S.S. *Desinfection, Sterilization and Preservation*. 4ª edición William & Wilkins. USA. (1995) págs. 22-24, 32.
4. Breach, M. R., *Esterilización. Métodos y Control. El Manual Moderno*. México. (1976) Págs. 5-90.
5. Engler, R. *Disinfectants*. En *Official Methods of Analysis*. Environmental Protection Agency. EU. (1984) Págs. 65-77.
6. Johnson, T. R., Case, Ch. L. *Laboratory Experiments in Microbiology*. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1992) Págs. 139-162.
7. Krueger, W. B., Kolodziej, B. J. *Laboratory Procedures for General Microbiology*. Kendall / Hunt Publishing. EU. (1986) Págs. 100-105.
8. Lennette H. Edwin. *Manual de Microbiología Clínica*. 4ª. Edición. Panamericana. Argentina. (1993) págs. 173-178.
9. Lim, D. *Microbiology*. 2a. Edición. WCB/McGraw-Hill. EU. (1998) Págs. 119-125.
10. Ortega, L. M., García, V. S., y Cruz, S. T. A. *Manual de Prácticas de Microbiología Veterinaria*. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. Págs. 98-101.
11. Phillips, J. A., Brock, T. D. *General Microbiology: A Laboratory Manual*. Prentice - Hall. EU. (1984) Págs. 57-61.
12. Ponce de León, R. S., et al. *Manual de Prevención y Control de Infecciones Hospitalarias*. Organización Panamericana de la Salud – OMS. (1995) Págs. 44-52, 84-91.
13. Rickwood, D. y Hames B. D. *Essential Molecular Biology. A Practical Approach*. Vol. I Editado por T. A. Brown. Inglaterra. (1991). Págs. 19-17.
14. Romero C. R. *Microbiología y Parasitología Humana*. 2ª edición. México. (1999) págs. 20-26.
15. William M. O Leary, Ph.D. *Practical Handbook of Microbiology*. 2ª. Edición. USA. (1990) Págs. 297, 302-304.

CAPÍTULO No. 4

MEDIOS DE CULTIVO

INTRODUCCIÓN

Sin lugar a dudas debe resaltarse el impacto de las enfermedades infecciosas producidas por microorganismos, principalmente bacterias, ya que vivimos con la constante amenaza de estas enfermedades, algunas leves y otras severas, pero invariablemente más amenazadoras cuando nuestros mecanismos de defensas se debilitan y peor aún si existen microorganismos con un desarrollo de resistencia a los fármacos antimicrobianos. El aislamiento y la identificación de los patógenos viables, es básico para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y con esto se puede dar un tratamiento más efectivo para prevenir o eliminar la infección por un microorganismo determinado.^{2,3,5,6}

Hace sólo unos años la Microbiología era principalmente una ciencia aplicada dedicada al estudio de los microorganismos que alteran la salud de los hombres y/o su bienestar económico. En la actualidad la Microbiología a pesar del desarrollo de la genética molecular, la cual se basa fundamentalmente en el estudio de las mutaciones microbianas, el cultivo de microorganismos representa una etapa importantísima en el desarrollo de otros métodos microbiológicos.^{3,4}

Para la identificación de todos los microorganismos que afectan al ser humano en su salud y economía existen métodos o técnicas, las cuales permiten el cultivo y caracterización del microorganismo causante del daño, los primeros métodos disponibles para el aislamiento del microorganismo fueron llevados a cabo por Roberto Koch, donde los resultados obtenidos eran muy pobres, estos métodos consistían en la utilización de humor acuoso de buey y posteriormente la superficie de patatas para favorecer el crecimiento confluyente, así también el empleo de gelatina tiene la desventaja de conservar su consistencia sólida sólo a temperaturas relativamente bajas y muchos organismos eran capaces de licuarla. Posteriormente, Frau Hesse, introdujo el agar, el cual era un producto japonés de utilidad doméstica y con esto el mundo de los microbiólogos está en deuda.^{4,6}

CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo por su estado físico se clasifican en **sólidos**, **semisólidos** y **líquidos (caldo)**, lo cual está determinado por la presencia (cantidad) o ausencia de agar, respectivamente (Cuadro 4.1).

El agar al entrar en combinación con algunos compuestos nutritivos se convierte en un **medio de cultivo** sólido o semisólido; dependiendo del tipo de constituyente éste presenta ciertas propiedades, permitiendo su uso para fines definidos, clasificando así a los medios de cultivo sólidos en (Cuadro 4.1): ^{1,2,3,4,5,6}

- | | |
|---|-------------------------|
| a)Medios de Reanimación o de Inducción. | e)Medios Diferenciales. |
| b)Medios de Enriquecimiento. | f)Medios Indicadores o |
| c)Medios Enriquecidos. | Pruebas Bioquímicas. |
| d)Medios Selectivos. | g)Medios Nutritivos. |

- a) Los **medios de reanimación o inducción**, también denominados de pre-enriquecimiento, sirven para iniciar la proliferación y readaptación de microorganismos sometidos a procesos de conservación o almacenamiento como la congelación y el liofilizado, lo cual daña algunas estructuras celulares.
- b) Los **medios de enriquecimiento** favorecen el crecimiento de un microorganismo en particular, facilitando su aislamiento, lo cual se logra al emplear agentes bacteriostáticos inhibidores del crecimiento de microorganismos no deseados y sin afectar al microorganismo seleccionado. ⁵
- c) Los **medios enriquecidos** se componen de sustancias nutritivas acompañadas de otros compuestos reforzando su composición nutricional y sirven para el cultivo de microorganismos de difícil crecimiento o recuperación. ^{1,2,4}
- d) Los **medios selectivos** facilitan el crecimiento de un tipo de microorganismos, inhibiendo a otros microorganismos no deseados, contienen compuestos inhibidores muy selectivos, tales como: antibióticos, altas concentraciones de sales, sales biliares, metales y colorantes. ⁵
- e) Los **medios diferenciales** demuestran las características específicas de determinados microorganismos por medio de componentes indicadores de pH, óxido-reducción y carbohidratos.
- f) Los **medios indicadores o pruebas bioquímicas** ponen de manifiesto la actividad metabólica de los microorganismos, determinada por la presencia de enzimas activas, pudiéndose identificar y clasificar a los microorganismos. ⁵
- g) Por último, los **medios nutritivos** favorecen el crecimiento y conservación de microorganismos en general, y no contienen inhibidores de crecimiento. ^{1,2,4,6}

Los medios de cultivo se emplean para propagar, mantener, conservar o transportar bacterias, hongos, virus y en algunos casos parásitos de animales. Un medio no sólo debe respaldar el desarrollo de un microorganismo, debe permitir al microorganismo exhibir una morfología colonial típica en el medio. Los medios de cultivo también se utilizan para demostrar otras características de los microorganismos, por ejemplo: producción de ácido y gas en el medio por la fermentación de

hidratos de carbono o hemólisis de eritrocitos en el medio de agar sangre, todo esto sirve para la identificación del microorganismo. ^{1,2,4,6}

Los medios de cultivo de acuerdo a su preparación se van a utilizar específicamente para aislar microorganismos de ciertas muestras como: sangre, exudado ótico, heces, líquidos corporales, exudados del tracto respiratorio, orina, exudados vaginales, heridas (para sembrar hay que hacer un tratamiento previo a la muestra). En la industria se aplican para monitorear las materias primas, agua, equipos, producto semielaborado y producto terminado. ^{1,3,4}

Cabe mencionar que las bacterias se clasifican de acuerdo a su tipo de nutrición en **autótrofas** y **heterótrofas**, las primeras son bacterias del suelo y agua que obtienen carbono y nitrógeno de la atmósfera y de materia inorgánica simple; las segundas requieren de compuestos orgánicos más complejos como fuente de carbono y nitrógeno así como proteínas y sus derivados. El crecimiento de los microorganismos no sólo depende de los medios de cultivo, sino de algunos otros factores, en el caso de las bacterias son los siguientes: ^{1,3,4,6}

-Temperatura.

El crecimiento de los microorganismos se halla limitado entre ciertas temperaturas, por eso tenemos microorganismos:

Psicrófilos.- Temperatura óptima menor a 15°C.

Psicrótrofos.- Temperaturas de desarrollo entre 0-5°C.

Mesófilos.- Temperatura entre 10-45°C.

Termófilos.- Temperaturas altas de 45°Cy hasta 80°C.

Otros microorganismos son:

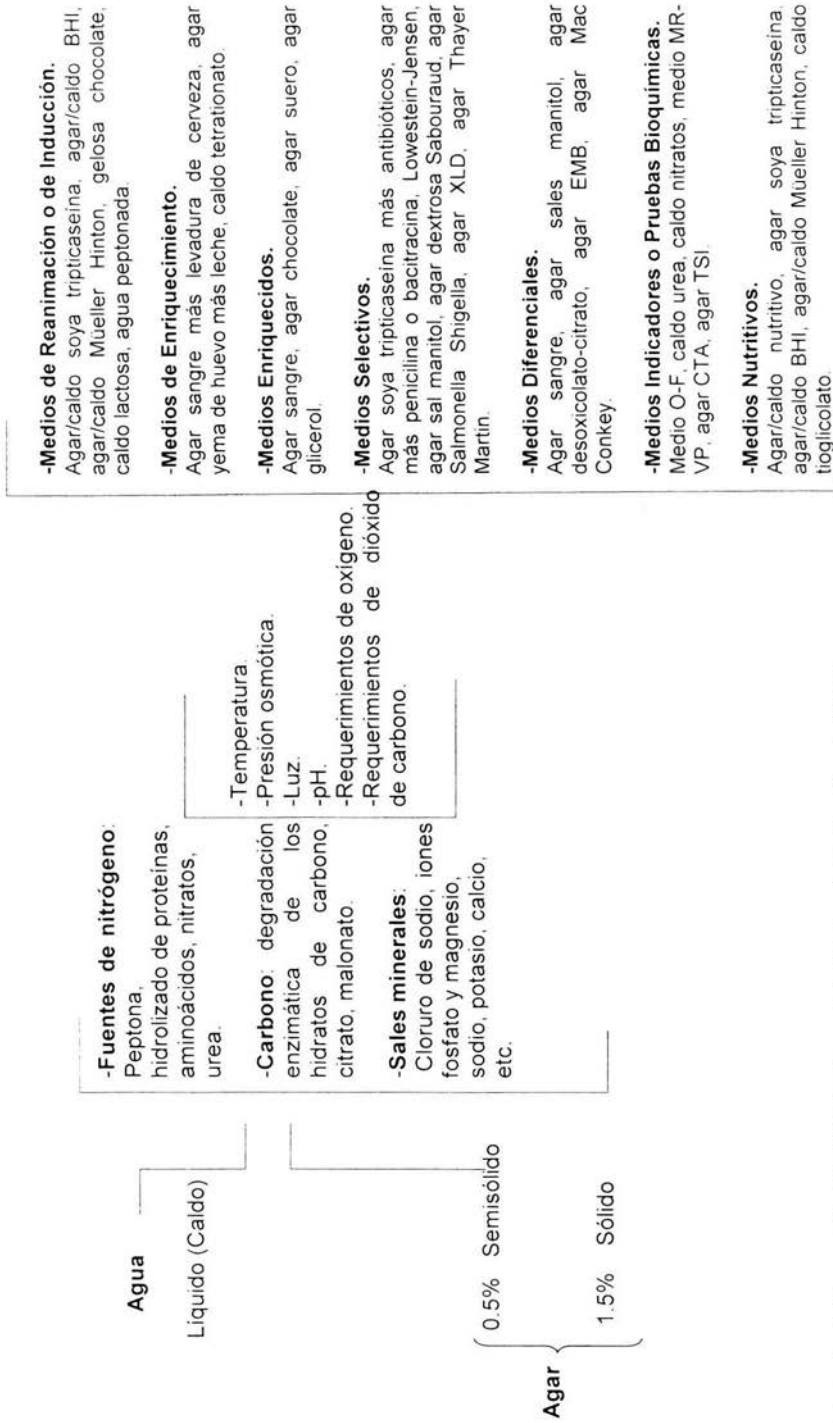
Estenotérmicos.- No permiten variaciones de temperatura para su desarrollo (*N. gonorrhoeae*).

Euritérmicos.- Se desarrollan en amplios rangos de temperatura.

-Necesidad Gaseosa.

No todas las bacterias son capaces de crecer en presencia de oxígeno atmosférico, por lo tanto tenemos bacterias:

CUADRO 4.1 CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.
 Requerimientos Mínimos Físicas y Químicas



Adaptado de Alvarez, M. C. I. (1994) y Manual de Medios de Cultivo Merck (1994)

Aerobias obligadas.- Sólo crecen en presencia de oxígeno.

Anaerobias obligadas.- Sólo crecen en ausencia total o parcial de oxígeno y requieren de CO₂.

Anaerobias facultativas.- Pueden crecer habiendo o no oxígeno.

Aerotolerantes. Son bacterias anaerobias que llegan a crecer limitadamente en incubación aerobia.

Microaerofilicas. Crecen en ambiente con bajo porcentaje de oxígeno (5%) y no crecen en condiciones aerobias (21% de O₂).⁵

-pH.

La mayoría de las bacterias crecen sobre un medio de cultivo con un pH aproximadamente neutro (pH=7).

-Suministro de dióxido de carbono.

Hay bacterias que necesitan de 5-20% de dióxido de carbono o más.

-Suministro de luz.

Otras bacterias son **fotoautótrofas** y **quimioautótrofas**, las primeras requieren la presencia de luz para sintetizar sus propios nutrientes, y las segundas requieren de reacciones de oxidación de sustancias inorgánicas para obtener energía.⁶

CONTROL DE CALIDAD EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

En la actualidad existen medios de cultivo conteniendo todos los constituyentes para el cultivo de microorganismos, donde sólo basta agregar la cantidad de agua correspondiente para preparar el medio requerido, estos medios de cultivo son distribuidos por casas comerciales.²

Durante la preparación se toman en cuenta ciertas consideraciones, permitiendo obtener una buena calidad del medio de cultivo y por consecuencia un óptimo cultivo de microorganismos. El control de calidad debe llevarse a cabo en los siguientes puntos:^{2,5}

- Proveedor adecuado y fecha de caducidad vigente.
- Seguir estrictamente las especificaciones del fabricante.
- Pesar correctamente en balanza calibrada.
- Medir volúmenes correctos.

- Hidratación y disolución, con agua bidestilada o desionizada con características óptimas en cuanto a pH (neutro) y ausencia de sustancias inhibitorias o promotoras de crecimiento microbiano.
- Determinación de pH con potenciómetro validado.
- Esterilización, manteniendo los parámetros óptimos para ésta.
- Vaciado, en área estéril.
- Identificación, envasado en bolsas de plástico, etiquetado y almacenamiento en refrigeración.
- Validación.** Se utilizan pruebas de esterilidad, de promoción de crecimiento y estabilidad (Cuadro 4.2).

Prueba de esterilidad al 4% de las unidades preparadas se les somete a incubación de 35-37°C / 24-48Hrs., en incubadora validada.

Promoción de crecimiento sembrando cepas conocidas con desarrollo definido tanto positivo como negativo según el tipo de medio a probar. (Tabla 4.2)

Estabilidad. realizando periódicamente pruebas de esterilidad y promoción de crecimiento de los medios almacenados para establecer la vigencia o caducidad.

- Documentación.** Se debe registrar la fecha de elaboración, la cantidad de unidades, el lote del medio, cantidades empleadas de agua, medio y aditivos, resultados de validación y observaciones.

Existen algunas recomendaciones para la preparación de los medios de cultivo desecados en presentación comercial, entre las que se encuentran: ^{1,2,5,7,8}

- a) Almacenamiento (protegidos de la luz, bien cerrados y de 15 a 30°C)
- b) Disolución (hidratación con la mitad del volumen necesario durante 15 minutos y después agregar la otra mitad y en recipientes del doble de volumen, además de agitación y calentamiento adecuados).
- c) Ajuste de pH (ajustar con ácido clorhídrico o sulfúrico 1N ó NaOH 1N).
- d) Esterilización (normalmente a 121°C, 15lb/in² y 15 minutos o según especificaciones, cuidando de dejar a medio cerrar los tapones de tubos o matraces).
- e) Vertido en placas (a 45-55°C, eliminar burbujas de aire en superficie con la flama no luminosa del mechero y eliminar exceso de humedad a 50°C/2Hrs., a 37°C/4Hrs., o temperatura ambiente/16Hrs.).

CUADRO 4.2 MEDIOS DE CULTIVO Y MICROORGANISMOS PARA VALIDACION.		
MEDIO	MICROORGANISMOS	OBSERVACION
Agar / Caldo Infusión Cerebro Corazón	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Cándida albicans</i>	Crecimiento Crecimiento Crecimiento Crecimiento Crecimiento
Agar Cetrimida	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. cepacia</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Crecimiento con un pigmento verde-amarillo. No crecimiento No crecimiento No crecimiento
Agar EMB	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Crecimiento / violeta sin brillo Crecimiento / incoloro Crecimiento / brillo verde metálico No crecimiento
Agar MacConkey	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	Crecimiento / rosa-rojo Crecimiento / incoloro Pobre o nulo crecimiento
Agar Sal Manitol	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Crecimiento / amarillo Crecimiento / blanco No crecimiento
Agar Dextrosa Sabouraud	<i>C. albicans</i> <i>A. Niger</i>	Crecimiento Crecimiento
Agar PIA	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	Crecimiento / pigmento No crecimiento
Caldo / Agar Nutritivo	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i>	Crecimiento Crecimiento Crecimiento Crecimiento Crecimiento
Agar / Caldo Soya Trypticaseína	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i> <i>Aspergillus Niger</i>	Crecimiento Crecimiento Crecimiento Crecimiento Crecimiento Crecimiento
Agar ENDO	<i>E. coli</i> <i>E. aerogenes</i> <i>S. choleraesuis</i> <i>S. aureus</i>	Crecimiento / rojo Crecimiento / brillo verde metálico Crecimiento / incoloro No crecimiento

Tomado de Castañeda, P., Giral, C. (1990)

OBJETIVOS.

- Definir qué es un medio de cultivo (características, composición, factores físicos y químicos).
- Diferenciar y clasificar a los medios de cultivos de acuerdo a su composición, a la coloración y el crecimiento de ciertos microorganismos.
- Preparar algunos medios de cultivo considerando las especificaciones del fabricante.

MATERIAL.

Autoclave.

Matraces Erlenmeyer

Vasos de precipitado.

Cajas Petri.

Tubos con tapón de rosca.

Balanza granataria o semianalítica.

Espátula.

Mecheros.

Tripie.

Gasa.

Algodón.

Agitador magnético con magnetos.

Jeringa de 10 mL.

REACTIVOS.

Botes de los medios correspondientes a preparar.

-Agar Sangre.	-Caldo Urea.	- O/F
-Agar chocolate.	-Caldo Malonato.	- SIM
-Agar Müller Hinton.	-Caldo MR/VP.	- Citratos.
-Agar Mac Conkey.	-BHI.	- TSI.
-Agar Sales Manitol.	-Caldo Arginina.	- MIO.
		- LIA.

Agua bidestilada o desionizada.

Sangre de carnero.

MÉTODO.

1. Considerar el control de: Peso correcto, utilización de agua bidestilada o desionizada; durante la preparación y vaciado mantenerse en área estéril.
2. Preparar los siguientes medios de cultivo según las especificaciones del fabricante.

Caja Petri	Caldos/tubo	Semisólidos y sólidos/tubo
-Agar Sangre.	-Caldo Urea.*	- O/F**
-Agar chocolate.	-Caldo Malonato.	- SIM
-Agar Müller Hinton.	-Caldo MR/VP.	- Citratos.
-Agar Mac Conkey.	-BHI.	- TSI.
-Agar Sales Manitol.	-Caldo Arginina.	- MIO.
		- LIA.
(5 a 6 cajas de c/u con 20 a 25 mL ó más de la mitad de la caja Petri).	(3 tubos de c/u)	(3-3.5mL/tubo).

3. Realizar la prueba de esterilidad para todos los medios preparados (37°C/24-48 Hrs.).
4. Realizar la promoción de crecimiento para los medios preparados en caja Petri tomando en cuenta la Tabla 1.

*Esterilizar por filtración, los demás por calor húmedo.

**El carbohidrato se esteriliza por filtración y se prepara 10 veces concentrado.

OBSERVACIONES y RESULTADOS.**Datos importantes en la preparación de medios de cultivo.**

Fecha de preparación: _____
Nombre del medio: _____ Marca: _____
Lote: _____ Fecha de caducidad: _____
Cantidad pesada: _____ Volumen de agua: _____ pH: _____
Procesos de esterilización: _____
Tiempo: _____ Temperatura: _____ Presión: _____
Filtros: _____
Aspecto final: _____
Prueba de esterilidad: _____
Promoción del desarrollo: _____
Preparó: _____

ANALISIS DE RESULTADOS.**CONCLUSIONES.****Cuestionario.**

- ¿Qué es un medio de cultivo?
- ¿Cuáles son los componentes básicos de los medios de cultivo?
- ¿Qué tipos de medios de cultivo conoce y para qué sirven?
- ¿Cuáles son los puntos críticos en la preparación de medios de cultivo?

BIBLIOGRAFÍA.

1. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 44-57.
2. Castañeda, P., Giral, C. Guía de Validación de Medios de Cultivo. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Dirección General de Control de Insumos para la Salud. Secretaría de Salud. México. (1990) Págs. 5-11, 27-32.
3. Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. Microbiological Methods. 7ª edición. Butterworth – Heinemann. Inglaterra. (1995) Págs. 60-93.
4. Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. Microbiología. Ediciones REPLA. México. (1986) págs. 27-49.
5. Koneman, E. W., et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1992). Págs. 169-173, 196-199, 489, 490, 570
6. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. Microbiología. 4ª.edición. Mc Graw-Hill. España (2000) págs. 97-108.
7. Manual de Medios de Cultivo. Merck. Alemania. (1994) 364 págs.
8. Manual Bioxon. Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico. Bioxon. México. 87 págs.

ANEXO 4.1

SISTEMAS DE CRECIMIENTO ANAEROBIO

Algunas bacterias denominadas **microaerofilicas** crecen mejor cuando están en condiciones de baja tensión de oxígeno, sin embargo, existen las bacterias **capnófilas**, las cuales requieren del dióxido de carbono para iniciar su crecimiento. Las condiciones de crecimiento anaerobio consisten fundamentalmente en proporcionar a las bacterias atmósferas que contengan del 5 al 20% de dióxido de carbono y un porcentaje muy bajo o nulo de oxígeno (Cuadro 4.3). Para obtener las condiciones anaeróbicas mencionadas es necesario contar con sistemas adecuados, entre los que están: Las **jarras anaeróbicas** con sistemas comerciales, los frascos o **recipientes con vela** y las **incubadoras de CO₂**. Entre las bacterias de crecimiento anaerobio se encuentran los géneros *Clostridium*, *Bacteroides* y entre las capnófilas *Neisseria* y *Haemophilus*.^{1,2}

CUADRO 4.3 CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE ACUERDO A SUS REQUERIMIENTOS DE O₂ Y CO₂.

Aerobios obligados	Anaerobios obligados	Anaerobios aerotolerantes	Aerobios fastidiosos exigentes	Anaerobios facultativos	Microaerofilo
(O ₂ = 21%) <i>Pseudomonas</i> <i>Micrococcus</i>	Estrictos (O ₂ < 0.5%) <i>Clostridium haemolyticum</i> Moderados (O ₂ =3%) <i>Bacteroides fragilis</i> . <i>Clostridium perfringes</i> .	(CO ₂ =5 a10%) <i>Clostridium carnis</i>	Capnófilas (CO ₂ = 3-5%) <i>Neisseria sp.</i> <i>Haemophilus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> .	(O ₂ = 5%) <i>Campylobacter jejuni</i> .

Adaptado de Koneman, E. W. (1992)

JARRAS ANAEROBICAS.

Actualmente existen modernas jarras para anaerobiosis, las cuales pueden ser metálicas o de policarbonato transparente y cuentan con tapas herméticas, además se utilizan catalizadores fríos y en su interior se colocan sobres o cojines con los reactivos necesarios para producir dióxido de carbono y disminuir la cantidad de oxígeno cuando se les agrega determinada cantidad de agua. Para el trabajo de rutina se emplean sobres comerciales como fuentes de hidrógeno y mezclas de hidrógeno-dióxido de carbono, lo cual representa un riesgo de explosión si se llega a tener cerca una flama; algunos sistemas comerciales de desarrollo reciente producen condiciones anaeróbicas sin la generación de hidrógeno, por lo que no existe el peligro de explosión, aunque se sabe que una mezcla de hidrógeno al 10%, dióxido de carbono al 10% y nitrógeno al 80% no es explosiva.

Uno de los sistemas comerciales más utilizados es la Jarra Gas Pack® (Difco) que consiste en una jarra hermética en la que se deposita un sobre generador de anaerobiosis, que contiene sales de borohidruro de sodio y bicarbonato de sodio que se activan con agua para producir H₂, y liberar CO₂ (Borohidruro de sodio + Bicarbonato de Sodio + H₂O → CO₂ + 2H₂), además se requiere de granalla de paladio como catalizador ($2\text{H}_2 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{paladio}} 2\text{H}_2\text{O}$). En estas condiciones se produce un 5% de CO₂, 10% de H₂, quedando de un 0.2 a 0.6% de O₂. Además se puede incluir un indicador redox de anaerobiosis que consiste en una tira impregnada con azul de metileno que vira de azul a blanco y si retorna a azul indica una fuga de CO₂ y entrada de O₂. Es importante tener la precaución de no destapar las jarras con anaerobiosis cerca de la flama del mechero, para evitar una probable explosión (Figura 4.1).^{1,2,3}

FIGURA 4.1 RECIPIENTES DE EXTINCIÓN CON VELA (VELOBIOSIS).



Alternativamente a las jarras de anaerobiosis y sus sistemas comerciales, se utilizan los recipientes con una vela, que consisten en jarras o frascos de vidrio o metal con tapa metálica, en cuyo interior se coloca una capa de algodón o gasa húmedos sobre lo que se colocan las cajas petri con los medios de cultivo y encima o a un lado se coloca una vela encendida, la cual se apaga cuando se coloca la tapa y proporciona el dióxido de carbono con gasto del oxígeno disponible. Sin embargo, estos sistemas solo se recomiendan por periodos cortos de tiempo, en tanto se pueden colocar los cultivos en jarras de anaerobiosis o en una incubadora de CO₂.

INCUBADORA DE CO₂.

Este tipo de equipos es utilizado comúnmente en laboratorios donde se trabaja principalmente con bacterias anaerobias y es abundante el volumen de trabajo; estos equipos cuentan con un tanque de CO₂ como fuente del mismo y un depósito de agua como fuente de humedad. Además, poseen un sistema para la extracción de oxígeno y sistemas reguladores de los porcentajes de humedad y dióxido de carbono.^{2,3}

FRASCO CONTENEDOR ANAEROBIO.

Es un complemento barato y conveniente a los sistemas antes descritos; se utilizan tres frascos contenedores, el primero para contener los medios sin inocular, el segundo para placas en las que crecen colonias que van a ser subcultivadas y el tercero para recibir placas recién inoculadas. Las placas a utilizar, se deben colocar previamente en jarra anaerobia o un recipiente con vela durante 4 a 15 horas, para reducir los medios; estos medios se colocan en el primer contenedor bajo el flujo continuo de una suave corriente de nitrógeno. Cada placa de medio reducido se inocula y de inmediato se coloca en el tercer recipiente, también con flujo continuo de nitrógeno. El segundo frasco se usa para colocar placas que se retiraron de la jarra de anaerobiosis y que requieren subcultivo. Después de que se llenó el frasco con placas recién inoculadas, éstas se transfieren a un sistema anaerobio convencional, como la jarra de anaerobiosis para incubación a 35°C. El nitrógeno que se emplea es grado comercial. Para extraer el aire de los frascos, el nitrógeno se regula a 1.6 lb/cm² durante 20 a 30 segundos, enseguida se regula a aproximadamente 0.20-0.40 lb/cm² y se regula el flujo en cada frasco de 50 a 100 mL/minuto (equivalente a 1-2 burbujas por segundo si se introducen los conductos en agua).³

Referencias.

1. Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. *Microbiological Methods*. 7ª edición. Butterworth – Heinemann. Inglaterra. (1995) Págs. 97 y 98.
2. Escobar, G. A.; et al. *Manual de Técnicas de Laboratorio*. Volumen 1. I.N.D.R.E.-Secretaría de Salud. México. (1995) Págs. BAC-117 – 128, BAC-173.
3. Koneman, E. W., et al. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1992). Págs. 501-506.

CAPÍTULO No. 5

TECNICAS DE SEMBRADO.

INTRODUCCION

Ya que se cuenta con los medios de cultivo (sólidos en caja de Petri y tubos, semi-sólidos en tubos y caldos en tubos o matraces), debidamente preparados, pueden ser utilizados para inocular una muestra deseada con microorganismos. El instrumento más utilizado para este fin es el asa de inoculación, la cual puede ser de un alambre de platino o nicromo en forma recta o de asa que se inserta en un mango para facilitar su esterilización y su manejo en las diferentes formas de siembra de una muestra. Actualmente se cuenta con asas de inoculación calibradas a ciertos volúmenes constantes siendo las más comunes las de: 1, 10, 50 y 100 μ L cuyo fin principal es establecer una técnica semicuantitativa de microorganismos en un inóculo; además existen asas estériles y desechables.^{1,2,3,4}

También pueden utilizarse hisopos (aplicadores de madera con algodón) estériles para este propósito de inoculación, sobre todo en inóculos primarios o bien para obtener cultivos masivos o céspedes bacterianos en medios sólidos en cajas Petri utilizados en las pruebas de sensibilidad a antibióticos o desinfectantes y en las infecciones con bacteriófagos (virus que infectan a las bacterias).^{1,3,4,6}

INOCULACION EN MEDIO SOLIDO EN CAJAS PETRI.

La inoculación de cada uno de los medios de cultivo se lleva a cabo de muchas formas de acuerdo al fin que se persiga; los más utilizados son:^{1,3,5,6,7}

1.-**Método de dilución**, cuyo fin principal es el de tener colonias aisladas y bien definidas de cada microorganismo a partir de unidades formadoras de colonias para observar su morfología colonial (Figura 5.1 y 5.2):

Tamaño, color, forma (redonda, puntiforme, irregular, en ola, rizoide) elevación (plana, concava, convexa, umbonada, crateriforme, elevada), superficie (lisa, rugosa, granular), aspecto (húmeda, seca, deslizante, grasosa), borde (entero, irregular, filamentosos, ramificado, ondulado, lobulado, aserrado), luminosidad (brillante, mate, opaca, translúcida, transparente), consistencia (suave o dura).

Existen varias técnicas que se aplican de acuerdo a la facilidad y destreza que se adquiera con cualquiera de ellas y se describen gráficamente a continuación (Figuras 5.1 y 5.2):

FIGURA 5.1: TECNICAS DE SEMBRADO EN PLACA.

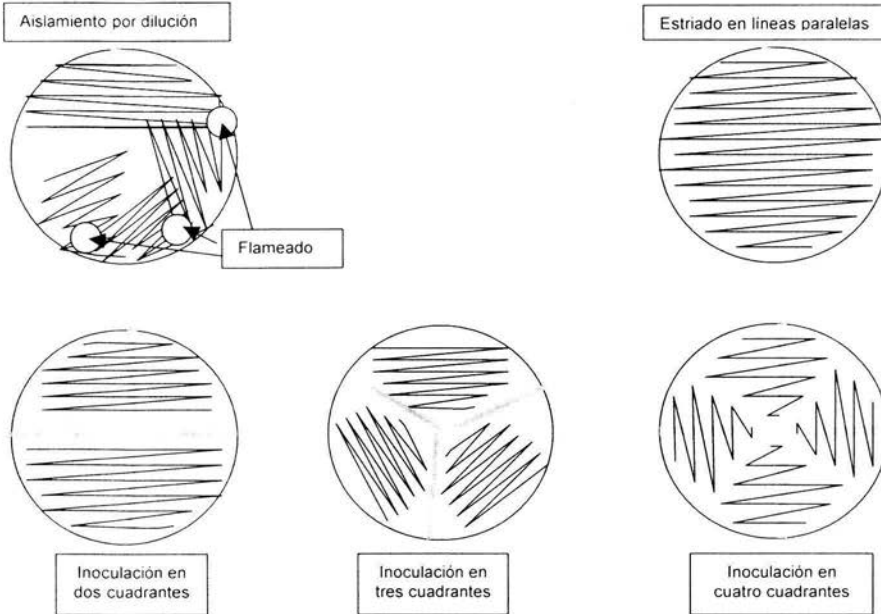
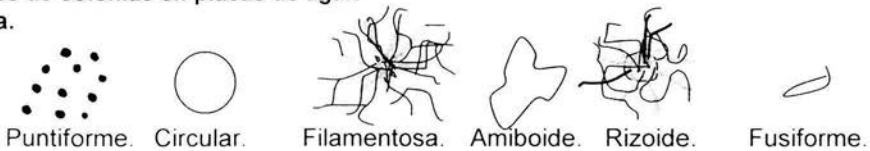


FIGURA 5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS DE BACTERIAS.

a) Tipos de colonias en placas de agar.

Forma.



Elevación.

Plana. Elevada. Convexa. Pulvinada. Umbonada. Cóncava

Borde.

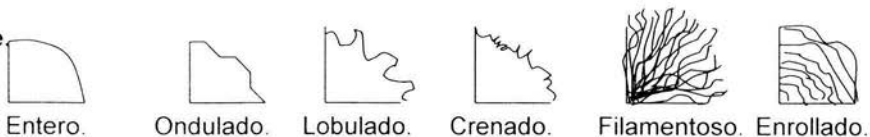
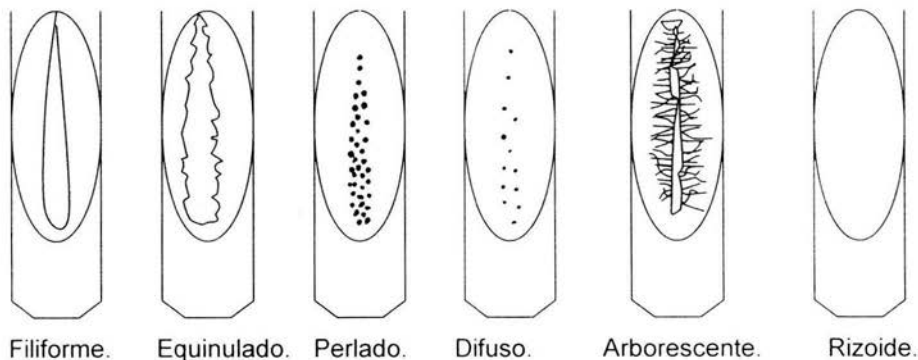
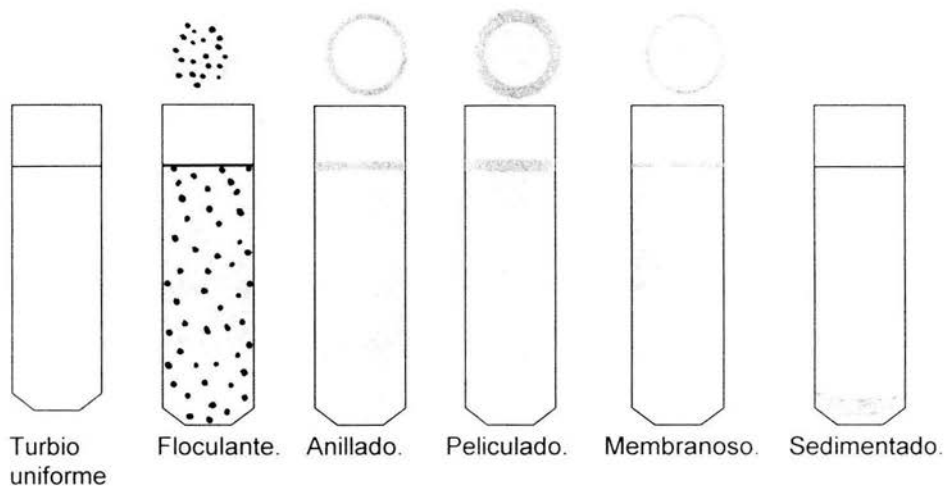


FIGURA 5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS DE BACTERIAS. (continuación)

b) Tipos de crecimiento en agar inclinado.



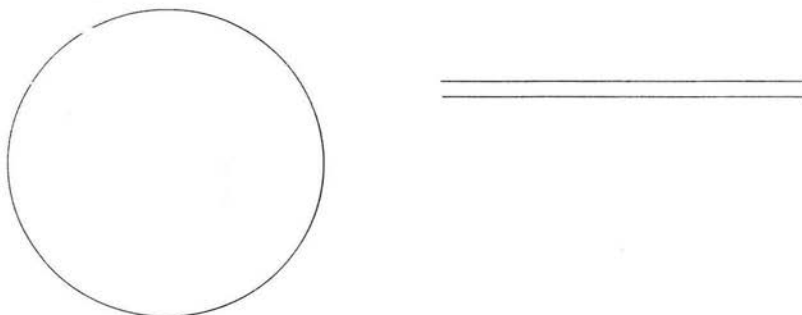
c) Tipos de crecimiento en medios líquidos.



2.-**Método de sembrado masivo**, cuyo fin principal es el obtener cultivos masivos o céspedes bacterianos homogéneos. Estos se logran utilizando preferentemente hisopos impregnados con el microorganismo puro previamente crecido o diluido en medios líquidos o soluciones salinas o amortiguadoras y algunas veces ajustados a cierta turbidez o cantidad de bacterias predeterminada.

Este método consiste en Inocular o deslizar los hisopos alrededor de la orilla de la placa y luego distribuyendo hacia el interior del medio de cultivo haciendo estrías masivas, haciendo girar la placa tres veces. En esta forma de inoculación se obtienen películas que cubren totalmente y de forma homogénea el medio de cultivo (Figura 5.3).

FIGURA 5.3 SEMBRADO MASIVO.



INOCULACION EN MEDIOS SEMISOLIDOS O SOLIDOS EN TUBO.

1.-Inoculación en medios inclinados.

Los cultivos por estriado en una superficie de agar inclinado (Figura 5.4) se realizan para mantener las cepas puras pertenecientes a una colección o cepario que requieren ser conservadas en los medios, temperaturas y tiempos apropiados para cada una de ellas y también se utilizan para inocular medios de cultivo correspondientes a pruebas bioquímicas. Se utiliza un alambre recto para este tipo de inoculación, atravesando el agar con el alambre 2 ó 3 mm del fondo del tubo (Figura 5.1) y las formas de crecimiento que pueden observarse en este tipo de cultivo son: Filiforme, equinulada, perlada, difusa, arborescente o rizoide (Figura 5.2 b).

2.-Inoculación en medios rectos.

Los cultivos en una superficie de agar recto se realizan por picadura con alambre recto para inocular medios de cultivo correspondientes a pruebas bioquímicas (utilización de carbohidratos, aminoácidos, gelatina) y para estudios de la motilidad que presentan algunos microorganismos, esto último se hace en medios semisólidos, observándose desplazamientos característicos que permiten distinguir si pertenecen a un determinado género o especie.

La inoculación para observar la motilidad debe ser rigurosamente estricta ya que el alambre o asa recta debe retirarse siguiendo la misma trayectoria utilizada para atravesar el medio. En los medios en tubo también podemos observar ciertas características de crecimiento en la línea de picadura que pueden servir en la identificación de un microorganismo como: Filiforme, perlada, papilar, vellosa y arborescente.

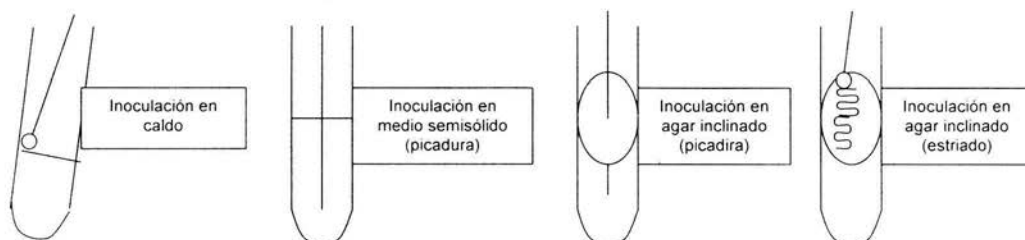
INOCULACION EN MEDIOS LIQUIDOS.

Los cultivos en medios de líquidos se realizan inclinando el tubo (Figura 5.4), inoculando en el menisco del líquido y volviendo a enderezar el tubo; esto se utiliza para inocular medios de cultivo correspondientes a pruebas bioquímicas, para estudios de crecimiento, para procesos de fermentación u obtención de biomasa o metabolitos microbianos.

El crecimiento en estos medios se manifiesta en cualquiera de las siguientes formas (Figura 5.2 c):

- **Turbidez o crecimiento homogéneo:** Opacidad más o menos densa de acuerdo a la especie desarrollada.
- **Formación de velo o película:** Aquella masa de células que flota en la parte superior del cultivo.
- **Sedimento o flóculo:** Depósito celular que permanece en la parte inferior del cultivo.
- **Anillado:** Formación de un anillo en la parte superior del cultivo.

FIGURA 5.4 INOCULACIÓN DE MEDIOS EN TUBO.



OBJETIVOS.

- Conocer los diferentes métodos de sembrado que se emplean en el laboratorio de microbiología, así como su aplicación.
- Observar y reconocer la morfología colonial de diferentes microorganismos a través de sus características en los diferentes medios de cultivo inoculados.

MATERIAL.

Cepas : *Staphylococcus aureus*.

Streptococcus spp.

Enterobacteria Lactosa +

Enterobacteria Lactosa -.

Bacillus spp.

Candida albicans.

Clostridium spp.

Corynebacterium diphtheriae.

Mycobacterium spp. (inactivada con fenol).

Cryptococcus neoformans o *Klebsiella spp.* capsulada.

Medios de cultivo: Agar sales manitol.

Agar sangre.

Agar Mac Conkey.

Agar nutritivo (en placa y en tubos recto e inclinado).

Agar dextrosa Sabouraud.

Medio cooked meat.

Agar sangre adicionado con suero.

Caldo nutritivo en tubo (BHI, CST, etc.).

Otros:

Encendedor o cerillos.

Mechero de Bunsen.

Benzal en solución o hipoclorito de sodio al 0.5%.

Asas bacteriológicas (recta y en anillo).

Microscopio estereoscópico.

MÉTODO.

Esterilización del asa bacteriológica.

Antes de iniciar, desinfectar la mesa de trabajo con benzal en solución o hipoclorito de sodio al 0.5%.

- 1.- Encender el mechero y colocar el asa bacteriológica en la flama del mechero para esterilizarla por flameado, hasta que el metal adquiera un color rojo-naranja.
- 2.- Dejar enfriar el asa dentro de la zona de esterilidad alrededor del mechero.
- 3.- Una vez que el asa ha sido esterilizada y enfriada, puede tomarse el inóculo del microorganismo que será sembrado.

Inoculación de medio sólido en caja de Petri.

El método más difundido y utilizado es el siguiente:

- 1.-Hacer un inóculo primario depositando el material (colonia aislada, inóculo de cultivo líquido, muestra biológica, alimento, agua, etc) en una zona de la placa que ocupe una cuarta parte de la placa con el asa estéril.
- 2.-Empezar a diseminar el inóculo en la placa estriando con movimiento de un lado a otro.
- 3.-Esterilizar nuevamente el asa.
- 4.- Hacer girar la placa al siguiente cuadrante anexo 90°, diseminar el inóculo en la placa estriando con movimiento de un lado a otro, partiendo del extremo de la primera inoculación de tal forma que se tomen microorganismos y que éstos se vayan diluyendo y distribuyendo.
- 5.- Esterilizar nuevamente el asa.
- 6.- Repetir los pasos 3, 4 y 5 hasta completar los cuatro cuadrantes.

<i>Staphylococcus aureus</i>	inocular en agar sales manitol.
<i>Streptococcus spp.</i>	inocular en agar sangre.
Enterobacteria	inocular en agar Mac Conkey.
<i>Bacillus spp.</i>	inocular en agar nutritivo.
<i>Cándida albicans</i>	inocular en agar dextrosa Sabouraud.
<i>Clostridium spp.</i>	inocular en agar cooked meat.
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	inocular en agar sangre-suero.
<i>Cryptococcus neoformans</i> .	inocular en agar dextrosa Sabouraud.
<i>Klebsiella spp.</i>	inocular en agar Mac Conkey o en agar nutritivo.

Inoculación de medio inclinado.

- 1.-Esterilizar el asa recta, enfriar y tomar el inóculo.
- 2.-Inocular el agar profundo por picadura, sin llegar al extremo del tubo. Se recomienda inocular hasta donde empieza la curvatura del tubo.
- 3.-Se continúa sembrando por estría la parte "pico de flauta" o inclinada del agar desde abajo hacia arriba.
- 4.-Esterilizar el asa en el mechero.

Nota: Algunos medios como citrato sólo se siembran por estría en la superficie de pico de flauta.

Inoculación de medio recto.

- 1.-Esterilizar el asa recta, enfriar y tomar el inóculo.
- 2.-Inocular el agar por picadura, sin llegar al extremo del tubo. Se recomienda inocular hasta donde empieza la curvatura del tubo.
- 3.-Esterilizar el asa en el mechero.

Nota: Si se pretende hacer la prueba de motilidad de una bacteria, el alambre de inoculación debe retirarse siguiendo el mismo trayecto utilizado para atravesar el medio.

Inoculación de medio líquido.

- 1.-Esterilizar el asa, enfriar y tomar el inóculo.
- 2.-Inclinar el tubo en ángulo entre 30-40°.
- 3.-Inocular la superficie interior del vidrio, donde se forme un ángulo entre la superficie del caldo y el tubo.
- 4.-Volver el tubo a la posición vertical, el inóculo queda sumergido en el caldo de cultivo.
- 5.-Agitar el tubo para dispersar el microorganismo en el medio de cultivo.
- 6.-Esterilizar el asa en el mechero.

<i>Staphylococcus aureus</i>	inocular en tubos con agar recto e inclinado y caldo.
Enterobacteria	inocular en tubos con agar recto e inclinado y caldo.
<i>Bacillus spp.</i>	inocular en tubos con agar recto e inclinado y caldo.

Incubación.

Guardar los medios inoculados en incubadoras a temperaturas de 35 a 37°C un mínimo de 24 horas para su crecimiento.

OBSERVACIONES Y RESULTADOS.

Describir e ilustrar los crecimientos observados en cada técnica de sembrado.

Describir la morfología colonial de cada microorganismo observado auxiliándose del microscopio estereoscópico.

CONCLUSIONES.

Questionario.

1. Describir brevemente las formas de inoculación en:
 - a) Placa de agar por dilución.
 - b) Medio inclinado en tubo.
 - c) Medio recto en tubo.
 - d) Medio líquido en tubo.
2. Ilustrar las características enunciadas para morfología colonial en medios sólidos en caja Petri.

BIBLIOGRAFIA.

1. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 57-61.
2. Brock, T. D., Madigan, M. T. Microbiología. 6ª edición. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana. México. (1993) Págs. 131-137.
3. Cappuccino, J. G., Sherman, N. Microbiology. A Laboratory Manual. 3ª edición. Benjamin/Cummings. EU. (1992) Págs. 63-69.
4. Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. Microbiological Methods. 7ª edición. Butterworth – Heinemann. Inglaterra. (1995) Págs. 94-101.
5. Johnson, T. R., Case, Ch. L. Laboratory Experiments in Microbiology. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1992) Págs. 63-74.
6. Koneman, E. W., et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1992). Págs. 169-174.
7. Krueger, W. B., Kolodziej, B. J. Laboratory Procedures for General Microbiology. Kendall / Hunt Publishing. EU. (1986) Págs. 48-50.

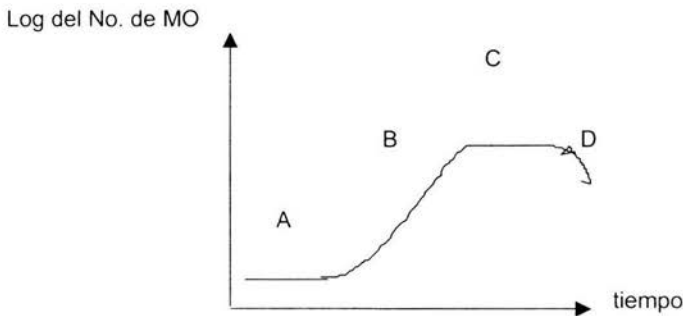
ANEXO 5.1

CURVA DE CRECIMIENTO Y CONTEO CELULAR

El **crecimiento** se define como un aumento ordenado en cada uno de los componentes celulares de un organismo, desde el punto de vista de célula ordinaria. En la mayoría de los microorganismos (MO) el aumento continúa hasta que la célula se divide en dos nuevas células hijas mediante un proceso llamado fisión binaria. Por otra parte el crecimiento microbiano generalmente da por resultado un aumento en el número de células, en un momento dado, del mismo tamaño que la célula original, esta fase es conocida como **crecimiento poblacional**.^{2,4,5}

El **crecimiento poblacional** puede medirse tomando en cuenta dos parámetros: **Número de microorganismos y tiempo**, que al colocarlos en una gráfica podemos encontrar una curva de distribución de la siguiente forma:^{4,5}

FIGURA 5.5 CURVA DE CRECIMIENTO.



En la representación gráfica del crecimiento podemos reconocer cuatro fases importantes del crecimiento:^{2,3,4}

A.-Fase Lag o de retraso. Es la fase de adaptación del MO al medio de cultivo y condiciones nuevas.

B.-Fase exponencial o log (logarítmica). Se presenta un crecimiento exponencial caracterizado por la máxima expresión de funciones celulares características de cada MO, es la consecuencia de la división de una población en la que cada célula forma dos y se da la utilización de los componentes del medio de cultivo y adaptación total al mismo.

C.-Fase estacionaria. Es la fase en que empiezan las limitaciones nutricionales y la acumulación de algún metabolito tóxico, situación que impide el crecimiento.

D.-Fase de muerte. Ocurre un agotamiento total de los nutrientes esenciales y la acumulación de productos inhibidores, lo que da origen a la muerte celular.

CONTEO CELULAR.

El tamaño de la población microbiana puede determinarse contando la cantidad de células individuales con la ayuda de un microscopio, mediante el procedimiento de: **Conteo microscópico directo**. El tamaño tan pequeño de los MO y su gran densidad de población hace necesario el uso de **cámaras especiales** como la de Newbauer, Hausser, Petroff, Bürker, Malassez, Thoma, etc., que facilitan la observación y el conteo.^{1,2,4,5}

En ellas se toman cuatro factores importantes para el conteo total:

- 1.-La superficie de la cámara donde se cuentan las células.
- 2.-La profundidad de la cámara (para contar con el dato tridimensional o volumen).
- 3.-La dilución de la muestra.
- 4.-El número de células observadas y contadas.

Puede hacerse conteo de células viables utilizando colorantes de exclusión vital como el azul tripan que tiñe de azul a las células muertas o dañadas y deja ver refringentes a las vivas porque no penetra en ellas. El mejor conteo de células vivas, es decir aquellas que en una población son capaces de dividirse, puede hacerse por dos métodos tradicionales conocidos como:^{1,2,3,4,5}

1.-Extendido en placa: Consiste en sembrar en una placa una pequeña porción o un volumen conocido de alguna muestra, que se extiende asépticamente sobre la superficie del agar adecuado para su crecimiento y se incuba a la temperatura ideal para la observación y conteo de las colonias, visibles a simple vista. Ejemplos: Urocultivo con volúmenes conocidos de muestra, monitoreo de superficies, exudados de cualquier tipo.

2.-Vaciado en placa: En este método, la muestra en volumen conocido y dilución conocida o serie de diluciones, se mezcla perfectamente con un volumen conocido de agar a 45°C (líquido) en una caja de Petri estéril, se homogeniza y se deja solidificar. Los MO quedan entonces fijos embebidos en el gel del agar y forman colonias visibles.

En ambos métodos al hacer el conteo se parte del postulado de que un MO da origen a una colonia, y que por lo tanto una colonia representa una unidad formadora de colonia (UFC).¹

Referencias.

1. Barker, R. At the Bench. A Laboratory Navigator. Cold Spring harbor Laboratory Press. EU. (1998) Págs. 263, 276.
2. Brock, T. D., Madigan, M. T. Microbiología. 6ª edición. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana. México. (1993) Págs. 327-336.
3. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. Microbiología. 4ª.edición. Mc Graw-Hill. España (1999) págs. 114-121
4. Rickwood, D. y Hames B. D. Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Vol. I Editado por T. A. Brown. Inglaterra. (1991). Págs. 18-22.
5. Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. Microbiología. Ediciones REPLA. México. (1986) págs. 262-278.

CAPÍTULO No. 6

TECNICAS DE TINCIÓN

INTRODUCCION

Los componentes de la mayoría de las células, no impiden el paso de los rayos de luz por lo que casi todas las células no tratadas son casi invisibles al microscopio óptico. La forma de hacerlas visibles consiste en teñirlas con colorantes selectivos.^{3,5,7}

Los colorantes más comúnmente usados son sales, los cuales pueden ser básicos o ácidos; los colorantes básicos consisten en un catión colorido unido a un anión incoloro (ejemplo: cloruro de azul de metileno), mientras que los ácidos constituyen exactamente lo contrario (ejemplo: eosinato de sodio). Las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos, los cuales portan cargas negativas en forma de grupos fosfato, éstos se combinan con los colorantes básicos. Los colorantes ácidos no tiñen células bacterianas, por lo tanto, pueden ser usados como colorantes de contraste (Cuadro 6.1).⁶

En el siglo pasado surgieron una gran variedad de colorantes textiles que después fueron utilizados para la tinción de algunos tejidos y células con buenos resultados, mostrando preferencia por algunos componentes celulares, como por ejemplo el colorante hematoxilina que presenta afinidad específica por moléculas de carga negativa y por esto revela la distribución de ácidos nucleicos; sin embargo, de muchos colorantes se desconoce la base química de su especificidad.^{1,3,5,8,11}

Actualmente se cuenta con una variedad de colorantes orgánicos para teñir y además de reactivos para hacer evidentes algunas estructuras tales como: enzimas que reaccionan con su sustrato, agentes redox que captan o ceden electrones y cambian o adquieren un color característico y anticuerpos conjugados a enzimas o a fluorocromos. La mayoría de las células a teñir deben fijarse antes de teñirse, este paso previo permeabiliza las células a los colorantes, estableciendo puentes cruzados entre sus macromoléculas, de modo que éstas quedan estabilizadas y bloqueadas en su posición original. Los métodos utilizados para la **fijación** pueden ser: inmersión en ácidos o solventes orgánicos como metanol, etanol o acetona; exposición a formaldehído o glutaraldehído y fijación a calor directo, ésta última es la más utilizada para bacterias.^{1,2,3,5,6,8,11}

La mayoría de los colorantes utilizados en microbiología son derivados de la anilina, están compuestos por uno o más anillos bencénicos unidos por enlaces químicos bien definidos, asociados

con la producción de color (cromóforos). Algunos de estos grupos son: C=C, C=O, C=N, C=S, N=N, N=O, y NO₂. La intensidad de la coloración de un colorante es proporcional al número de radicales cromóforos del compuesto. Aparte de diferenciar y hacer visibles los constituyentes de una célula, la tinción ayuda a identificar los microorganismos y a clasificarlos en un grupo ya definido debido a su comportamiento frente a determinados colorantes como por ejemplo Gram (+), Gram (-), Bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), etc. ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12}

CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES.

Los colorantes se clasifican en naturales y sintéticos:

Naturales: Son generalmente de utilización histológica como la hematoxilina, que proviene de la corteza de un árbol o de la cochinilla, además de orceína y tornasol extraído de líquenes.

Sintéticos: Aquellos que tienen como origen a la anilina, a su vez derivado del benceno.

Otra clasificación se basa en su naturaleza molecular catiónica o aniónica. Los más utilizados son sales compuestas de una base y un ácido, la base consiste en un catión con carga positiva y el ácido consiste en un anión con carga negativa (Cuadro 6.1). En resumen los colorantes se designan como:

Ácidos: Aquellos donde la sustancia colorida está contenida en el radical ácido y el componente básico es incoloro.

Básicos: Aquellos en los cuales la sustancia colorida está contenida en el radical básico y el componente ácido es incoloro.

Neutros: Están constituidos por la mezcla simultánea de soluciones acuosas de determinados colorantes ácidos y básicos.

Desde el punto de vista práctico los colorantes básicos tiñen estructuras de naturaleza ácida como el material genético de las células (cromatina nuclear y/o DNA bacteriano) y los polisacáridos ácidos, mientras que los colorantes ácidos reaccionan con sustancias básicas tales como las estructuras citoplasmáticas. Pueden emplearse combinaciones de colorantes ácidos y básicos para teñir diferentes estructuras de una célula y diferenciarlas por el color adquirido como la tinción hematoxilina (básica) y eosina (ácida). ^{2,3,4,5,6,8,10,11,12}

CUADRO 6.1 CLASIFICACIÓN DE ALGUNOS COLORANTES

Colorantes ácidos	Colorantes básicos	Colorantes neutros
ácido picrico	azul de metileno	Giemsa
nigrosina	fucsina básica	Wright
verde de malaquita	crystal violeta	Leishman
fucsina ácida	Safranina	
floxina	Hematoxilina	
eosinato de sodio	violeta de metileno	
	Auramina	
	rojo neutro	

Consideraciones en la preparación de los colorantes para tener la calidad tintorial deseada:

- Seguir cuidadosamente la técnica de preparación del colorante.
- Lograr el pH del amortiguador en el que se prepara el mismo.
- Seguir las instrucciones del tiempo y condiciones de almacenamiento.
- Utilizar testigos de características tintoriales conocidas para cada nuevo lote de colorantes para asegurar la intensidad y tonalidad apropiada.

TIPOS DE TINCIONES.

Algunos tipos de tinciones y términos utilizados en las tinciones son:

Tinción directa o simple: El microorganismo o tejido se tiñe por inmersión en el colorante.

Tinción indirecta: El microorganismo o tejido se tiñe sólo con la ayuda de un mordiente.

Mordiente: Sustancia que favorece la unión entre el cuerpo a teñir y el colorante.

Coloración vital: Es aquella capaz de teñir células muertas para distinguir las vivas sin matarlas.

Tinción negativa: Es aquella en la que el microorganismo permanece sin teñir pero se colorea el fondo, de manera que las células quedan dibujadas. La sustancia empleada para la tinción negativa es opaca, carece de afinidad por los constituyentes celulares y únicamente rodea a la célula. Un ejemplo de colorante utilizado es la tinta china, que es una suspensión de partículas de carbón coloidal y nigrosina.

Tinción metacromática: El microorganismo o parte de él se tiñe de un color diferente al que posee el colorante.

Reforzadores: Sustancias que aumentan en forma considerable el poder de tinción y la selectividad de un colorante.

Impregnación: Precipitación de una solución de sales metálicas sobre la superficie de un microorganismo o sobre estructuras bien definidas.

Colorante de contraste: Es aquel que tiñe el cuerpo celular, menos las estructuras específicas que se tiñen previamente con otro colorante diferente.

Tinciones selectivas: Son aquellas que ponen de manifiesto diferentes estructuras celulares y requieren también de colorantes selectivos.

Tinciones diferenciales: Son las que logran que unas células se tiñan con un colorante en tanto que otras células se tiñen con otro colorante, de tal modo que se distinguen unas de otras en una mezcla de células.

OBJETIVOS.

- Determinar la capacidad de los colorantes para teñir a los microorganismos y establecerse como una herramienta, ya que facilita el reconocimiento de su morfología, diferencias en su capacidad tintorial y la presencia de algunas estructuras propias.
- Conocer los diferentes métodos de tinción empleados en el laboratorio de Microbiología, así como su fundamento.

MATERIAL.

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas: *Staphylococcus aureus*.

Streptococcus spp.

Enterobacteria.

Bacillus spp.

Candida albicans.

Clostridium spp.

Corynebacterium diphtheriae.

Mycobacterium spp. (inactivada con fenol)

Cryptococcus neoformans o *Klebsiella spp.*, capsulada.

REACTIVOS Y COLORANTES

Frascos goteros con:

- Cristal violeta.
- Solución de lugol.
- Solución de alcohol-acetona.
- Safranina.
- Verde de malaquita.
- Azul de metileno.
- Fucsina fenicada.

Metanol.

Alcohol ácido.

Otros :

Encendedor o cerillos.

Portaobjetos.

Cubreobjetos.

Mechero de Bunsen.

Microscopio óptico.

Benzal en solución o hipoclorito de sodio al 0.5%.

Etanol al 70%

Gasas estériles.

Cajas de Petri.

MÉTODO.

ELABORACIÓN DE FROTIS. ⁸

Antes de iniciar, desinfectar la mesa de trabajo con benzal en solución o hipoclorito de sodio al 0.5%.

1. A partir de cultivos de medios sólidos:

- a) Limpiar y desengrasar los portaobjetos (se recomienda el uso de etanol o acetona).
- b) Esterilizar por flameado el asa bacteriológica, y enfriarla en la zona estéril.
- c) Colocar con el asa una gota de agua estéril sobre el portaobjetos.
- d) Tomar con el asa estéril una porción de la colonia y hacer una suspensión homogénea en la gota de agua, extendiéndola para formar una película muy delgada.
- e) Esterilizar el asa en la flama del mechero.
- f) Fijar el frotis al calor, para lo cual se pasa el portaobjetos por encima de la flama del mechero unas tres o cuatro veces seguidas sin sobrecalentar. (Se recomienda utilizar pinzas).

2. A partir de cultivos de medios líquidos:

- a) Limpiar y desengrasar los portaobjetos (se recomienda el uso de etanol o acetona).
- b) Esterilizar por flameado el asa bacteriológica, y enfriarla en la zona estéril.
- c) Colocar una asada del cultivo sobre el portaobjetos.
- d) Extenderla para formar una película delgada.
- e) Esterilizar el asa en la flama del mechero.
- f) Fijar el frotis al calor, para lo cual se pasa el portaobjetos por encima de la flama del mechero unas tres o cuatro veces seguidas sin sobrecalentar. (Se recomienda utilizar pinzas).

TINCIONES. ^{2,4,5,6,7,8,9,10}

1. Tinción diferencial de Gram.

- a) Preparar un frotis de cada una de las siguientes bacterias : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, enterobacteria, *Bacillus spp.*, *Candida albicans*.
- b) Cubrir los frotis con cristal violeta y dejarlo actuar por 1 minuto.
- c) Escurrir el colorante y lavar al chorro suave de agua corriente.
- d) Cubrir los frotis con lugol y dejarlo actuar por 1 minuto.
- e) Decantar.
- f) Decolorar con alcohol-acetona (3-4 segundos).
- g) Lavar con agua corriente.
- h) Cubrir los frotis con safranina y dejarlo actuar por 1 minuto.
- i) Escurrir y lavar con agua corriente.
- j) Secar al aire.
- k) Observar las preparaciones al microscopio (10X, 45X y 100X con aceite de inmersión. Consultar ANEXO "MICROSCOPIO").

Las bacterias Gram (+) se tiñen de color azul y las bacterias Gram (-) se tiñen de color rosa.

2. Tinción de Shaeffer y Fulton para esporas.

- a) Preparar un frotis de *Bacillus spp.* y *Clostridium spp.*
- b) Sumergir el frotis en verde de malaquita dentro de una caja de Petri.
- c) Calentar la preparación hasta la emisión de vapores durante 5 minutos.
El colorante no debe hervir ni secarse.
- d) Lavar la preparación con agua corriente.
- e) Cubrir el frotis con safranina y dejarlo actuar por 1 minuto.
- f) Escurrir y lavar con agua corriente.
- g) Secar al aire

h) Observar las preparaciones al microscopio (10X, 45X y 100X con aceite de inmersión. Consultar ANEXO 6.1 "MICROSCOPIO").

Las esporas se observan de color verde y el cuerpo de las bacterias de color rosa.

También puede usarse la tinción de Gram para observar las esporas, el citoplasma se observa color violeta y la espora no se tiñe.

3. Tinción de Loeffler para gránulos metacromáticos.

- a) Preparar un frotis de *Corynebacterium diphtheriae*.
- b) Cubrir el frotis con azul de metileno durante 3 minutos.
- c) Escurrir el colorante y lavar al chorro suave de agua corriente.
- d) Cubrir los frotis con lugol y dejarlo actuar por 1 minuto.
- e) Escurrir y lavar con agua corriente.
- f) Secar al aire
- g) Observar las preparaciones al microscopio (10X, 45X y 100X con aceite de inmersión. Consultar ANEXO 6.1 "MICROSCOPIO").

Los gránulos se observan de color azul marino y el citoplasma bacteriano color verde.

4. Tinción negativa para cápsula.

- a) Colocar una gota de tinta china en un portaobjetos limpio y sobre todo desengrasado.
- b) Agregar un inóculo de una suspensión del microorganismo (*Cryptococcus neoformans* o *Klebsiella spp.* capsulada) a la gota de tinta china.
- c) Mezclar el inóculo con la tinta china y colocar un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.
- d) Presionar el cubreobjetos con papel absorbente.
- e) Observar las preparaciones al microscopio (10X, 45X y 100X con aceite de inmersión. Consultar ANEXO 6.1 "MICROSCOPIO").

Las cápsulas se observan como un halo claro sobre un fondo oscuro.

5. Tinción de Ziehl Neelsen para Micobacterias.

- a) Preparar un frotis de *Mycobacterium spp.* (inactivada con fenol).
- b) Secar y fijar con metanol durante 2 minutos.
- c) Sumergir el frotis en fucsina fenicada dentro de una caja de Petri, o colocar sobre el portaobjetos un papel filtro impregnado con el colorante.

d) Calentar la preparación hasta la emisión de vapores durante 10 minutos.

El colorante no debe hervir ni secarse.

e) Lavar la preparación con agua de la llave.

f) Decolorar con alcohol - ácido hasta que no se desprenda más colorante.

g) Lavar con agua de la llave.

h) Cubrir el frotis con azul de metileno y dejarlo actuar por 2 ó 3 minutos.

i) Escurrir y lavar con agua corriente.

j) Secar al aire.

k) Observar las preparaciones al microscopio (10X, 45X y 100X con aceite de inmersión. Consultar ANEXO 6.1 "MICROSCOPIO").

Nota: Tener cuidado con el carbol-fucsina ya que está preparado con base en alcohol y es inflamable.

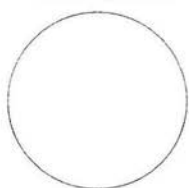
Los bacilos ácido - alcohol resistentes se tiñen de color rojo y los que no lo son, de color azul.

OBSERVACIONES Y RESULTADOS.

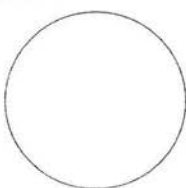
Dibujar a colores las diferentes estructuras observadas.

Describir en los dibujos la morfología observada en cada una de las coloraciones.

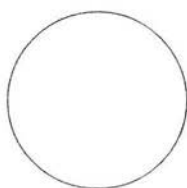
1.a *S. aureus*



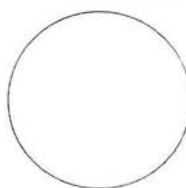
1b. *Streptococcus spp.*



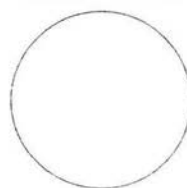
1.c *Enterobacteria*



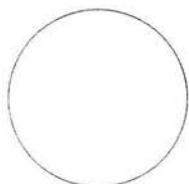
1.d *Bacillus spp.*



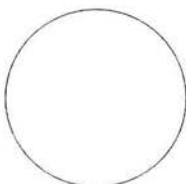
1.e *C. albicans*



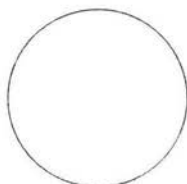
2.a *Bacillus spp.*



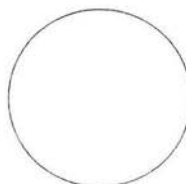
2.b *Clostridium spp.*



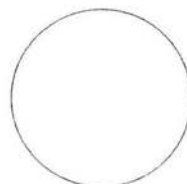
3.a *C. diphtheriae*



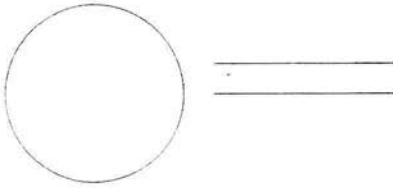
4.a *C. neoformans*



4.b *Klebsiella spp.*



5. *Mycobacterium spp*



ANALISIS DE RESULTADOS.

CONCLUSIONES.

Cuestionario.

- a) ¿Para qué sirven las tinciones en Microbiología?
- b) ¿Cómo elabora un frotis de bacterias?
- c) ¿Cuál es la tinción más empleada para teñir bacterias y cómo se realiza?
- d) Describa los fundamentos de cada una de las tinciones utilizadas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Albert, B., Bry, D., Lewis, J., y Watson, J. D. *Biología Molecular de la Célula*. 23ª edición. Editorial Omega. España (1990) Págs. 149-154.
2. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. *Manual Básico de Bacteriología*. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 113-124.
3. Brock, T. D., Madigan, M. T. *Microbiología*. 6ª edición. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana. México. (1993) Págs. 42-93.
4. Backer, F. J. *Manual de Técnica Bacteriológica*. 2ª edición. México. (1981) Págs. 23-57.
5. Cappuccino, J. G., Sherman, N. *Microbiology. A Laboratory Manual*. 3ª edición. Benjamin/Cummings. EU. (1992) Págs. 19-50.
6. Jawets, E., Melnick, J. L. *Microbiología Médica*. 13ª edición. *El Manual Moderno*. México. (1990). Págs. 28, 29.
7. Johnson, T. R., Case, Ch. L. *Laboratory Experiments in Microbiology*. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1992) Págs. 21-51.
8. Koneman, E. W., et al. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. México. (1992). Págs. 130, 156, 159,160, 163, 627, 628, 641.
9. Krueger, W. B., Kolodziej, B. J. *Laboratory Procedures for General Microbiology*. Kendall / Hunt Publishing. EU. (1986) Págs. 25-45.
10. Lansing, M. P. *Microbiología*. 4ª edición. Mc Graw-Hill. España. 2000. Págs 25-29.
11. Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud*. Serie Paltex. OPS – OMS. Colombia (1983) Págs. 231-256.
12. Stanier, R. Y., Ingraham, J. L. *Microbiología*. Reverte. España. (1996). Págs. 155-157.

ANEXO 6.1

MICROSCOPIO

USO Y CUIDADOS.

Dentro del laboratorio existen varios tipos de equipo, material, reactivos y algunos otros instrumentos entre los que podemos encontrar al **microscopio** que es indispensable dentro de un laboratorio de Microbiología; el cuidado y uso correctos del microscopio son esenciales para lograr su mejor rendimiento. La función del microscopio es hacer más visibles las cosas demasiado pequeñas para que puedan ser vistas a simple vista, lo cual se logra por medio de un sistema de lentes de aumento y poder de resolución suficientes para que los pequeños elementos muy próximos en la muestra examinada se vean separados de tal modo que se obtenga una imagen claramente definida, con una iluminación adecuada.^{2,3,5}

Una cualidad del microscopio es su **poder de resolución**, o sea su capacidad para mostrar como distintos y separados dos puntos que se encuentran cercanos. A mayor poder de resolución mayor es la definición de un objeto. Sin embargo, el microscopio con su conjunto de lentes, aberturas y tornillos puede parecer complicado y lo que se pretende aquí es que el manejo y la utilización de este aparato tan indispensable en el laboratorio sea de lo más fácil. El uso del microscopio es sencillo en la mayoría de sus aplicaciones, para observar con el microscopio en ocasiones es necesario preparar la muestra a observar, sin embargo, los microorganismos pueden ser examinados en un estado viviente y sin teñir o después de la aplicación de colorante para que resalten con mayor claridad.^{1,2,3,5,6}

No solamente vale la pena y es satisfactorio observar las células por sí mismas, si no que la observación con el microscopio pueda proporcionar información cuantitativa, especialmente cuando se utilizan técnicas tan importantes como las de conteo celular y microscopía de fluorescencia. Las partes del microscopio consisten en varios componentes donde cada uno tiene una función que es indispensable; dichas partes se clasifican en tres sistemas: el de iluminación, el óptico y el mecánico (Figura 6.1).^{1,2,3,5,6}

SISTEMA DE ILUMINACIÓN.

El sistema de iluminación está formado por la fuente de luz y el diafragma de campo.

Fuente de luz, puede ser un espejo que es por lo general doble, plano por un lado y cóncavo por el otro. Si se utiliza la luz natural como fuente de iluminación no importa cuál espejo se use; cuando se usa una fuente pequeña de luz artificial se debe usar el espejo cóncavo. Con iluminación artificial, el espejo plano se usará con objetivos débiles y el cóncavo con los de mayor aumento. Existen fuentes de luz integradas en lugar del espejo y su intensidad puede ser regulable, estas fuentes integradas actualmente son de uso común.

Diafragma de campo, situado debajo de la platina, sirve para regular el diámetro de la emisión de luz, abriéndose o cerrándose a fin de que se ilumine sólo el área del campo visual y lograr una imagen más definida del objeto. Al salir la luz del diafragma de campo continúa su camino a través de uno o varios filtros para seleccionar la longitud de onda emitida (p. Ej., filtro azul para campo claro y filtro verde para contraste de fases).

SISTEMA OPTICO.

Al sistema óptico lo conforman la lente ocular, los objetivos (seco débil, seco fuerte y de inmersión) y el condensador.

Lente ocular: los hay de diferentes aumentos (5X ó 10X), usando primero el de menos potencia, la superficie exterior tanto de los oculares como de los objetivos se deben limpiar cuidadosamente con papel seda antes de usarse.

Lentes objetivos: Son componentes esenciales para obtener el aumento inicial del objeto y son tres las clases de lentes objetivos generalmente usados:

a) **Objetivo seco débil (10X)**, con este objetivo se abarca un campo mayor en el que el objeto se encuentra más fácilmente.

b) **Objetivo seco fuerte (40X o 60X)**, con este objetivo se obtiene un mayor aumento y se pueden estudiar detalles de la estructura.

c) **Objetivo de inmersión (100X)**, con este objetivo se obtiene una imagen más definida al emplearse aceite de inmersión para evitar la dispersión de la luz en el aire.

Los objetivos se ajustan de tal modo que sean parafocales, es decir fijos al revólver portaobjetivos de manera que cuando se colocan en posición quedan más o menos enfocados y sólo se requiere un fino ajuste.

Condensador, Situado más abajo del diafragma. Con objetivos de mayor aumento que 10X, el espejo de iluminación no basta para dar un cono de luz con el ángulo adecuado para llenar la abertura del objetivo. Esto se logra colocando una lente o sistema apropiado de lentes entre la fuente de luz y la lámina, a estas lentes se les llama condensadores. El condensador es capaz de agrupar los rayos de luz que inciden sobre él y los dirige hacia el plano focal del objetivo. El condensador posee un **diafragma de iris**, el cual permite contrastar la imagen, mejorando la nitidez de la preparación (resolución de detalle).

SISTEMA MECÁNICO.

El sistema mecánico consiste básicamente de un revólver portaobjetivos, un tornillo macrométrico, un tornillo micrométrico y una platina

Revólver portaobjetivos: esta pieza consiste en una estructura giratoria, en la cual van montados dos o más objetivos y facilita su intercambio.

Tornillo de movimiento rápido (macrométrico), este botón se hace girar hasta que la imagen aparece y se utiliza para poner el objeto a la vista.

Tornillo de movimiento lento (micrométrico), este botón se hace girar hasta que la imagen sea clara y queda bien definida, se utiliza para obtener un ajuste más preciso, enfoca los diferentes planos y profundidades del objeto.

Platina, en ésta se coloca la laminilla o el objeto a ser examinado, fijándolo con el sujeta objetos.

FIGURA 6.1 PARTES DEL MICROSCOPIO.

El microscopio compuesto

El microscopio compuesto está formado por tres sistemas:

- 1) sistema de iluminación
- 2) sistema óptico
- 3) sistema mecánico

1. SISTEMA DE ILUMINACION

Lámpara
Diafragma de campo

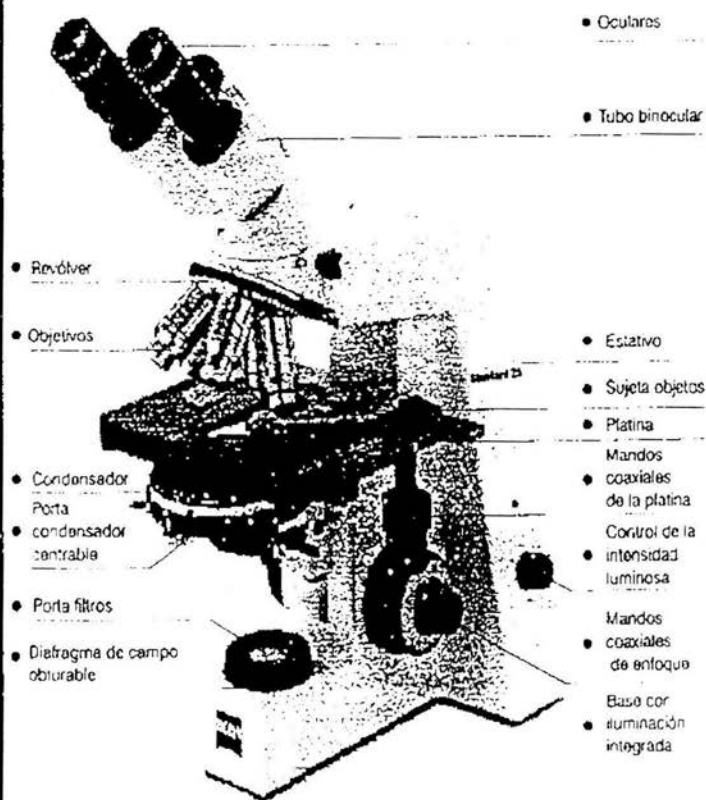
2. SISTEMA OPTICO

Condensador:
Lente frontal
Diafragma de iris
Lente auxiliar

Objetivo
Tubo (Monocular, binocular, tri-ocular)
Ocular

3. SISTEMA MECANICO

Base
Estativo
Micro-macro (enfoque)
Porta-Condensador
Platina
Revólver-porta objetivos

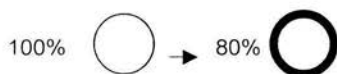


USO DEL MICROSCOPIO.

El uso del microscopio incluye una serie de pasos para obtener un resultado satisfactorio:

1.-Encender la fuente de luz. La luz difusa del día es la mejor fuente de iluminación cuando se cuenta con un espejo, si bien se dispone de muchas formas de lámparas para microscopio, se debe hacer un ajuste preliminar de la iluminación; la mejor iluminación sólo se puede lograr después de haber enfocado un objeto y empleando la **Técnica de iluminación según Köhler** para tener el campo visual uniformemente iluminado, regulando la marcha de los rayos de luz. Esta técnica se realiza de la siguiente forma:

- a) La fuente de luz se ajusta a bajo voltaje (luz amarilla).
- b) Abrir diafragmas (de campo y de iris).
- c) Subir el condensador.
- d) Seleccionar el objetivo de 10x.
- e) Enfocar una preparación con el mando macrométrico y micrométrico, usando únicamente el ojo derecho.
- f) Enfocar con el ojo izquierdo girando el porta ocular hasta ver la imagen nítida.
- g) Ajustar la distancia interpupilar (distancia entre los dos ojos).
- h) Cerrar el diafragma de campo.
- i) Descender ligeramente el condensador hasta ver nítido el borde del diafragma de campo.
- j) De ser necesario, centrar el condensador mediante sus dos tornillos laterales y abrir el diafragma de campo. seleccionar el filtro azul e intensificar ligeramente la luz.
- k) Contrastar la imagen con el diafragma de iris del condensador. Un buen ajuste se logra con un 80% de la abertura del diafragma de campo, visible dentro del tubo quitando un ocular.



- l) A cada cambio de objetivo enfocar con el micrométrico y contrastar con el diafragma de iris.

2.-Colocar la laminilla con el objeto a observar sobre la platina, fijarla con el sujetaobjetos y moverla con los mandos coaxiales de la platina hasta colocar el objeto tan cerca como sea posible del centro de la abertura de la platina. (Figura 6.1)

3.-El enfoque en un microscopio consiste en ajustar la relación entre el sistema óptico y el objeto, de tal modo que se obtenga una imagen clara; es conveniente mientras se está atento a que la imagen aparezca, mover el objeto lentamente en diferentes direcciones para que las sombras que se mueven

a través del campo nos indiquen cuando el objetivo está próximo al punto focal. Al mover el objeto a la izquierda se notará el movimiento aparente hacia la derecha del campo, debido a que la imagen ocular es invertida.

a) El enfoque con un objetivo de bajo poder (5X o 10X) se logra al descender el condensador completamente, descender el objetivo hasta que se encuentre inmediatamente arriba de la preparación, subir poco a poco el objetivo con el tornillo macrométrico hasta observar una imagen clara y enseguida terminar de enfocar con el tornillo micrométrico; si la iluminación es insuficiente, subir el condensador ligeramente y ajustar la abertura del diafragma.

b) El enfoque con un objetivo de gran poder (40X) se obtiene al bajar el condensador hasta la mitad de la distancia que recorre, descender el objetivo hasta que esté inmediatamente arriba de la preparación, elevar el objetivo lentamente con el tornillo macrométrico hasta observar una imagen más o menos clara, continuar enfocando con el tornillo micrométrico y si es necesaria más iluminación, subir el condensador y ajustar el diafragma. Otra forma consiste en obtener un enfoque inicial con el objetivo de menor poder y cambiar al objetivo de mayor poder, continuando con el ajuste de la imagen y de la luz.

c) El enfoque con el objetivo de inmersión en aceite (100X) se logra al aplicar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación, se eleva el condensador hasta donde pueda llegar y se abre completamente el diafragma, se baja el objetivo por medio del tornillo macrométrico hasta que se ponga en contacto con el aceite y acercarlo lo más posible sin presionar la preparación, elevar el objetivo con el tornillo micrométrico hasta obtener una imagen clara.

El **cuidado del microscopio** es importante, con su buen uso y mantenimiento se pueden obtener mejores resultados y lograr el mayor rendimiento, por esto se presentan algunas indicaciones importantes: ^{1,2,3,6}

- 1.- Conservarlo libre de polvo; cuando el microscopio no se usa se debe guardar en su caja o cubrir con una funda, en caso de presencia de polvo se debe eliminar el polvo que se haya acumulado con un cepillo y limpiar cuidadosamente con una gamuza. ^{1,2,3,6}
- 2.- Cuando el microscopio se traslada de un lado a otro, se debe sujetar con una mano por el brazo o pilar de soporte y con la otra mano por el pie o base.
- 3.- Evitar los choques bruscos y vibraciones.
- 4.- Después de cada uso limpiar los objetivos con papel seda, así como los restos de aceite de inmersión en el objetivo de 100X.

- 5.- Evitar el uso de xilol o etanol en las lentes porque pueden desajustarse; el xilol se usará en las lentes de inmersión sólo cuando estén cubiertas con una gruesa capa de aceite de inmersión que impida la visión.
- 6.- Periódicamente se debe solicitar la revisión del microscopio y el correspondiente mantenimiento preventivo por un experto.

El microscopio compuesto ha sido de importancia crucial para el desarrollo de la Microbiología y sigue siendo una herramienta básica en la investigación, existen cuatro tipos de microscopios compuestos: ^{1,2,3,4,5,6}

- Microscopio de campo claro.
- Microscopio de contraste de fase.
- Microscopio de campo oscuro.
- Microscopio de epifluorescencia.

Cada uno de estos microscopios sirve y tiene características diferentes de acuerdo a los requerimientos del laboratorio. Un desarrollo técnico más reciente ha sido el microscopio electrónico de barrido y de transmisión que produce un efecto en 3 dimensiones, en este caso el material que se va estudiar se cubre con una película de metal pesado, como el oro. ⁵

Referencias.

1. Albert, B., Bry, D., Lewis, J., y Watson, J. D. *Biología Molecular de la Célula*. 23ª edición. Editorial Omega. España (1990) Págs. 154-168.
2. Brock, T. D., Smith D. W. *Microbiología*. 4a. Edición. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana. México. (1993) Págs. 16-18, 867-873.
3. Bryan, A. H., Bryan, Ch. A. *Bacteriología. Principios y Prácticas*. 6a. Edición. Compañía Editorial Continental. México. (1976) Págs. 75-79.
4. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. *Microbiología*. 4ª.edición. Mc Graw-Hill. España (1999) págs. 17-25
5. Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud*. Serie Paltext. OPS – OMS. Colombia (1983) Págs. 13-26.
6. Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. *Microbiología*. Ediciones REPLA. México. (1986) págs. 49-52.

CAPÍTULO No. 7

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos, en este caso las bacterias, deben ser aislados e identificados por algunas razones tales como: la determinación de patógenos responsables de enfermedades infecciosas, la selección y aislamiento de cepas de microorganismos necesarios para la producción industrial de alimentos, bebidas, antibióticos, proteínas recombinantes, etc., y la comparación de actividades bioquímicas para propósitos taxonómicos. Como todo ser vivo, las especies de bacterias tienen sus propias **características bioquímicas**, las cuales son controladas principalmente por la actividad enzimática celular, que a su vez es responsable de la bioenergética, la biosíntesis y la biodegradación, es decir, del **metabolismo bacteriano**.^{3,4,5,6,7}

El **metabolismo bacteriano** ocurre dentro y fuera de la célula por medio de enzimas intracelulares (**endoenzimas**) y enzimas extracelulares (**exoenzimas**), respectivamente. Las **exoenzimas** son principalmente enzimas hidrolíticas que reducen los compuestos de alto peso molecular a sus unidades estructurales por introducción de agua a la molécula (hidrólisis de almidón, lípidos, caseína y gelatina). Las **endoenzimas** son las responsables de las síntesis de nuevos compuestos protoplásmicos y la producción de energía celular a partir de los compuestos asimilados; como resultado de estos procesos, algunos productos se excretan por la célula al medio ambiente, de aquí que puedan ser detectados mediante pruebas específicas que servirán para identificar, separar y clasificar a las bacterias (fermentación de carbohidratos, reducción de nitrato, presencia de: catalasa, ureasa, y oxidasa; indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, utilización de citrato, triple azúcar hierro, entre otras).^{1,3,4,5,6,7}

MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS

Actualmente el microbiólogo debe proporcionar la mayor información posible sobre cualquier identificación de bacterias, para lo cual se emplean numerosas pruebas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de éstas y con los resultados obtenidos se puede realizar la identificación final de especies de importancia según el área de interés. La identificación preliminar de una bacteria se puede realizar observando su morfología en la tinción de Gram y las características de las colonias. Sin embargo, la caracterización final de una bacteria se logra mediante la detección de ciertos sistemas enzimáticos exclusivos de cada especie y sirven como marcadores de identificación. Dichos sistemas enzimáticos se detectan en el laboratorio inoculando una pequeña porción de una

colonia bien aislada en una serie de medios de cultivo que contienen sustratos específicos e indicadores químicos, detectándose cambios de pH o la presencia de subproductos específicos; el microbiólogo debe seleccionar el conjunto de pruebas mínimas para obtener la identificación de un grupo de bacterias.^{1,2,3,4,5,6,7}

Las **pruebas bioquímicas** se pueden clasificar en tres grupos: **primarias**, **secundarias** y **especiales**. Las **pruebas bioquímicas primarias**, son aquellas realizadas directamente a partir de colonias aisladas en placas de cultivos primarios y comprenden principalmente, la tinción de Gram, la motilidad en gota suspendida, las pruebas de catalasa, oxidasa y oxidación-fermentación (O-F). Las **pruebas bioquímicas secundarias** son aquellas que se realizan a partir de cultivos jóvenes puros producto de un aislamiento posterior al cultivo primario y detectan productos del metabolismo de carbohidratos, proteínas o aminoácidos, así como la presencia de enzimas y sustratos de un grupo de bacterias para poder llegar a una identificación de género y especie. Por último, las **pruebas especiales** son aquellas que son específicas de un género de bacterias o bien de una especie, tales como, la hidrólisis de hipurato, coagulasa, CAMP, sensibilidades a la bacitracina y a la optoquina, entre otras. Para la identificación de microorganismos es necesario contar con cultivos puros y jóvenes asegurando que únicamente un tipo de organismo está presente, obtenidos en un medio de cultivo nutritivo (AST, agar chocolate, agar Muller Hinton) y realizando tinciones como la de Gram para revelar al microscopio el tipo y la morfología de la bacteria y en un momento dado si existe una mezcla de microorganismos diferentes. El empleo de cultivos tomados de medios selectivos puede conducirnos a la obtención de bacterias cuyo crecimiento ha sido suprimido, por lo que no se deben emplear para realizar pruebas bioquímicas.^{1,5,7}

Actualmente existen **tres métodos para la identificación** de bacterias: **el tradicional**, **el de estuches comerciales** y **el automatizado**. El **método tradicional** consiste en el uso de reactivos y medios de cultivos para preparar cada prueba bioquímica en el laboratorio, según las especificaciones de cada reactivo, medio de cultivo y prueba en la que se utilice. La interpretación de los resultados de las pruebas que se realizan de manera tradicional debe ser realizada cuidadosamente por personal capacitado y con cierta experiencia. Los **estuches comerciales** de pruebas han comenzado a remplazar a los métodos tradicionales en laboratorios clínicos donde se realizan múltiples pruebas y existe poco personal, ya que estos equipos consisten en tiras y discos reactivos, así como baterías de pruebas microestandarizadas. Los estuches comerciales ofrecen algunas ventajas, principalmente en el ahorro de tiempo y trabajo en el laboratorio, sin embargo, las pruebas deben ser seleccionadas cuidadosamente de entre una gran variedad de productos disponibles comercialmente y para esto deben tomarse en cuenta algunos factores, tales como:^{5,7}

- No existen estuches comerciales universales para todas las bacterias las cuales pueden no ser identificadas por estos métodos.
- Requieren de una cuidadosa interpretación, y un equipo puede sugerir bacterias de características similares, aunque en el caso de baterías de pruebas microestandarizadas, los resultados pueden ser interpretados mediante cartas o programas en computadoras.
- Pueden ser los métodos de elección cuando se requiere identificar bacterias poco comunes o bien en investigaciones epidemiológicas.
- Permiten disminuir el riesgo de contaminación al ambiente, y el trabajo con los microorganismos es mínimo en cuanto a su manipulación.
- Algunos estuches comerciales son más caros que otros y existen equipos indicados para bacterias de importancia médica y otros son especiales para bacterias de importancia industrial.
- La selección de los estuches debe ser hecha de acuerdo con el tipo de investigaciones requeridas, el conocimiento y la experiencia del personal, así como el presupuesto disponible.

Por último, los **métodos automatizados** de identificación para bacterias consisten en tarjetas de pruebas exclusivamente inoculadas por el personal y su incubación, lectura de resultados e interpretación se realizan mediante equipos automatizados controlados por computadora; estos métodos son recomendados en laboratorios que procesan grandes cantidades de muestras y requieren identificar varios microorganismos con un mínimo de personal, por lo tanto estos métodos son costosos. Es importante considerar que como en cualquier método es importante el control de calidad, siempre que sea posible se deben incluir cepas de referencia o control, tanto positivas como negativas al preparar y realizar las pruebas bioquímicas, independientemente del método y principalmente cuando está de por medio un diagnóstico clínico. Las cepas de referencia pueden estar disponibles comercialmente, pero son costosas y cuando no se pueden adquirir, es posible obtener cepas aisladas y caracterizadas en el mismo laboratorio o en otros.^{1,5,7}

En este capítulo se proporciona la información básica a manera de guía para realizar e interpretar pruebas bioquímicas primarias, secundarias y especiales, principalmente por los métodos tradicionales y en algunos casos se puede obtener información para los métodos con equipos comerciales.

CUADRO 7.1 RESUMEN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS.

PRUEBA	MEDIO PRESENTACIÓN	REACTIVOS	INOCULACION	TIEMPO DE INCUBACIÓN	CAMBIO VISIBLE	FUNDAMENTO	INTERPRETACION
Tinción de Gram.	Agua estéril	a) Cristal violeta b) Lugol c) Alcohol-acetona d) Safranina	Extendido bacterias portaobjetos	a) 1 minuto b) 1 minuto c) 5-10 segundos d) 1 minuto	Observación de bacterias en el microscopio a 100x. Las Gram positivas se observan de color azul-violeta y las Gram negativas de color rojo-rosado	El cristal violeta actúa como colorante primario, que se une a la pared bacteriana luego de un tratamiento con una solución de yodo (lugol); las bacterias Gram positivas por su naturaleza química retienen el cristal violeta aun después de una decoloración con alcohol-acetona y aparecen de color azul intenso. Las bacterias Gram negativas no son capaces de retener el cristal violeta después de la decoloración debido a un mayor contenido lipídico en su pared, y se contra-coloran de rojo con la safranina	Las bacterias Gram positivas se coloran de azul-violeta intenso después de la tinción de Gram, y las bacterias Gram negativas se coloran de rojo-rosado después de la tinción de Gram. Ejemplos (Géneros) Gram positivos: <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> Gram negativos: <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Neisseria</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Bruceella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Vibrio</i>
Motilidad	a) Líquido en portaobjetos b) Agar semisólido en tubo	a) Solución salina y fisiológica estéril b) Agar semisólido en tubo	a) En cubreobjetos que contenga una gota de solución salina fisiológica estéril, colocar con el asa una porción de una colonia b) Por picadura	a) Ninguno b) 18 a 24 Hrs	a) Observación de bacterias en movimiento en el microscopio a 45x. b) De incoloro sin crecimiento a turbio con crecimiento.	a) Las bacterias que poseen motilidad son capaces de cruzar el campo microscópico en una gota suspendida. b) Una bacteria tiene motilidad positiva cuando difunde en el agar y produce una turbidez gradual a partir del sitio de inoculación debido a la presencia de flagelos, observándose un incremento paulatino de la turbidez. Ejemplos de generos con motilidad positiva: <i>Escherichia</i> y <i>Salmonella</i> , y con motilidad negativa: <i>Shigella</i> y <i>Klebsiella</i>	
Catalasa	Líquido sobre un portaobjetos con una porción de una colonia	Peroxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂) al 3%	Aplicación de una porción de colonia con un aplicador de madera estéril sobre un portaobjetos que contenga una gota de H ₂ O ₂	Ninguno	Líquido estático a líquido con burbujeo de oxígeno.	Se determina la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno por acción de la enzima catalasa $H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2$ catalasa	Un burbujeo indica una prueba positiva a la presencia de la enzima catalasa. Todos los <i>Streptococcus</i> son catalasa negativos y los generos de <i>Staphylococcus</i> y <i>Neisseria</i> son catalasa positivo
Citocromo Oxidasa.	Tras de papel filtro impregnao con tetrametil-p-fenilendiamina	Tetrametil-p-fenilendiamina	Aplicación de una porción de colonia con un aplicador de madera estéril sobre el papel reactivo	Segundos	De blanco o amarillo a azul intenso	Se determina la presencia de la enzima citocromo oxidasa, la cual transfiere electrones al oxígeno en la cadena respiratoria y en presencia de oxígeno atmosférico oxida la tetrametil-p-fenilendiamina (incolora) formando azul de indolenol (azul intenso)	Una coloración azul intensa indica una prueba positiva a la actividad de la citocromo oxidasa. Todos los generos de enterobacterias son oxidasa negativos (<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , etc.) y los generos <i>Pseudomonas</i> y <i>Neisseria</i> son oxidasa positivos
Oxido-Fermentación (O-F)	Semisólido en tubo y por duplicado pH = 7.1 Color: verde	Indicador azul de bromolol. Glucosa	Ambos tubos por picadura y cubrir uno de los tubos con 1cm de aceite mineral estéril o con parafina fundida	48 o más Hrs	De verde a amarillo	Se determina si la glucosa se metaboliza por vía oxidativa o fermentativa, ya que se detecta la producción de ácidos en medios aerobio y anaerobio con la correspondiente disminución del pH y el vir de del indicador de verde a amarillo	Se pueden obtener los siguientes resultados en los tubos Abierto Cerrado Metabolismo ácido alcalino Oxidativo (amarillo) (verde) (Pseudomonas) ácido Fermentativo (amarillo) (Fscherichia) alcalino (alcalino) No sacrolítico (verde) (Moraxella)

Adaptado de Alvarez, M. C. I. (1984), Koneman, E. W. (1992) y Mac Faddin, J. F. (1990).

CUADRO 7.2 RESUMEN DE PRUEBAS BIOQUIMICAS SECUNDARIAS.

PRUEBA	MEDIO	PRESEN TACION	REACTIVOS	INOCULACION	TIEMPO DE INCUBACION	CAMBIO VISIBLE	FUNDAMENTO	INTERPRETACION
Triple azúcar hierro (TSI)	Agar TSI	Agar sólido inclinado en tubo pH = 7.4 Color naranja	Indicador rojo de fenol. Lactosa Glucosa Sacarosa.	Picadura y estria.	18-24 Hrs.	Amaranjado rojizo a p/rico rojofondo rojo blamarillo/amarillo c/rojo/amarillo	Se determina la capacidad de una bacteria para fermentar glucosa y lactosa o sacarosa contenidas en un medio de crecimiento básico con producción o no de gas H ₂ S.	Pico rojofondo rojo = alcalino/alcalino (No Fermenta) Ej. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Amarillo/amarillo = ácido/ácido (Fermenta glucosa y lactosa o sacarosa) Ej. <i>Escherichia, Klebsiella</i> Rojo/amarillo = alcalino/ácido (Fermenta glucosa) Ej. <i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i> (precipitado negro por H ₂ S)
Beta –galactosidasa (ONPG)	Caldo ONPG	Líquido, pH= 10	Buffer de fosfato de sodio 1M, pH=10 O-nitroteni-β-galactosido (ONPG), 0.75M. Solución salina fisiológica Tolueno.	Preparar suspensión bacteriana espesa en solución salina fisiológica e inocular el caldo ONPG o inocular un tubo de caldo con un inóculo espeso tomado con el asa.	20 minutos a 24 hrs.	De incoloro a amarillo	Se busca la presencia de la β-galactosidasa que puede hidrolizar el ONPG desdoblándolo en dos residuos: la galactosa y el orntonitrofenol.	Una prueba positiva se da cuando a partir del ONPG (incoloro) se obtiene el orntonitrofenol (amarillo). Ejs. <i>Escherichia coli</i> y <i>Serratia marcescens</i> son ONPG positivas y las especies del género <i>Proteus</i> son ONPG negativas.
Fermentación de Carbohidratos.	CTA o Caldo Rojo de Fenol (CRF)	Semisólido en tubo pH= 7.5 o líquido	Indicador rojo de fenol. Carbohidratos (Glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, fructosa) al 1%	Por picadura Inoculación en medio líquido.	24 o más Hrs.	De rojo a amarillo.	Se determina la fermentación de diversos carbohidratos en forma individual al detectar la formación de ácidos con la correspondiente disminución del pH.	Un color amarillo indica la fermentación del carbohidrato en cuestión. Ej. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> solo fermenta la glucosa.
Rojo de Metilo – Voges Proskauer a) Rojo de metilo. b) Voges Proskauer.	RM – VP a) RM b) VP	Caldo, pH = 6.9	a) Indicador rojo de metilo. b) Alfa naftol 5%, KOH 40%	Inoculación con asa.	a) 24 a 48 Hrs. b) 48 a 72 Hrs.	a) amarillo a rojo b) amarillo a anillo rojo.	a) Se determina la producción de ácidos fuertes a partir de la fermentación de glucosa, con lo que se disminuye el pH por debajo de 4.4. b) Con la fermentación de la glucosa se produce acetoina (acetylmeilcarbonyl), la cual es detectable al convertirla en diacétilo en presencia de O ₂ y KOH al 40% y el alfa-naftol actúa como catalizador para revelar un complejo de color rojo.	a) Un color rojo indica una prueba positiva a la presencia de ácidos fuertes producto de la fermentación de la glucosa. b) Un anillo rojo indica una prueba positiva a la presencia de acetoina derivada de la fermentación de la glucosa. NEGATIVO RM <i>Escherichia, Shigella, Salmonella, Proteus</i> VP <i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> Escherichia, Shigella, Salmonella, Proteus.
Reduccion del nitrato	Caldo nitrato	Caldo	Alfa naphthamina en ácido acético. Acido sulfanilico en ácido acético. Zinc.	Inoculación con asa.	18 a 24 Hrs.	1ª fase amarillo a rojo 2ª fase: amarillo sin cambio o amarillo a rojo tras la adición de zinc.	Se determina la reducción de nitratos a nitritos o a nitrógeno molecular para la obtención de oxígeno. lo cual se manifiesta al agregar alfa-naftilamina y ácido sulfanilico por la formación de un colorante diazonio (p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina	1ª fase: Un color rojo tras la adición de alfa-naftilamina y ácido sulfanilico indica la reducción de nitratos a nitritos. 2ª fase: Al no haber cambio puede ser un resultado negativo o tras la adición de zinc sin cambio indica un resultado positivo a la reducción de nitratos y un color rojo tras la adición de zinc indica un resultado negativo a la reducción de nitratos a nitritos. Ej. <i>Escherichia coli</i> y <i>Serratia</i> son nitratos positivos y <i>Enterobacter agglomerans</i> es nitratos negativa


Adaptado de Alvarez, M. C. I. (1994), Koneman, E. W. (1992) y Mac Faddin, J. F. (1990).

CUADRO 7.2 a RESUMEN DE PRUEBAS BIOQUIMICAS SECUNDARIAS (continuación).

PRUEBA	MEDIO	PRESENTACION	REACTIVOS	INOCULACION	TIEMPO DE INCUBACION	CAMBIO VISIBLE	FUNDAMENTO	INTERPRETACION
Reacción de la ureasa	a) Caldo urea de Stuart b) Agar urea de Christensen.	a) Caldo, pH=6.8 b) Agar en placa o en tubo inclinado, pH=6.8	Indicador rojo de fenol	a) Inoculación con asa b) Estrado.	a) y b) 18 a 24 Hrs	alcanela o amarillo a rojo intenso. b) amarillo a rojo intenso	Se detecta la hidrólisis de la urea catalizada por la presencia de la ureasa con producción de amoníaco y dióxido de carbono que forman carbonato de amonio y alcalinizan el medio aumentando el pH.	Un cambio de color a rojo intenso indica una alcalinización del medio por la presencia de los productos de la hidrólisis de la urea por actividad de los géneros <i>Proteus</i> y <i>Klebsiella</i> son ureasa positivos y <i>Escherichia coli</i> y <i>Serratia</i> son ureasa negativa
Citratos	Citrato de Simmons	Semisolido inclinado, pH=6.9 Color verde	Indicador azul de bromotol.	Estrado	24 a 48 Hrs	De verde a azul intenso	Se detecta la utilización de citrato como única fuente de carbono, con la formación de productos alcalinos.	Un color azul intenso indica una alcalinización del medio por la utilización del citrato como fuente de carbono. Ej. <i>Enterobacter aerogenes</i> es citratos positiva y <i>Escherichia coli</i> es citratos negativa.
Malonatos	Caldo de malonato	Caldo, pH=6.7 Color verde	Indicador azul de bromotol.	Inoculación con asa	24 a 48 Hrs	De verde a azul intenso	Determinar la utilización de malonato de sodio como única fuente de carbono con la alcalinización del medio.	Un color azul intenso indica la alcalinización del medio por la utilización del malonato como única fuente de carbono. Ej. Los géneros <i>Enterobacter</i> y <i>Klebsiella</i> son malonato positivos, y <i>Escherichia coli</i> es malonato negativa.
Prueba de indol	a) SIM b) MIO	a) y b) Semisolidos en tubo. a) pH=7.3 b) pH=6.0	a) y b) Triptofano Reactivo de Kovac o Erlich (p-dimetilaminobenzaldehído)	a) Por picadura. b) Por picadura	18 a 24 Hrs	a) Incoloro a rojo en la interfase del medio y el reactivo de Kovac. b) Lila a rojo en la interfase del medio y el reactivo de Kovac.	Se determina la producción de indol a partir del aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa, el indol es detectado por la reacción entre el indol y el p-dimetilaminobenzaldehído para formar un complejo rojo.	Un color rojo indica una prueba positiva a la producción de indol a partir de triptófano, por la formación de un complejo colorido en la interfase del medio y el reactivo agregado (Kovac o Erlich). Ej. <i>Escherichia coli</i> es indol positiva y los géneros <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter</i> son indol negativos.
Fenilalanina desaminasa	Agar Fenilalanina.	Sólido inclinado en tubo, pH=7.3	Cloruro férrico al 10% (4-5 gotas)	Estrado.	18 a 24 Hrs	De incoloro a verde intenso en la superficie	Se determina la acción de la enzima fenilalanina desaminasa que cataliza la desaminación de la fenilalanina para formar el ácido fenilpirúvico, que es revelado con cloruro férrico al formarse un complejo de color verde intenso.	Un color verde indica una prueba positiva a la desaminación de la fenilalanina con producción de ácido fenilpirúvico que forma un complejo con el cloruro férrico. Ej. El género <i>Proteus</i> es positivo y <i>Escherichia coli</i> es negativo.
Descarboxilasas	a) LIA b) MIO c) Arginina	a) Sólido b) Semisolido c) Caldo a), b) y c) pH=6.0 y color lila suave	Indicadores Púrpura de bromocresol rojo de cresol. a) Lisis b) Ornitina c) Arginina	a) y b) Picadura c) Inoculación con asa.	12 a 18 Hrs	a) , b) y c) Púrpura a amarillo y nuevamente a púrpura	a), b) y c) Se determina la descarboxilación enzimática de aminoácidos con formación de aminas y alcalinización del medio posterior a una fermentación de glucosa con acidificación y cambio a color amarillo.	Un cambio de color de púrpura a amarillo y con un retorno a púrpura indica un resultado positivo a las pruebas de descarboxilación de aminoácidos con producción de las aminas específicas. Si no hay retorno a púrpura es negativo a la descarboxilación. a) Lisis → Cadaverina (<i>Enterobacter aerogenes</i> es positiva y <i>Enterobacter cloacae</i> es negativa) b) Ornitina → Putrescina (<i>Enterobacter cloacae</i> es positiva y el género <i>Klebsiella</i> es negativo). c) Arginina → Putrescina (<i>Enterobacter cloacae</i> es positiva y <i>Enterobacter aerogenes</i> es negativa)

Adaptado de Alvarez, M. C. I. (1994), Koneman, E. W. (1992) y Mac Faddin, J. F. (1990).

CUADRO 7.3 RESUMEN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS ESPECIALES.

PRUEBA	MEDIO	PRESENTACION	REACTIVOS	INOCULACION	TIEMPO DE INCUBACION	CAMBIO VISIBLE	FUNDAMENTO	INTERPRETACION
Hidrolisis de Hipurato de sodio. a) Benzoato b) Glicina	Hipurato de sodio. Caldo.	a) Cloruro ferrico (0.2 mL) b) Ninhidrina (0.2 mL)	Inóculo con asa	a) 20 o más Hrs. b) 2 Hrs.	a) Amarillo de precipitado blanco. b) Amarillo a púrpura intenso.	Se determina la hidrólisis del hipurato de sodio por la enzima hipuricasa con producción de benzoato de sodio y glicina, los cuales pueden ser detectados al formar un complejo precipitado con cloruro ferrico y un complejo púrpura intenso con ninhidrina, respectivamente.	a) La aparición de un precipitado de benzoato de sodio posterior a la adición de cloruro ferrico indica una prueba positiva a la hidrólisis de hipurato. b) Un color púrpura intenso por la presencia de un complejo de ninhidrina con amoníaco indica una prueba positiva a la hidrólisis de hipurato indicando que la bacteria es un estreptococo del grupo B. Los estreptococos del grupo B (<i>S. agalactiae</i>) son positivos y algunos estreptococos del grupo D (<i>S. faecalis</i>) son negativos a la hidrólisis de hipurato.	
Blis esculina	Blis-esculina.	Semisolido inclinado en tubo o solidado en placa. pH=7.0	Esculina Blis de res	Inóculo de cultivo puro en caldo sobre piro de llauta o por estrado en placa.	48 Hrs.	Ennegrecimiento del medio o halo marrón	Se detecta la hidrólisis de la esculina en un medio con blis, produciéndose glucosa y esculema, esta última forma un complejo negro al reaccionar con iones hierro Fe ³⁺ .	Un color negro del medio o un halo marrón indican una prueba positiva de la hidrólisis de la esculina en un medio con blis. Los estreptococos del grupo D y <i>Serratia marcescens</i> son positivos y <i>Edwardiella tarda</i> es negativa.
CAMP	Agar sangre al 5%	Solido.	Sangre desfibrada de camero	Estrado transversal. Vertical. Streptococcus sp. Horizontal. <i>Streptococcus aureus</i> . (No juntar estrías)	24 Hrs.	De rojo a translucido con β-hemolisis intensa en las cercanías de las estrías de ambas bacterias	La actividad hemolítica de la β-hemolis estafilocócica se ve incrementada por la presencia del factor CAMP de los Streptococcus del grupo B. Esto se observa como un área de β-hemolisis en forma de flecha en las cercanías de los crecimientos bacterianos.	 Un incremento de la hemólisis a manera de punta de flecha indica una prueba positiva al factor CAMP y la presencia de un Streptococcus del grupo B (<i>S. agalactiae</i>)
Coagulasa	Plasma estéril.	Plasma. Humano Conejo	Plasma estéril.	Inocular 0.5 mL de cultivo en caldo de 0.5 mL de plasma.	1 - 4 y hasta 24 Hrs	Coagulación del plasma.	Se determina la coagulación de plasma debida a la presencia de la enzima coagulasa	La coagulación del plasma indica una prueba positiva de la presencia de la enzima coagulasa, la cual es característica específica del <i>Staphylococcus aureus</i>
Sensibilidad a Bacitracina	Agar sangre al 5%.	Solido en placa	Disco de bacitracina (0.04U).	Estrado masivo	24 Hrs	Inhibición crecimiento	La bacitracina por ser hidrosoluble puede difundir fácilmente en el agar al estar impregnada en un disco de papel a una concentración baja (0.02 a 0.04 unidades) y por su acción bactericida puede inhibir el crecimiento de los estreptococos del grupo A	Un halo de inhibición de cualquier diámetro indica que existe sensibilidad a la bacitracina y que la bacteria presuntivamente es un estreptococo del grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
Sensibilidad a Optoquina	Agar sangre.	Solido en placa.	Disco de optoquina	Estrado masivo.	24 Hrs	Inhibición crecimiento	La optoquina por ser hidrosoluble puede difundir fácilmente en el agar al estar impregnada en un disco de papel a una concentración baja (5 µg/mL o menos) y por su acción detergente cambia la tensión superficial y lisa las células bacterianas pudiendo inhibir el crecimiento del <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	Un halo de inhibición superior a 15 mm de diámetro indica que existe sensibilidad a la optoquina y que la bacteria presuntivamente es un <i>Streptococcus pneumoniae</i> .

Adaptado de Alvarez, M. C. I. (1994), Koneman, E. W. (1992) y Mac Faddin, J. F. (1990).

OBJETIVOS.

- Conocer la importancia de las pruebas bioquímicas en la identificación bacteriana.
- Conocer las características más importantes y principios de las pruebas bioquímicas primarias, secundarias y especiales más utilizadas.
- Identificar una bacteria empleando las pruebas bioquímicas disponibles en el laboratorio, tratando de establecer el género y la especie.

MATERIAL.

Gradilla.

Mechero Bunsen.

Asas bacteriológicas (en círculo y en punta)

Portaobjetos.

Cubreobjetos.

Plastilina.

Aplicadores o palillos de madera estériles.

Microscopio óptico.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Cepa de *Staphylococcus aureus*.

Diferentes cepas bacterianas disponibles en el laboratorio.

Plasma humano o de conejo estériles.

MEDIOS DE CULTIVO.

MIO (Motilidad, indol y ornitina).

SIM (Acido sulfhídrico, indol y motilidad).

O-F (Oxido – fermentación).

TSI (Triple azúcar hierro).

CTA o base CRF.

RM-VP (Rojo de metilo – Voges Proskauer).

Caldo nitrato.

Caldo urea de Stuart.

Citrato de Simmons.

Caldo de Malonato.

Agar Fenilalanina.

LIA (Lisina)

Caldo arginina.

Agar sangre.

Bilis esculina.

ONPG (O-nitrofenil- β -galactósido)

REACTIVOS.

Cristal violeta.

Lugol.

Alcohol-acetona (1:1).

Safranina.

Solución salina fisiológica estéril.

Peróxido de hidrógeno al 3%.

Tetrametil-p-fenilendiamina (tiras).

Buffer de fosfato de sodio 1M pH=10.

Tolueno.

α -naftol al 5%.

Hidróxido de potasio al 40%.

α -naftilamina.

Acido sulfanílico.

Zinc.

Reactivo de Kovac o Erlich.

(p-dimetilaminobenzaldehído).

Cloruro férrico al 10%.

Ninhidrina.

Discos con bacitracina (0.04U).

Discos con optoquina.

Aceite mineral o parafina.

MÉTODO.

1. Para evitar cualquier contaminación que conduzca a resultados poco confiables, es necesario trabajar en un ambiente estéril desinfectando la superficie de trabajo y empleando un mechero. Además, tener a la mano el material, los reactivos y el equipo que se va a utilizar.
2. Con base en el material disponible para las pruebas bioquímicas y tomando en cuenta los cuadros 7.1, 7.2 y 7.3, realizar las pruebas necesarias más importantes para identificar una cepa bacteriana desconocida.
3. Iniciar siempre con las pruebas primarias y continuar con las pruebas secundarias.
4. Realizar la interpretación de los resultados, así como sugerir algunas pruebas alternativas no contempladas.
5. Proponer las pruebas especiales que realizaría de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas primarias y secundarias y predecir los resultados.

TABLA 7.1 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS.

PRUEBA	RESULTADO	INTERPRETACIÓN	OBSERVACIONES
GRAM			
MOTILIDAD			
CATALASA			
OXIDASA			
O - F			
TSI			
β -GALACTOSIDASA			
RM-VP			
REDUCCION DE NITRATOS			
REACCION DE LA UREASA			
CITRATOS			
MALONATOS			
INDOL			
FENILALANINA DESAMINASA			
LISINA DESCARBOXILASA			
ORNITINA DESCARBOXILASA			
ARGININA DESCARBOXILASA			

GENERO: _____

ESPECIE: _____

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

CONCLUSIONES.

Cuestionario.

- a) ¿Qué son y para qué sirven las pruebas bioquímicas?
- b) Anote la clasificación de las pruebas bioquímicas:
- c) De acuerdo con la clasificación anterior mencione las pruebas bioquímicas que conoce y anote el fundamento de tres de ellas:

BIBLIOGRAFÍA.

1. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 77-112.
2. Cappuccino, J. G., Sherman. N. Microbiology. A Laboratory Manual. 3ª edición. Benjamin/Cummings. EU. (1992) Págs. 125 y 126.
3. Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. Microbiological Methods. 7ª edición. Butterworth – Heinemann. Inglaterra. (1995) Págs. 102 - 120.
4. Pelczar, Jr. M. J., et al. Microbiología. 2ª edición. Mc Graw – Hill. México. (1993). Págs. 153
5. Koneman, E. W. Et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. (1992). Págs. 172, 190, 191, 198, 199, 217, 218, 263, 400, 416, 424, 426, 434, 438, 439.
6. Lansing, M. P. Microbiología. 4ª edición. Mc Graw-Hill. España. (2000). Págs. 97-112.
7. Mac Faddin, J. F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana. México. (1990) Págs. 17–71, 78-83, 104–120, 126–129, 134–172, 183-198.

ANEXO 7.1

INDICADORES ÁCIDO-BASE.

TABLA 7.2 INDICADORES DE pH UTILIZADOS EN MICROBIOLOGÍA.

INDICADOR	INTERVALO DE TRANSICION	COLOR (pH ácido)	COLOR (pH básico)
Púrpura de m-cresol	1.2 – 2.8	Rojo	Amarillo
Azul timol	1.2 – 2.8	Rojo	Amarillo
Tropeolina 00	1.3 – 3.2	Rojo	Amarillo
2,4-dinitrofenol	2.0 – 4.7	Incoloro	Amarillo
Azul de bromofenol	3.0 – 4.6	Amarillo	Azul
Naranja de metilo	3.1 – 4.4	Rojo	Amarillo - naranja
Alizarinsulfonato sódico	3.7 – 5.2	Amarillo	Violeta
Verde de bromocresol	3.8 – 5.4	Amarillo	Azul
Rojo de metilo	4.4 – 6.2	Rojo	Amarillo
De Andrade	5.0 – 8.0	Rosa	Amarillo
Púrpura de bromocresol	5.2 – 6.8	Amarillo	Púrpura
p-nitrofenol	5.6 – 7.6	Incoloro	Amarillo
Azul de bromotimol	6.0 – 7.6	Amarillo	Azul
Rojo de fenol	6.4 – 8.2	Amarillo	Rojo
Rojo neutro	6.8 – 8.0	Rojo	Amarillo
Rojo de cresol	7.0 – 8.8	Amarillo	Rojo
Púrpura de m-cresol	7.4 – 9.0	Amarillo	Púrpura
Tropeolina 000 N° 1	7.4 – 8.9	Amarillo	Rosa
Azul timol	8.0 – 9.6	Amarillo	Azul
Fenolftaleína	8.2 – 9.8	Incoloro	Rosa
Timolftaleína	9.3 – 10.5	Incoloro	Azul
Amarillo de alizarina R	10.0 – 12.1	Amarillo	Rojo
Tropeolina 0	11.0 – 12.7	Amarillo	Naranja

Referencias.

1. Budavari, S., et al. The Merck Index. 12a edición. Merck & Co., Rahway, N. J., EU. (1996). Misc. 58 y 59.
2. Mac Faddin, J. F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana. México. (1990) Apéndice 3.

CAPÍTULO No. 8

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

INTRODUCCIÓN

Alexander Fleming descubre la penicilina en 1928, observando por casualidad que un hongo contaminante no solo se estaba desarrollando en una placa de medio de cultivo que había sido dejada abierta por descuido, sino que las colonias de estafilococos adyacentes al hongo estaban sufriendo lisis. Fleming dedujo correctamente que el hongo, identificado posteriormente como *Penicillium*, producía una sustancia bacteriolítica difusible capaz de matar a la bacteria estafilococcus. El **antibiótico** desconocido de Fleming, más tarde llamado penicilina, anunció el advenimiento de la era de los antibióticos. Fleming, después desarrolló el primer método para conocer la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos, el cual fue de gran importancia con el auge de los mismos y su uso difundido mundialmente.^{2,6,9,15,16}

Waksman propuso el término **antibiótico**, al descubrir la estreptomycinina, a todas aquellas sustancias con actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivientes. El término significó durante mucho tiempo sustancias extraídas de bacterias, hongos o algas con capacidad de quitar la vida de diferentes microorganismos. A principios de siglo, Ehrlich utilizó el término de **agente quimioterapéutico** en aquellas sustancias utilizadas en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas como sustancias químicas antibacterianas.^{2,9,15,16}

Actualmente se propone el término de **quimioantibiótico** para acoplar en una palabra ambos conceptos, muchos de los actuales tienen origen sintético o semisintético, pero el concepto más generalizado es el siguiente: "Un **antibiótico** se define como una sustancia que presenta actividad antimicrobiana y es utilizada para el tratamiento de enfermedades de los organismos superiores".^{2,9,15}

Existen dos formas de acuerdo al **espectro** que presentan: **Amplio espectro**, son aquellos que pueden eliminar varios grupos de microorganismos (Gram + y Gram -) a la vez y de **espectro reducido**, aquellos que solo actúan sobre un grupo específico de microorganismos (sólo Gram + o Gram -).^{1,2,16}

El antibiótico presenta dos posibilidades de efectos:

- 1.-Destrucción del microorganismo (lisis o muerte) denominado efecto **microbicida**.
- 2.-Inhibición del crecimiento (inmovilización vital) denominado efecto **microstático**.

De esta división surgen las dos sustancias importantes desde el punto de vista clínico-terapéutico, los **bactericidas** y los **bacteriostáticos**, estos últimos inmovilizan vitalmente al microorganismo, en espera de que la respuesta inmune aporte los elementos de defensa necesarios para terminar con el microorganismo. Sin embargo, este tipo de mecanismos a veces resultan lentos o impotentes para resolver los problemas que pueden causar los microorganismos patógenos, por lo tanto se requiere de una sustancia que sea capaz de presentar una acción letal sobre estos, tal es el caso de los bactericidas que provocan la lisis o muerte de los microorganismos, acción especialmente importante cuando la gravedad del caso lo requiere.^{2,5,7}

MECANISMOS MOLECULARES DE LOS ANTIBIÓTICOS.

Los efectos antes mencionados pueden llevarse a cabo por diferentes **mecanismos moleculares** provocados por el antibiótico. Los conocidos son:

- 1.-**Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana** (penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina, carbapenem, ácido clavulánico)
- 2.-**Alteración de la membrana celular** (polimixina B y colistina)
- 3.-**Inhibición de la síntesis de proteínas** (Aminoglucósidos como estreptomina, kanamicina, gentamicina, amikacina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y clindamicina)
- 4.-**Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos** (Rifampicina, quinolonas como el ácido nalidíxico y ciprofloxacina; metronidazol)
- 5.-**Antibióticos con actividad antimetabólica** (Sulfonamidas como sulfisoxazol, trimetoprima, sulfametoxazol y sulfadiazina; nitrofurantoína)

El estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (**antibiograma**) es necesario porque el espectro de actividad de los preparados es limitado y las bacterias pueden desarrollar resistencias, para lo cual es recomendable monitorear a los microorganismos conocidos y conocer su respuesta ante determinados antibióticos o mezclas de ellos.^{1,2,9}

Los métodos utilizados con este fin permiten el estudio directo de la sensibilidad y la pérdida de la misma o desarrollo de resistencia frente a los antibióticos en bacterias aisladas de procesos patológicos. Estas técnicas tienen como objetivo enfrentar ambas partes y evaluar la viabilidad de las bacterias frente a los antibióticos. Existen varias formas de hacer estas evaluaciones, entre las más comunes destacan:

TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR (KIRBY-BAUER).

El principio básico de esta técnica es el de que tan pronto como un disco de papel filtro impregnado con el antibiótico hace contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel

filtro y el antibiótico difunde hacia el medio. La velocidad de extracción del antibiótico fuera del disco es mayor a la de difusión hacia el medio, de modo que la concentración de antibiótico inmediatamente adyacente al disco, puede exceder la del mismo disco. Sin embargo a medida que aumenta la distancia al disco, hay una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico hasta alcanzar un punto en el cual el desarrollo bacteriano en la superficie del agar ya no es inhibido (Tabla 8.1). El resultado es una zona de inhibición del desarrollo con borde bien delineado.^{1,2,3,4,5,7,9,11,12,13}

TÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO O EN AGAR.

Su principio consiste en hacer diluciones seriadas del antibiótico en caldo nutritivo o en agar con diferentes concentraciones del antibiótico y exponer a los microorganismos al contacto con estas, se incuban y se pueden determinar las concentraciones con menor contenido del antibiótico inhibiendo el crecimiento de los mismos, o sea la concentración mínima inhibitoria (CMI). Casi siempre se emplean diluciones dobles seriadas y la concentración del antibiótico se expresa en $\mu\text{g/mL}$, este método es muy exacto y sirve como referencia en cuanto a concentraciones al método descrito anteriormente.^{1,2,3,4,5,7,9,11,12,13}

Se hace necesario contar con agares y caldos nutritivos para asegurar el crecimiento de las bacterias a evaluar, en algunos casos estos medios deben enriquecerse (Ejemplo: con sangre o hemoglobina) para favorecer el desarrollo de las bacterias, sobre todo de aquellas de crecimiento lento o fastidiosas y poder observar los halos de inhibición sobre céspedes de microorganismos. También, si es necesario se pueden utilizar sistemas de anaerobiosis para aquellas bacterias que así lo requieran. Cuando se tienen cepas de microorganismos de difícil crecimiento, se varía la composición del medio sólido a utilizar, por ejemplo, para *H. influenzae* se emplea medio Müller Hinton con 1% de hemoglobina ó 0.5 de sangre de caballo y 1% de polienriquecimiento con un suplemento sintético con factor V y X.^{1,2,3,4}

OBJETIVOS.

- Conocer los métodos que existen para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos.
- Determinar la susceptibilidad de los microorganismos ante la presencia de algunos antibióticos.
- Conocer los factores, los cuales pueden afectar la prueba anterior.
- Establecer la importancia de las pruebas de susceptibilidad en la elección de un antibiótico para sugerir el tratamiento terapéutico para un paciente.

MATERIAL Y EQUIPO.

Cepas: Gram positivas: *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus spp.*

Gram negativas: *Pseudomonas spp* o *Escherichia coli*.

REACTIVOS.

Etanol al 70% o benzal en solución.

Tubos con 4 mL de solución salina fisiológica estéril.

Sensidiscos impregnados con diferentes antibióticos para Gram positivas: (Penicilina, amikacina, ampicilina, cefalotina, estreptomycin, vancomicina, etc.).

Sensidiscos impregnados con diferentes antibióticos para Gram negativas: (Nitrofurantoina, cloranfenicol, tetraciclina, dicloxacilina, ácido nalidixico, amikacina, ciprofloxacina, carbenicilina, etc.).

Agar Müller-Hinton.

Agar Müller-Hinton-sangre.

Agar sangre.

Medio líquido de Müller-Hinton o caldo BHI (infusión cerebro corazón) o caldo soya tripticasa.

Otros:

Encendedor o cerillos.

Mechero de Bunsen.

Cajas de Petri para guardar los sensidiscos.

Pinzas.

Hisopos estériles.

Nefelómetro de Mac Farland.

Asas bacteriológicas.

MÉTODO.**DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS (KIRBY-BAUER) PARA PATÓGENOS AEROBIOS DE RÁPIDO CRECIMIENTO.** ^{1,3,4,5,8,9,10,17}**Preparación del inóculo.****a) Suspensión directa de colonias.**

A partir de las bacterias a evaluar de un cultivo en placa de agar sangre de 18 a 24 horas, se seleccionan al menos tres a cinco colonias puras, se transfieren de una en una con el asa bacteriológica estéril a un tubo que contiene 4 a 5 mL de solución salina estéril, se resuspenden y se ajusta a una turbidez equivalente al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.

b) Método del cultivo.

De igual forma se puede utilizar, medio líquido Müller-Hinton o caldo soya tripticasa, se incuba a 35°C hasta que consigue o excede la turbidez 0.5 de Mc Farland (2-6 horas). La turbidez se ajusta con solución salina o caldo hasta ser comparable con el patrón 0.5 Mc Farland.

1. Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez, se introduce un hisopo de algodón estéril y se elimina el exceso de líquido presionando y rotando firmemente el hisopo en las paredes del tubo.
2. Se realiza un sembrado masivo en las cajas de medios de cultivo (Figura 8.1).
 - a) Gram positivas: *Stahylococcus aureus* o *Streptococcus spp.* en Agar Müller-Hinton-sangre.
 - b) Gram negativas: *Pseudomonas spp* o *Escherichia coli* en agar Müeller-Hinton.
3. Con ayuda de pinzas estériles, colocar sobre el sembrado masivo anterior los sensidiscos impregnados con los antibióticos y presionar ligeramente para que se adhieran bien al agar. Los sensidiscos se reparten en el área de sembrado de tal forma que no se encuentren muy cercanos unos con otros (24 mm entre disco y disco, y a 20 mm del borde de la caja), para tal fin se pueden colocar un máximo de 12 sensidiscos en placas de 150 mm y 5 discos en placas de 100 mm.
4. Incubar a 35°C dentro de los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos durante 16-18 horas.
5. Hacer las lecturas correspondientes a los halos de inhibición de crecimiento. Estos se pueden medir con una regla en milímetros, o bien utilizando reglas proporcionadas por los fabricantes de los sensidiscos (Figura 8.1).
6. Determinar mediante los resultados, las características de sensibilidad o resistencia a los antibióticos para cada bacteria de acuerdo a la tabla proporcionada por los fabricantes de los sensidiscos (Tabla 8.1) y determinar el antibiótico de posible uso en un tratamiento terapéutico con base en estos resultados.

FIGURA 8.1 Inoculación y lectura del antibiograma.

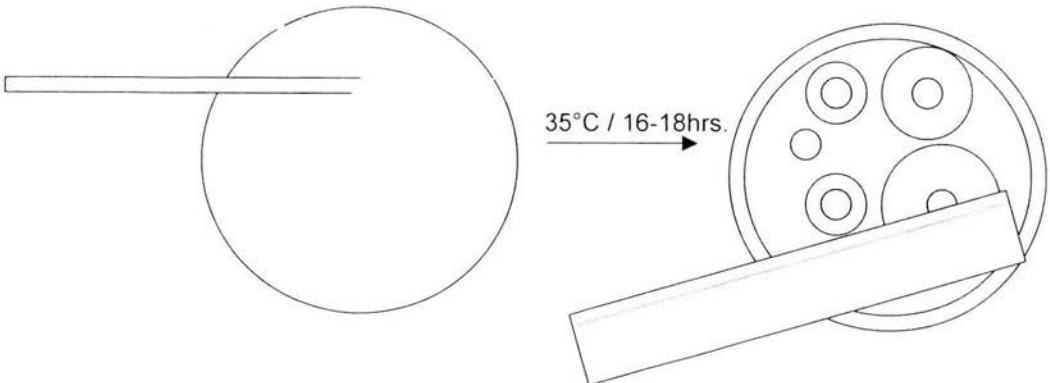


TABLA 8.1 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS PARA ALGUNOS ANTIBIÓTICOS.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
		R	I	S
Amicacina	30 mcg	≤ 14	15-16	≥ 17
Ampicilina	10 mcg			
<i>Enterobacteriaceae</i>		≤ 11	12-13	≥ 14
<i>Staphylococcus spp.</i>		≤ 28		≥ 29
Enterococos		≤ 16		≥ 20
<i>Streptococcus spp.</i>		≤ 21		≥ 30
Carbenicilina	100 mcg			
<i>Enterobacteriaceae</i>		≤ 17	18-22	≥ 23
<i>Pseudomonas spp.</i>		≤ 13	14-16	≥ 17
Cefalotina	30 mcg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cloranfenicol	30 mcg	≤ 12	13-17	≥ 18
Dicloxacilina	1 mcg			
<i>Staphylococcus spp.</i>		≤ 10	11-12	≥ 13
Penicilina	10 U			
<i>Staphylococcus spp.</i>		≤ 28		≥ 29
<i>N. gonorrhoeae</i>		≤ 19		≥ 20
Tetraciclina	30 mcg	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim-Sulfametoxazol	25 mcg	≤ 10	11-15	≥ 16

R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensible.

Adaptado de Koneman, E. W. (1992) y NCCLS M2-A6 (1997)

OBSERVACIONES Y RESULTADOS.

Bacteria	Antibiótico	Diámetro del halo de inhibición (mm)	R	I	S

Bacteria	Antibiótico	Diámetro del halo de inhibición (mm)	R	I	S

R = Resistente; I = Intermedio; S = Sensible.

CONCLUSIONES.**Cuestionario.**

- a) ¿Qué es un antibiótico?
- b) ¿Qué es un antibiograma y para qué sirve?
- c) ¿Qué pruebas de susceptibilidad a antibióticos conoce?
- d) Describa brevemente el método de difusión en agar con discos:

BIBLIOGRAFIA.

1. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 128-140.
2. Bergoglio, R. Antibióticos. 5a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. (1993) Págs. 3-12, 23-30, 82-85.
3. Cappuccino, J. G., Sherman, N. Microbiology. A Laboratory Manual. 3ª edición. Benjammin/Cummings. EU. (1992) Págs. 247-254.
4. Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. Microbiological Methods. 7ª edición. Butterworth – Heinemann. Inglaterra. (1995) Págs. 178-205.
5. Cruz, J. G. Sainz, M. J. E. Segura, R. P. Manual de Bacteriología Clínica. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 95-99.
6. Delaat, N. Microbiología. 2a Edición. Edit. Latinoamericana. México. (1985). Págs. 331-337.
7. Fish Back, T.T. Manual de Pruebas Diagnósticas. 5ª edición. McGraw Hill Interamericana. México. (1997). Págs. 476-479.
8. Johnson, T. R., Case, Ch. L. Laboratory Experiments in Microbiology. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1992) Págs. 153-155.
9. Koneman, E. W., et al. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. México. (1992) Págs. 78-79, 192-195, 564-598.
10. Krueger, W. B., Kolodziej, B. J. Laboratory Procedures for General Microbiology. Kendall / Hunt Publishing. EU. (1986) Págs. 106-107.
11. NCCLS. Métodos de Dilución para el Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana para Bacterias de Crecimiento Aeróbico. 4ª edición (Norma Aprobada). Documento NCCLS M7-A4. Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS). Vol. 17 No. 2, EU. (1997)
12. NCCLS. Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de la Susceptibilidad Antimicrobiana. 8º Suplemento Informativo. Documento NCCLS M100-S8. Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS). Vol. 18 No. 1, EU. (1998)
13. NCCLS. Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de la Susceptibilidad Antimicrobiana Mediante Discos. 6ª edición (Norma Aprobada). Documento NCCLS M2-A6. Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS). Vol. 17 No. 1, EU. (1997)
14. Pelczar, Jr. M. J. et al. Microbiología. 2ª edición. Mc Graw – Hill. México. (1982) Pág. 408-431.
15. Romero C. Microbiología y Parasitología Humana. Bases Etiológicas de las Enfermedades Infecciosas. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. (1999). Págs. 32-39.
16. Volk, W. A. Basic Microbiology. 7ª edición. Harper Collins Publishers. E. U. (1992). Págs. 159-181.
17. Washington, J. A. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. 2ª edición. Springer-Verlag. EU. (1985). Págs. 689-746.

ANEXO 8.1

NEFELÓMETRO DE MAC-FARLAND

Preparación.

Debe prepararse en una serie de 10 tubos de rosca de 13 x 100, adicionando las siguientes soluciones: ¹

Tubo No.	Cloruro de Bario al 1% (mL)	Acido sulfúrico al 1% (mL)	Suspensión bacteriana por mL ($\times 10^8$)
0.5	0.05	9.95	1
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

Cerrar herméticamente los tubos, mezclar perfectamente bien, rotular cada uno de los tubos con su número y concentración bacteriana, de preferencia en la parte superior del tubo, de tal forma que no impida el paso de la luz a través de la solución preparada. El tiempo de vida media de esta serie de tubos es de un mes a temperatura ambiente, sin embargo, sus densidades deben ser comprobadas para extender dicha vida media (p. Ej., para el patrón 0.5 de Mc Farland la absorbancia a 625 nm deberá estar entre 0.08 y 0.10). ^{1,2}

La utilidad que representa este nefelómetro es que se utiliza para calcular una concentración bacteriana aproximada en número de bacterias por mililitro (mL), por comparación óptica de la turbidez de cada tubo con una suspensión preparada a partir de un cultivo bacteriano puro. ¹

Referencias.

1. Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994). Pág. 140.
2. NCCLS. Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de la Susceptibilidad Antimicrobiana Mediante Discos. 6ª edición (Norma Aprobada). Documento NCCLS M2-A6. Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS). Vol. 17 No. 1, EU. (1997)

CAPÍTULO No. 9

PARASITOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

La **Parasitología** es una rama de la Biología y de la Microbiología que se encarga del estudio de los **parásitos**, cuya importancia radica en la capacidad que tienen para provocar enfermedades de diversa magnitud y encontrarse en portadores sanos. La palabra **parásito** viene del griego **para** = a un lado y **sito** = alimento, es decir, son organismos que requieren estar cerca de los nutrientes y por lo tanto se alojan en un hospedero que les proporcione las condiciones adecuadas para su supervivencia; los parásitos se encuentran en todos los estratos de la cadena alimenticia, incluyéndose ellos mismos; y se pueden encontrar fuera o dentro del hospedero.^{1,2,3,4,5,7,9}

Los parásitos son organismos con dependencia metabólica, considerándose que tienen un nivel bajo de evolución y dependen de organismos altamente evolucionados. Su dependencia metabólica es a partir de sangre, linfa, alimento citoplasmático, etc. Esto trae como consecuencia enfermedades en el hospedero, por lo tanto se eleva la tasa de mortalidad, o bien se afecta en forma crónica produciendo subdesarrollo y desnutrición que predisponen a otras enfermedades. Los parásitos para su estudio se dividen en tres grupos: **protozoarios**, **helmintos** y **artrópodos**; de estos grupos, los más estrechamente relacionados con la Microbiología son los **protozoarios**, los cuales serán objeto de estudio en este capítulo (Cuadro 9.1).^{1,2,3,4,5,7}

Existen algunas **teorías** acerca del origen de los parásitos, entre las que resaltan la teoría de Moniez, que explica con base en un proceso adaptativo el origen de los parásitos, ya que supone que los parásitos eran organismos de vida libre que al ser ingeridos por el hospedero algunos morían y otros por selección resistieron ese ambiente nuevo y adverso, implantándose y modificándose, con lo que se produjo un fenómeno de selección, y a que perdieron características de vida libre y al ser excretados en las heces debían regresar al hospedero. Otra teoría se basa en la sucesión de especies predominantes como la teoría de Leukart, la cual propone que los parásitos han existido desde el auge de los dinosaurios y han pasado de una especie a otra según se origine y prolifere la especie. Algunas formas de diseminación de los parásitos son a través de fomites, vectores, vehículos, migración del agente, transporte, comercialización de alimentos, etc. Algunos factores son vitales para la presencia de parásitos, tales como: los niveles de oxígeno y dióxido de carbono, la temperatura, la humedad ambiental y el pH.^{1,3,4,6,8}

CARACTERÍSTICAS DE LOS PROTOZOARIOS.

Se conocen 45,000 tipos distintos de protozoarios donde aproximadamente 500 son parásitos y el resto son de vida libre. Los parásitos protozoarios son microorganismos unicelulares eucariontes que viven solos o forman colonias microscópicas y cumplen o desarrollan todas las funciones de un ser superior. Estos parásitos se encuentran con mayor frecuencia en el aparato digestivo, así como en sangre, vísceras y masa muscular. Los parásitos protozoarios generalmente se pueden presentar en dos fases, una de **trofozoito** o vegetativa y una forma **quistica** o estacionaria, y son clasificados de acuerdo a una serie de características: Por su distribución geográfica pueden ser mundiales o locales; de acuerdo a la localización anatómica en el hospedero, pueden ser: **internos o endoparásitos** (extracelular o intracelular), o bien **externos o ectoparásitos**. Según la gama de hospederos que parasita puede ser: **estenoxénico** (parasita una sola especie) y **eurixénico** (parasita a más de una especie). ^{1,2,3,4,6}

PROTOZOARIO

ESTRUCTURA : Célula eucarionte.

TAMAÑO : Mayor a un micrómetro hasta 250 micras o más.

FORMA : Las diferentes formas que existen son en forma redonda, oval, alargada o irregular, puede mostrar simetría o asimetría.

MEMBRANA : Formada de fosfolípidos que contienen algunas proteínas, en forma quística se transforman en paredes compuestas por quitina.

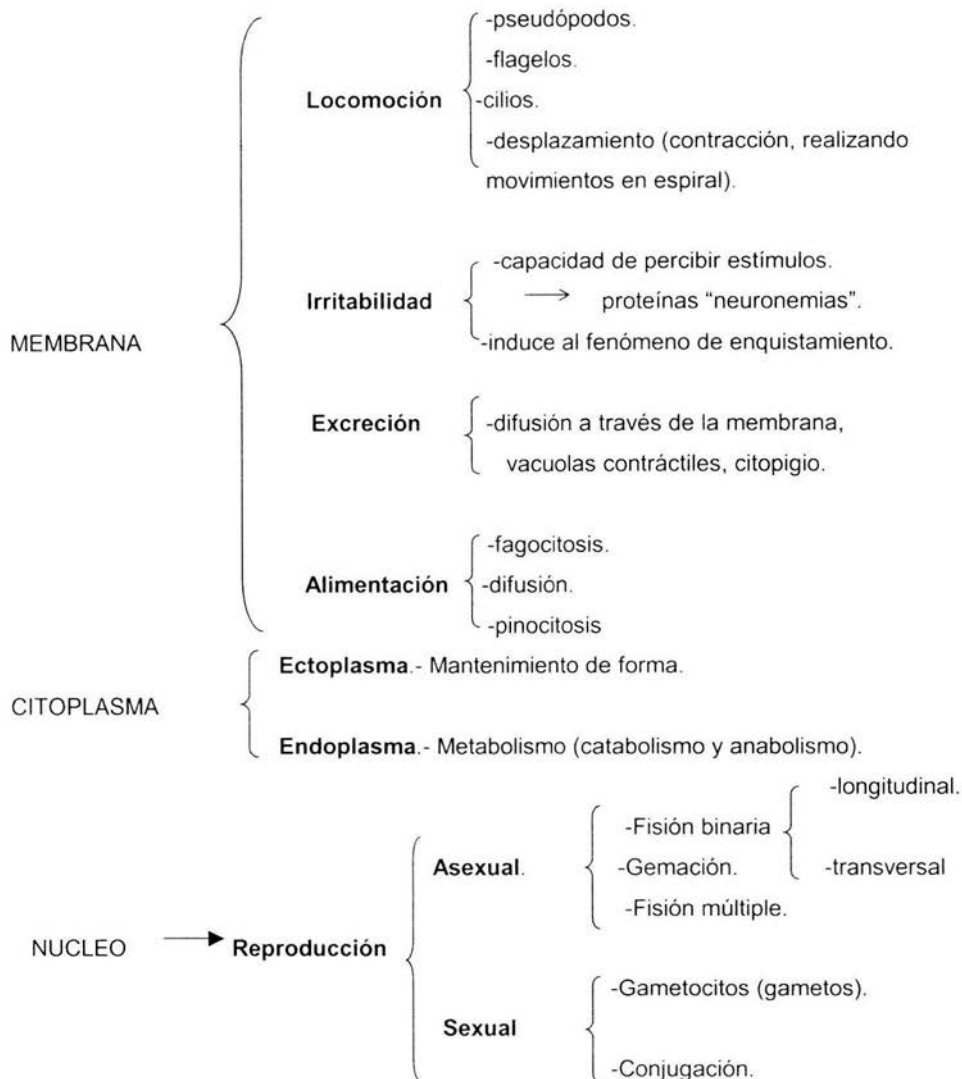
CITOPLASMA : Compuesto por una fase externa con condición de gel llamada ECTOPLASMA y una fase interna acuosa o ENDOPLASMA.

ORGANELOS : Aparato de Golgi, mitocondria, ribosoma, retículo endoplásmico, lisosomas, axostilo, vacuolas contráctiles y núcleo.

NUCLEO : membrana, nucleoplasma y material cromático (condensado: "nucleolo" y disperso: "cariosoma").

Para llevar a cabo sus funciones de desarrollo y diseminación, los parásitos utilizan al máximo cada uno de sus organelos, los cuales son necesarios para desarrollar funciones específicas, entre las que se encuentran: Respiración, irritabilidad, reproducción, excreción, secreción, locomoción, establecimiento de mecanismos de defensa, metabolismo (catabolismo / anabolismo).

Por ejemplo algunas de las funciones de sus organelos son:



Con base en el tipo de reproducción: **monogenético** (sexual o asexual) y **heterogenético** (variación de la reproducción sexual asociada a la asexual). Por la dependencia de hospedero, el parásito puede ser **obligado**, cuando depende al 100% del hospedero; **accidental**, cuando el parásito se adapta a un hospedero diferente al que habitualmente parasita; y **facultativo**, cuando alterna fases de vida libre con la forma parasitaria. De acuerdo a su permanencia en el hospedero, los parásitos pueden ser: **permanentes**, cuando siempre deben estar en el hospedero; o bien **temporales**, cuando sólo pasan determinado tiempo en el hospedero. ^{3,4,7}

Existen diferentes formas o mecanismos de transmisión de los parásitos tales como: la inhalación, ingestión, transmisión perinatal, por contacto directo con piel o mucosas y la sanguínea. Los parásitos como todo ser vivo poseen un ciclo biológico, el cual puede ser básicamente de dos tipos: **directo**, cuando se transmiten de un hospedero definitivo a otro definitivo; e **indirecto**, cuando en el ciclo interviene un hospedero intermediario. Durante su ciclo de vida los parásitos realizan una **migración** en el hospedero para situarse en un lugar definido, de aquí que su migración puede ser **simple**, cuando el parásito se dirige y sitúa en un sólo aparato o sistema del hospedero; o bien **compleja**, cuando pasa por dos aparatos o sistemas del hospedero. ^{1,2,3,4}

Para poder desarrollarse los parásitos se valen de **mecanismos de acción patógena**, entre éstos están: mecanismos **exfoliativos**, los cuales permiten consumir elementos propios del hospedero; **mecánicos**, que provocan obstrucción o compresión de conductos, cavidades u órganos del hospedero; **traumáticos**, ya que pueden lesionar o dañar tejidos del hospedero; **bioquímicos**, produciendo sustancias tóxicas que dañan al hospedero; y finalmente, **inmunológicos**, ya que los parásitos y sus productos de excreción pueden provocar reacciones de hipersensibilidad inmediata o tardía, lo cual provoca desequilibrio en el hospedero. ^{1,3,4,9}

Para la existencia de un parásito se requiere la presencia de un hospedero, el cual le proporcione un medio adecuado de supervivencia, de aquí existen algunos **tipos de hospederos** tales como: **principal** o **primario**, el cual se encarga de alojar inicialmente al parásito y propiciar su desarrollo; **definitivo**, en el cual se desarrollan las fases adultas y la reproducción del parásito; **intermediario**, en el que se desarrollan las fases larvianas o una reproducción asexual; **paraténico**, que puede o no estar en un ciclo biológico; **vector**, alojan al parásito, permiten su reproducción y lo transmiten; **reservorio sano**, es aquel que aloja al parásito, permite su reproducción, lo disemina y no presenta enfermedad alguna; **de transporte**, ya que diseminan al parásito de forma mecánica; y finalmente, **accidental**, aquel que aloja un parásito que no es usual en su especie. ^{1,4,7}

Por otro lado, existen los grados de parasitismo con base en el tipo de daño producido por un parásito y la forma en que actúa, con la posibilidad de presentarse: una **parasitosis**, cuando se produce un daño con manifestaciones clínicas; **parasitiasis**, al existir equilibrio entre el parásito y el hospedero, sin haber daño, ni manifestaciones clínicas; **hiperparasitismo**, cuando un parásito parasita a otro parásito; o bien, **poliparasitismo**, cuando existen varios tipos de parásitos en un hospedero. ^{1,3,7}

CUADRO 9.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE ALGUNOS PROTOZOARIOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA.

Filum	Características de clasificación	Parásitos representativos	Modo de entrada	Manifestación clínica en humano	Muestra de elección para identificación
Sarcocistis	Locomoción por pseudópodos, por flagelos, o ambos	<i>Entamoeba histolytica</i>	Ingestión de quistes	Disenteria amebiana	Heces frescas
		<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vaginal y uretral.	Vulvovaginitis	Exudado vaginal o uretral
phora		<i>Giardia lamblia</i>	Ingestión de quistes	Enteritis y diarrea	Heces frescas
		<i>Tripanosoma gambiense</i> o cualquier especie de <i>tse-tse</i> <i>tripanosoma</i>	Picadura de mosca	Enfermedad africana del sueño	Sangre (extendido)
Ciliophora	Locomoción por cilios	<i>Balantidium coli</i>	Ingestión de quistes	Diarrea recurrente alternada con constipación	Heces frescas
Apicomplexa (Haemosporina)	Locomoción por ondulación (sin organelos especializados). Se reproducen formando esporas en un ciclo de vida complejo.	<i>Plasmodium sp.</i>	Picadura de mosquito <i>Anopheles</i>	Malaria	Sangre (extendido)
		<i>Cryptosporidium sp.</i>	Ingestión de quistes	Enteritis y diarrea	Heces frescas
		<i>Toxoplasma gondii</i>	Ingestión de pseudoquistes en carne, ingestión o inhalación de ooquistes de gatos, cruce de taquizoitos por placenta	Crecimiento de nódulos linfáticos, fiebre, lesiones cerebrales y ruptura fatal de corazón y pulmones en pacientes inmunosuprimidos; severas anomalías en recién nacidos	Biopsia de tejidos
		<i>Pneumocystis carinii</i>	Secreción respiratoria	Pneumonía por <i>P. carinii</i>	Lavados pulmonares o biopsia

Adaptado de Beishir, L. (1996) y Lim, D. (1998)

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE PROTOZOARIOS.

En cuanto a la detección de los parásitos en un hospedero con fines diagnósticos, existen metodologías que permiten evidenciar la presencia de un parásito en una muestra clínica; entre dichas metodologías se encuentran los **inmunoensayos** tales como: floculación, hemaglutinación, aglutinación con látex, inmunofluorescencia, ELISA, Inmunolectroforesis, etc., los cuales se presentan en el Capítulo 12. Sin embargo, existen algunos exámenes **coproparasitológicos** para observar algunas formas parasitarias; dichos exámenes son: ^{4,6,8,10}

Exámenes cualitativos.

- Examen microscópico directo.
- Examen macroscópico directo.
- Examen de concentración por flotación de Willis.
- Examen de concentración por flotación de Faust.
- Examen de concentración por sedimentación: Ritchie.
- Examen de concentración por termotropismo: Baerman.
- Examen de cultivo larvario: Harada Mori, aserrín estéril Corticelli-Lai.

Exámenes cuantitativos.

- Examen por aclaramiento: Kato-Miura.
- Examen por dilución: Stoll.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.

Para poder realizar las pruebas anteriores, es necesario recolectar muestras adecuadas que permitan la detección e identificación de cualquier forma parasitaria, entre las que destacan las muestras de heces, sangre, orina, esputo y tejidos. Las muestras de heces deben recolectarse en un recipiente de boca ancha, limpio, con una tapa bien ajustada. Las muestras de sangre se obtienen con anticoagulante para agregar una gota sobre un portaobjeto y colocar un cubreobjetos sobre la gota para realizar una observación en fresco para la búsqueda de tripanosomas y microfilarias; además con una muestra de sangre periférica se pueden realizar frotis teñidos con colorantes de Wright o de Giemsa; con estas preparaciones se pueden buscar plasmodios intraeritrocíticos. ^{2,4,6}

Hay diferentes tipos de exámenes, sin embargo, en cada examen podemos observar diferentes fases de los parásitos como son trofozoitos, quistes de protozoarios, huevos de helmintos, huevos de nemátodos, huevos de céstodos, etc. De los exámenes más recurridos en una primera

instancia están los exámenes microscópico directo, de concentración de Faust, de Willis y de Ritchie; de éstos se mencionará su objetivo, fundamento, desarrollo e interpretación.^{2,4,6,10}

TECNICA MICROSCOPICA DIRECTA.^{4,6}

Objetivo: Detección de trofozoitos y quistes de protozoarios así como huevos de helmintos.

Fundamento: Se basa en la dilución de una pequeña cantidad de material fecal en solución salina fisiológica, la cual permite la supervivencia de trofozoitos y un colorante que favorece la contrastación de la estructura parasitaria.

Material y Equipo:

- Portaobjetos.
- Microscopio compuesto.
- Solución salina fisiológica.
- Lugol parasitario.
- Cubreobjetos
- Aplicadores de madera.

Desarrollo: En uno de los extremos del portaobjetos se coloca, una gota de solución salina fisiológica y en otro extremo una gota de lugol, con un aplicador de madera se agrega a cada gota una pequeña cantidad de muestra de heces, se homogeniza cada preparación, se retira la mayor cantidad de materia gruesa posible, se colocan cubreobjetos y se revisa al microscopio a 45x.

Interpretación: Siendo una técnica de tipo cualitativo, sólo se reportarán los parásitos encontrados positivos o negativos.

TECNICA DE WILLIS.^{4,6}

Objetivo: Detectar la presencia de quistes de protozoarios y huevos de nemátodos y céstodos.

Fundamento: Por medio de diferencia de densidades, inducir la flotación de estructuras parasitarias.

Material y Equipo:

- Vasos de plástico.
- Cuchara o abatelenguas.
- Asa bacteriológica.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Microscopio compuesto.
- Coladera.

Soluciones y Reactivos.

- Solución saturada de cloruro de sodio al 40% con densidad de 1.18.
- Lugol parasitario.

Desarrollo: Se colocan 2-3 gramos de materia fecal en un vaso de plástico y se adiciona 50-60 mL de solución saturada de cloruro de sodio homogenizando la mezcla, una vez logrado esto se cuele a otro recipiente dejando reposar por un lapso de 15 minutos, pasando este lapso se toma de la superficie una muestra con el asa de platino colocándola sobre un portaobjetos, le adicionamos una gota de lugol se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio.

Interpretación: Se reportan los parásitos encontrados, como positivo o negativo. No se detectan huevos de tremátodos, de *Taenia*, ocasionalmente de *Ascaris*.

TECNICA DE FAUST ^{4,6}

Objetivo: Determinación de la presencia de quistes de protozoarios y huevos de nemátodos y céstodos.

Fundamento: Uso de sustancias de densidad alta que al ponerse en contacto con estructuras parasitarias las hacen flotar por diferencia de densidad.

Material y Equipo

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| - Tubos de centrífuga. | - Portaobjetos. |
| - Varilla de vidrio. | - Cubreobjetos. |
| - Coladera. | - Asa bacteriológica. |
| - Recipientes de plástico o vidrio. | - Centrífuga. |
| - Cuchara o abatelengua. | - Microscopio compuesto. |

Soluciones y Reactivos.

- Solución saturada de sulfato de zinc al 33% con densidad de 1.18
- Agua destilada.
- Lugol parasitario.

Desarrollo: Se colocan 2-3 gramos de material fecal en un recipiente, se le adiciona 10 veces su volumen de agua y se homogeniza, posteriormente se cuele al otro recipiente y se deposita en el tubo de centrifuga, a continuación se centrifuga a 2000 r.p.m. durante un minuto y se decanta el sobrenadante, se resuspende nuevamente con agua y volvemos a centrifugar tirando el sobrenadante, esta operación se repite hasta que el sobrenadante quede transparente, cuando se logró esto, se reconstituye la pastilla con la solución saturada de sulfato de zinc centrifugando nuevamente, terminando el tiempo de centrifugación se adiciona al tubo solución saturada hasta

llenarlo y formar un menisco en la superficie y se deja reposar el tubo por un lapso de 10 minutos, después del cual se toma una muestra con el asa o se le coloca encima del menisco superficial, se le agrega después lugol y se observa al microscopio.

Interpretación: Se reporta los parásitos encontrados dando como positiva o negativa la muestra. Deben tomarse tres muestras de distintos días para obtener el más alto porcentaje de posibilidad de detección, además esta técnica es la más comúnmente utilizada en laboratorio de diagnóstico.

TECNICA DE RITCHIE. ^{4,6}

Objetivo: Determinación de la presencia de quistes de protozoarios y huevos de helmintos.

Fundamento: La gravedad específica de los quistes de protozoarios y huevos de helmintos es mayor que la de la solución salina fisiológica (SSF) y que la de otros solventes, lo cual permite que dichos quistes y huevos sedimenten en el recipiente que los contenga. Dicha sedimentación se favorece cuando se realiza una centrifugación.

Material y Equipo

- Tubos de centrifuga.
- Varilla de vidrio.
- Coladera.
- Recipiente de plástico o vidrio.
- Cuchara o abatelengua.
- Pipeta Pasteur.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Asa bacteriológica.
- Centrifuga.
- Microscopio compuesto.

Soluciones y Reactivos.

- Solución salina fisiológica (SSF).
- Formaldehído 10%.
- Eter etílico.
- Lugol parasitario.

Desarrollo: Se colocan 2-3 gramos de material fecal en un recipiente, se le adiciona 10mL de SSF se homogeniza, posteriormente se cuela a otro recipiente y se deposita en el tubo de centrifuga, a continuación se centrifuga a 2000 r.p.m. durante un minuto y se decanta el sobrenadante, se resuspende nuevamente con SSF y se centrifuga nuevamente, descartando el sobrenadante, esta operación se repite hasta que el sobrenadante quede transparente, cuando se logró esto, se reconstituye el sedimento con 10mL de formaldehído, se mezcla y se deja reposar por 10 minutos, y después se agregan 5mL de éter, se mezcla y se centrifuga 2 minutos a 2000 rpm. El contenido del tubo presentará 4 capas:

- La capa superior corresponde al éter.
- La capa media superior corresponde a restos fecales y grasa.
- La capa media inferior corresponde al formaldehído.
- La capa inferior contiene estructuras parasitarias y rastros fecales.

Con la pipeta Pasteur se toma una muestra del sedimento, colocándolo sobre un portaobjetos, a esta muestra se le agrega una gota de lugol y se le coloca el cubreobjetos para observar al microscopio a 45x.

Interpretación: Se reporta los parásitos encontrados dando como positiva o negativa la muestra. Se presenta cierta dificultad para la detección de protozoarios.

OBJETIVOS

- Conocer algunos conceptos básicos sobre la Parasitología y las principales características de los parásitos protozoarios.
- Conocer las técnicas que actualmente existen para identificar a los parásitos más comunes.
- Familiarizarse con el tamaño, forma y estructura de algunos parásitos protozoarios comunes, mediante su observación al microscopio.

MÉTODO.

1. Observar con el microscopio algunas preparaciones fijas de parásitos protozoarios de los más comunes.
2. Realizarán dibujos representativos de los parásitos observados, entre los que pueden estar, según su disponibilidad en el laboratorio:

Sarcocystis sp.

Giardia lamblia.

Toxoplasma sp.

Leishmania sp.

Trichomonas vaginalis.

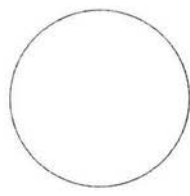
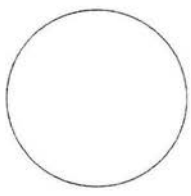
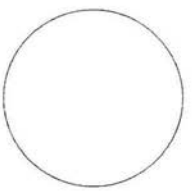
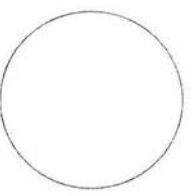
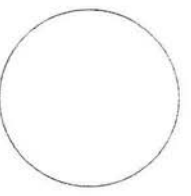
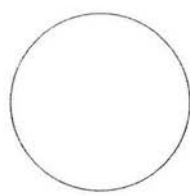
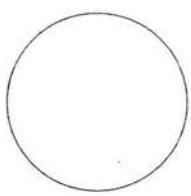
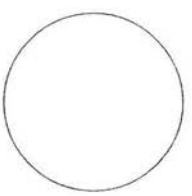
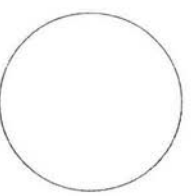
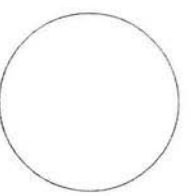
Entamoeba sp.

Tripanosoma sp.

Balantidium sp.

Plasmodium sp.

RESULTADOS Y OBSERVACIONES.

				
<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>
				
<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>	<hr/> <hr/>

ANALISIS DE RESULTADOS.**CONCLUSIONES.****Cuestionario.**

- Defina a un parásito:
- ¿Cómo se clasifica a los parásitos para su estudio?
- Mencione las características de los parásitos protozoarios:
- Mencione las técnicas parasitológicas que conoce:

BIBLIOGRAFIA.

1. Beaver, P. Ch., et al. Parasitología Clínica. Compañía Editorial Salvat. México. (1988) Págs. 3-7, 41-47.
2. Beishir, L. Microbiology in Practice. 6ª edición Addison Wesley Longman Inc. EU. (1996) Págs. 157-164.
3. Botero, D., Restrepo, M. Parasitosis Humanas. 2ª edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. (1992) Págs.3-17.
4. Koneman, E. W., et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1992). Págs. 718-727.
5. Lim, D. Microbiology. 2a. Edición. WCB/McGraw-Hill. EU. (1998). Págs. 373-381.
6. Martínez, L. P. y Morales, M. A. Manual de Laboratorio de Parasitología Médica. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México (1996) Págs. 1-4,17-21.
7. Romero C. Microbiología y Parasitología Humana. Bases Etiológicas de las Enfermedades Infecciosas. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. (1993). Págs. 582-800.
8. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud. Serie Paltex. OPS – OMS. Colombia (1983) Págs. 111-118, 147-167.
9. Volk, W. A. Basic Microbiology. 7ª edición. Harper Collins Publishers. E. U. (1992). Págs. 239-241.
10. Washington, J. A. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. 2ª edición. Springer-Verlag. EU. (1985). Págs. 625-687.

CAPÍTULO No. 10

MICOLOGÍA

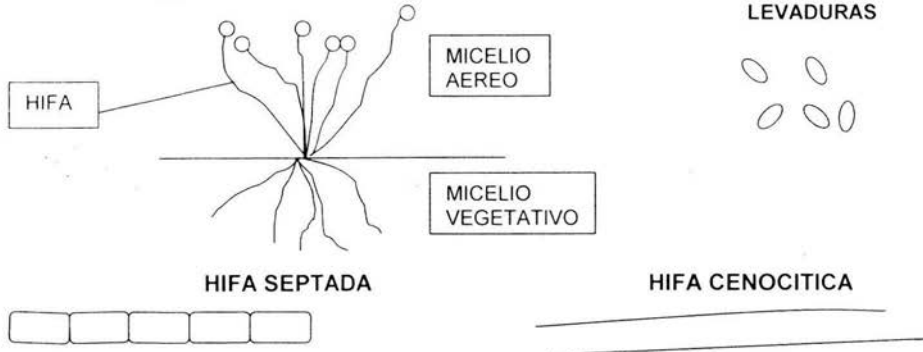
INTRODUCCIÓN

La **Micología** es una de las ramas de la **Microbiología** que se desarrolló primero, desde la invención del microscopio por Leeuwenhoek (1632-1723), iniciándose desde entonces el estudio de los hongos; posteriormente Raymond Sabouraud (1864-1938), el padre de la Micología moderna, inicia el estudio sistemático de las dermatofitosis y publica el primer manual de micología dermatológica. Actualmente, sabemos que los hongos pueden ser **macroscópicos** o **microscópicos**; siendo los de interés en este momento los microscópicos, los cuales se pueden describir como microorganismos unicelulares (**levaduras**) o pluricelulares (**filamentosos**) heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada o en descomposición. Los hongos son eucarióticos y pueden ser filamentosos, levaduriformes, o bien dimórficos (filamento y levadura); carecen de motilidad, su principal hábitat natural es el suelo, son **aerobios**, poseen en su estructura una pared celular y se reproducen por esporas (sexuales y/o asexuales).^{1,3,4,5,13}

ESTRUCTURAS MICÓTICAS.

Los **hongos filamentosos** se pueden describir como una masa de citoplasma multinucleado móvil dentro de un sistema de tubos muy ramificados que lo encierran y están compuestos básicamente por unidades estructurales denominadas **hifas**, las cuales pueden tener divisiones (**septadas**) o no tener divisiones (**cenocíticas**), que al agruparse dan origen a un **talo** o **micelio**, el cual se divide en dos partes, un **micelio vegetativo** y un **micelio aéreo o reproductor**, el primero se encarga de la nutrición y en el segundo se encuentran las estructuras de reproducción. El micelio de acuerdo a su diámetro puede ser **macrosifonado** si mide más de una micra de diámetro o **microsifonado** si mide menos de una micra, también de acuerdo a su pigmentación puede ser hialino si no tiene pigmento o pigmentado si lo tiene. Las **levaduras** pueden formar un micelio conocido como **pseudomicelio** cuando se alargan o se agrupan formando una cadena que imita una hifa o filamento (Figura 10.1).^{1,3,4,14}

FIGURA 10.1 ESTRUCTURAS MICOTICAS
HONGO FILAMENTOSO



CUADRO 10.1 Características de los grupos de hongos.

GRUPO O FAMILIA	REPROD. SEXUAL	REPROD. ASEJUAL	ESPORAS SEXUALES	ESPORAS ASEJUALES	TIPO DE HIFA	EJEMPLO
I.- MASTIGOMICETOS	SI	SI	OOSPORAS	ZOOSPORAS	CENOCÍTICA	<i>Saprolegnia sp.</i> , <i>Rhinosporidium</i>
II.- ZIGOMICETOS	SI	SI	CIGOSPORAS	ESPORANGIO	CENOCÍTICA	<i>Rhizopus nigricans</i> (patógeno), <i>Mucor circinelloides</i>
III.- ASCOMICETOS	SI	SI	ASCOSPORAS	CONIDIAS	SEPTADA	<i>Trichophyton</i> , <i>Microsporium</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Candida sp.</i>
IV.-BASIDIOMICETOS	SI	SI	BASIDIOSPORAS	CONIDIAS	SEPTADA	<i>Cryptococcus neoformans</i> (patógeno), Champiñones.
V.-DEUTEROMICETOS	NO	SI	-----	TALOSPORA	SEPTADA	<i>Epidermophyton</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>

Adaptado de Arenas, R. (1993), Beishir, L. (1996) y Stanier, R. Y. (1986)

REPRODUCCIÓN DE LOS HONGOS.

Los hongos se dividen para su estudio en cinco clases basadas en sus modos de reproducción: **Mastigomicetos**, **zigomicetos**, **ascomicetos**, **basidiomicetos**, estas cuatro también llamadas hongos perfectos porque poseen reproducción sexual y asexual; y **deuteromicetos** u hongos imperfectos, ya que sólo se conoce su reproducción asexual (Cuadro 10.1).^{3,4,5,13}

Las esporas **sexuales** provienen de la unión de gametos y se clasifican en **cigosporas**, **ascosporas** y **basidiosporas**. Las cigosporas se forman por la unión de dos hifas, las ascosporas se forman en un asca o saco como producto de fenómenos meióticos y las basidiosporas se forman en una estructura a manera de bolsa o basidio. Las esporas **asexuales** se dividen en **endosporas** (internas) y **conidias** (externas); las endosporas pueden ser esporas móviles (zoosporas) y esporas inmóviles (esporangiosporas). Las esporangiosporas se encuentran dentro de un saco llamado

esporangio. Las conidias (micro y macroconidias) nacen a partir de conidióforos (célula conidiógena) y pueden ser de siete tipos distintos de esporas: **blastosporas**, **simpodulosporas**, **fialosporas**, **anelosporas**, **porosporas** (dictiosporas), **aleurisporas** y **artrosporas**. Las blastosporas se forman mediante gemación; las simpodulosporas nacen por gemación pero siguen creciendo para dar el aspecto de cien piés; las fialosporas se producen en una célula conidiógena con forma de florero (fiálide); las anelosporas se producen por gemación, primero en la extremidad de la célula conidiógena y después a través de la cicatriz en forma de anillo que deja el conidio precedente; las porosporas o dictiosporas se forman por multidivisión de tipo mural de la célula conidiógena; las aleurisporas se forman por condensación o ensanchamiento citoplásmico y las artrosporas se forman por la fragmentación de hifas. (Cuadro 10.2) (Figura 10.2).^{3,4,13}

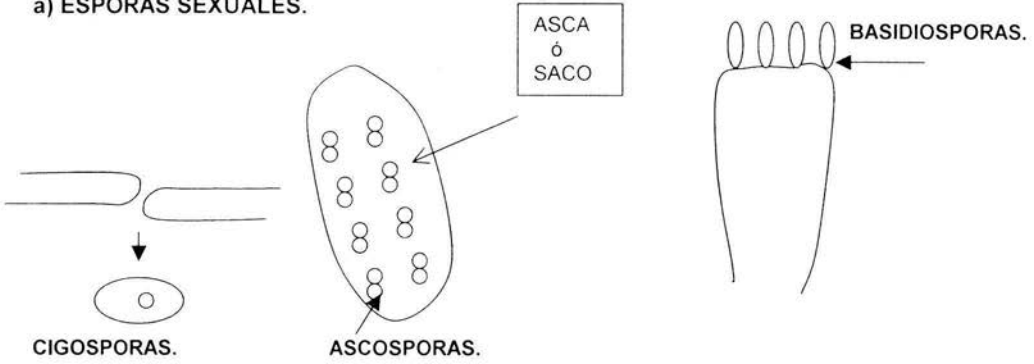
Los hongos pueden ser benéficos y de vital importancia para conservar el equilibrio de la naturaleza, ya que metabolizan casi todos los restos orgánicos, producen humus del suelo, sirven como alimento, se emplean en la fermentación industrial para la producción de cerveza, vino, productos de panadería y quesos, también son útiles en la industria farmacéutica en la producción de antibióticos tales como la penicilina (*Penicillium chrisogenum*) y la cefalosporina (*Cephalosporium acremonium*), así como la producción de hormonas y proteínas recombinantes mediante ingeniería genética. Sin embargo, existen efectos nocivos de los hongos sobre los alimentos al descomponerlos, al producir toxinas y al contener compuestos alucinógenos. Además, existen hongos que tienen importancia médica, ya que producen enfermedad en humanos (**micosis**) y pertenecen principalmente a la clase de los **deuteromicetos**.^{3,4,5,13}

CUADRO 10.2 ESTRUCTURAS MICOTICAS DE REPRODUCCION

Esporas sexuales	Oosporas Cigosporas Ascosporas Basidiosporas						
Esporas asexuales	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 150px;">Endosporas (internas)</td> <td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">}</td> <td style="vertical-align: middle;"> Esporas móviles (zoosporas) Esporas inmóviles (esporangiosporas) </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">Conidias (externas)</td> <td style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">}</td> <td style="vertical-align: middle;"> Blastosporas (<i>Candida</i>, <i>Cladosporium</i>) Simpodulosporas (<i>Sporothrix</i>) Fialosporas (<i>Penicillium</i>, <i>Phialophora</i>) Anelosporas (<i>Scopulariopsis</i>) Porosporas o dictiosporas (<i>Ulocladium</i>, <i>Alternaria</i>) Aleurisporas (<i>Chrysosporium</i>, <i>Trichotecium</i>) Artrosporas (<i>Geotrichum</i>) </td> </tr> </table>	Endosporas (internas)	}	Esporas móviles (zoosporas) Esporas inmóviles (esporangiosporas)	Conidias (externas)	}	Blastosporas (<i>Candida</i> , <i>Cladosporium</i>) Simpodulosporas (<i>Sporothrix</i>) Fialosporas (<i>Penicillium</i> , <i>Phialophora</i>) Anelosporas (<i>Scopulariopsis</i>) Porosporas o dictiosporas (<i>Ulocladium</i> , <i>Alternaria</i>) Aleurisporas (<i>Chrysosporium</i> , <i>Trichotecium</i>) Artrosporas (<i>Geotrichum</i>)
Endosporas (internas)	}	Esporas móviles (zoosporas) Esporas inmóviles (esporangiosporas)					
Conidias (externas)	}	Blastosporas (<i>Candida</i> , <i>Cladosporium</i>) Simpodulosporas (<i>Sporothrix</i>) Fialosporas (<i>Penicillium</i> , <i>Phialophora</i>) Anelosporas (<i>Scopulariopsis</i>) Porosporas o dictiosporas (<i>Ulocladium</i> , <i>Alternaria</i>) Aleurisporas (<i>Chrysosporium</i> , <i>Trichotecium</i>) Artrosporas (<i>Geotrichum</i>)					
Adaptado de Arenas, R. (1993).							

FIGURA 10.2 ESTRUCTURAS MICOTICAS DE REPRODUCCION

a) ESPORAS SEXUALES.



b) ESPORAS ASEXUALES.

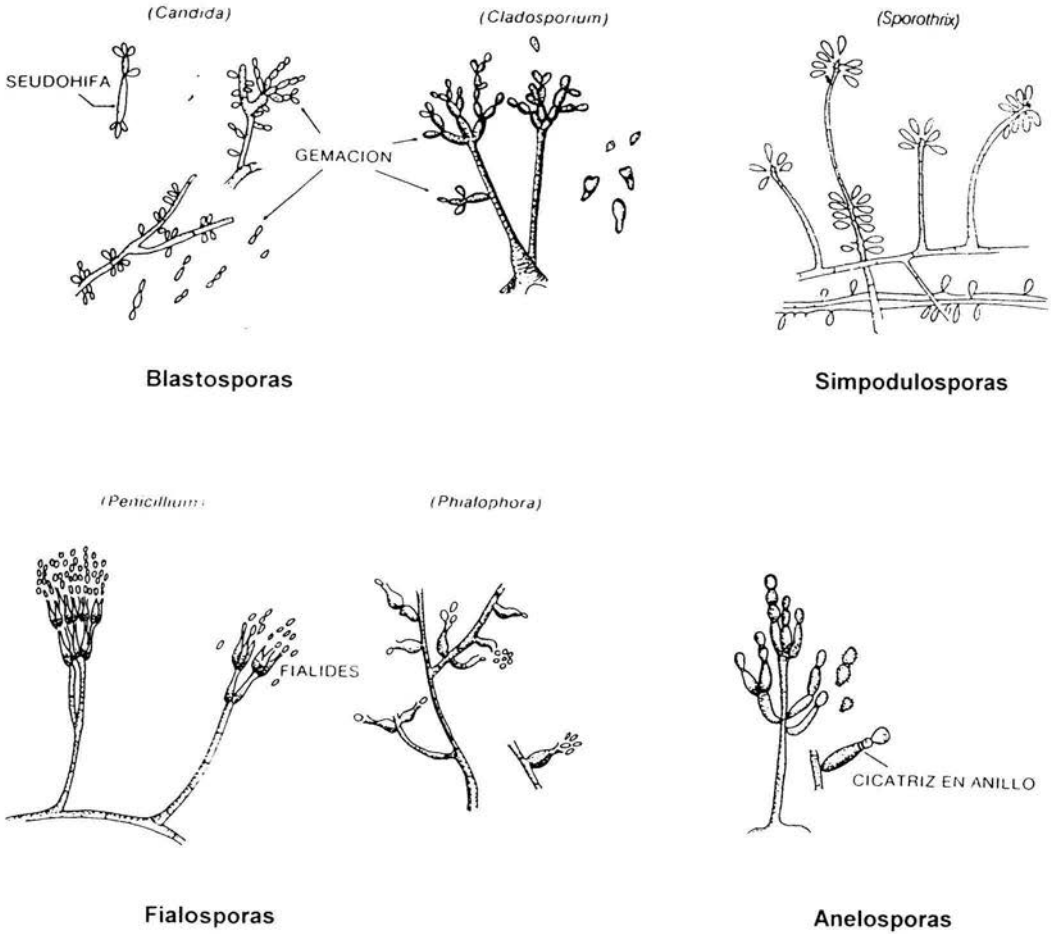
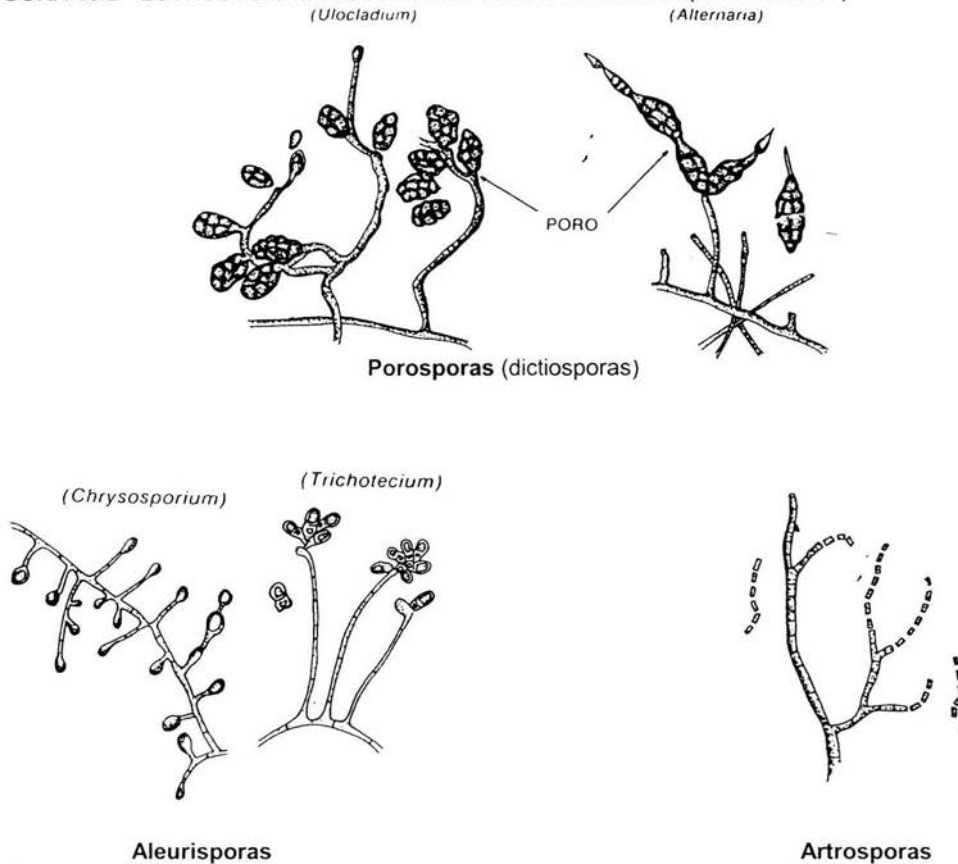


FIGURA 10.2 ESTRUCTURAS MICOTICAS DE REPRODUCCION (continuación)



Las **levaduras** son microorganismos unicelulares 5-10 veces más grandes que las bacterias; pueden ser elipsoidales, esféricas y a veces cilíndricas. Se reproducen en forma asexual por el fenómeno de **gemación** o budding. Algunas levaduras pueden tener reproducción sexual cuando 2 **ascosporas** se conjugan y producen una célula diploide; el núcleo de esta célula se divide por meiosis y produce 4 núcleos haploides (ascosporas), las cuales se pueden volver a conjugan. Algunas levaduras como **Candida albicans** pueden ser patógenas oportunistas y responsables de infecciones urinarias y vaginales (**moniliasis o candidiasis**), así como infecciones en la boca (**algodoncillo**), también se ha documentado meningitis por *Cryptococcus neoformans* en pacientes con SIDA. Los hongos que generalmente poseen una fase parasitaria levaduriforme a 37°C y una saprofítica micelial a 20 ó 25°C filamentosos o viceversa se llaman hongos **dimorfos**.^{2,3,5,12}

MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS HONGOS.

Entre los métodos para el estudio de los hongos microscópicos, se encuentran las tinciones tales como las de **Gram, Giemsa, Papanicolaou** (levaduras) y el **azul de algodón lactofenol** (hongos filamentosos). Además, se cuenta con la posibilidad de realizar cultivos de hongos tanto filamentosos como levaduriformes.^{6,7,13}

Debido a que los componentes estructurales de los hongos filamentosos son difíciles de observar, se emplea una técnica especial para su cultivo y observación al microscopio, con el fin de demostrar los aspectos microscópicos para hacer la identificación definitiva de los hongos filamentosos. Dicha técnica se denomina **microcultivo** y se basa en proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento y la observación de los hongos filamentosos y sus estructuras características in situ, sin deterioro de su morfología. Para el crecimiento del hongo, se inocula un pequeño trozo de medio de cultivo colocado entre un portaobjetos y un cubreobjetos contenidos en una caja Petri a manera de cámara húmeda (Figura 10.3). Una vez obtenido el crecimiento del hongo filamentoso es posible su observación intacta al microscopio a 40x al separar el portaobjetos y el cubreobjetos, y realizar la tinción con azul de algodón lactofenol.^{3,5,7,8,10,11,15}

Por otro lado, las levaduras pueden ser cultivadas en medios selectivos que inhiben o minimicen el crecimiento de bacterias, tales como agar Sabouraud dextrosa (SDA), agar micobiótico y agar biggy. Las levaduras pueden teñirse con la tinción de Gram, observándose con esta última como células levaduriformes de color oscuro que va de café a azul violáceo y por lo tanto se ven Gram positivo. Existen métodos para definir la especie de levaduras con base en sus características fisiológicas, tales como, la utilización o asimilación de nutrientes con carbono o nitrógeno (**auxonograma**), y la fermentación de azúcares cultivando el hongo en medio líquido con un glúcido y un indicador colorido (**zimograma**).^{3,6,7}

OBJETIVOS.

- Conocer los conceptos básicos sobre Micología y las técnicas básicas para el estudio de los hongos.
- Realizar la técnica de microcultivo y la tinción con azul de algodón lactofenol para el cultivo y la observación de un hongo filamentoso.
- Realizar la tinción de Gram para la observación de levaduras.
- Familiarizarse con la morfología y tamaño de hongos filamentosos y levaduras.

MATERIAL Y EQUIPO.

Mechero Bunsen

Pinzas metálicas

Asa bacteriológica en L

Hoja de bisturí estéril

Microscopio óptico

Termómetro

Cajas Petri

Cubreobjetos

Portaobjetos

Pipetas Pasteur estériles

Pipetas graduadas de 10mL estériles

Varilla de vidrio en U o en L

Papel filtro estéril

MATERIAL BIOLÓGICO

Cultivos de hongos en SDA o en agar biggy

Muestras de hongos en alimentos

REACTIVOS

Caja Petri con agar SDA

Caja Petri con agar biggy

Agua destilada estéril

Etanol al 96 %

Formol al 10%

Azul de algodón lactofenol

Colorantes de Gram

 Cristal violeta

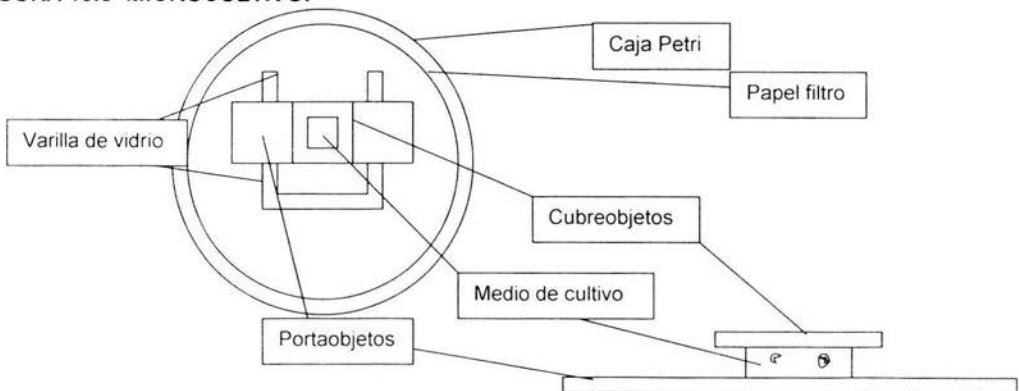
 Lugol

 Alcohol-acetona (50-50)

 Safranina

MÉTODO.**MICROCULTIVO.** ^{3,5,7,8,10,11,15}

1. Trabajar en ambiente estéril mediante un mechero Bunsen.
2. Cortar cuadros de agar SDA de un cm² de la caja Petri con dicho medio. Colocar en una caja Petri estéril un círculo de papel filtro en el fondo y una varilla de vidrio en U o en L.
3. Mojar un portaobjetos y un cubreobjetos con etanol al 96% sujetándolos con unas pinzas para pasarlos por la flama y esperar a que el alcohol se consuma sin alejarlos del mechero.
4. Esperar a que el cubreobjetos y el portaobjetos se enfrien sin alejarlos del mechero y colocar el portaobjetos dentro de la caja Petri y sobre la varilla de vidrio.
5. Colocar sobre el portaobjetos un cuadro de medio SDA previamente cortado, inocular una muestra de cultivo puro de un crecimiento en SDA por picadura con el asa en L en cada lado del medio y cubrirlo con el cubreobjetos (Figura 10.3).
6. Agregar 10 mL de agua estéril con una pipeta graduada estéril para mojar el papel filtro.
7. Incubar varios días (aproximadamente 7) a 25 °C hasta observar desarrollo.
8. Inactivar al hongo, agregando formol al 10% al papel filtro de la caja Petri y dejarlo actuar por 1 hr.
9. Separar el cubreobjetos y colocarlo sobre un portaobjetos al que previamente se le agregaron dos gotas de azul de algodón lactofenol.
10. Desprender el cuadro de medio SDA con crecimiento y agregar al portaobjetos dos gotas de azul de algodón lactofenol y cubrirlo con un cubreobjetos.
11. Observar las preparaciones al microscopio con el objetivo seco débil (10x) y después con el seco fuerte (40x).
12. Localizar el micelio, las hifas y las esporas.
13. Dibujar un campo microscópico representativo de lo observado.

FIGURA 10.3 MICROCULTIVO.

TINCION DE GRAM PARA LEVADURAS. ^{6,7,15}

1. Agregar dos gotas de agua estéril en un portaobjetos.
2. Con un asa previamente flameada tomar una pequeña porción de una colonia de levaduras de un medio SDA o agar biggy y colocarla en el portaobjetos.
3. Homogenizar el frotis y dejar secar al aire.
4. Fijar con calor pasando el portaobjetos por la flama del mechero sin sobrecalentar y dejar enfriar.
5. Agregar cristal violeta cubriendo el frotis y esperar 1 minuto.
6. Lavar con agua corriente.
7. Agregar lugol cubriendo el frotis y esperar 1 minuto.
8. Escurrir el lugol y agregar alcohol - acetona (50-50) por unos segundos.
9. Lavar con agua corriente.
10. Agregar safranina cubriendo el frotis y esperar 1 minuto.
11. Lavar con agua corriente y dejar secar.
12. Agregar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio con el objetivo seco fuerte (40x) y posteriormente con el de inmersión (100 x).
13. Dibujar un campo microscópico representativo de lo observado.

OBSERVACIONES.**CONCLUSIONES.****Cuestionario.**

- a) Mencione las características de un hongo:
- b) ¿Cómo se clasifica a los hongos para su estudio?
- c) Describa las diferencias entre un hongo filamentoso y uno levaduriforme:
- d) Mencione los métodos para el estudio de los hongos:

BIBLIOGRAFIA.

1. Alcamo, I. E. *Fundamentals in Microbiology*. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1991) Págs. 470-485.
2. Alvarez Lucas, C., et al. *Guía para la Atención Médica de Pacientes con Infección por VIH/SIDA en Consulta Externa y Hospitales*. 4ª edición. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CONASIDA). Secretaría de Salud. México. (2000). Págs. 39-42, 94-100, 105-111, 114, 120, 142-144.
3. Arenas, R. *Micología Médica Ilustrada*. Editorial Interamericana / McGraw Hill. México. (1993) Págs. 19-54.
4. Beishir, L. *Microbiology in Practice*. 6ª edición Addison Wesley Longman Inc. EU. (1996) Págs. 143-150.
5. Bonifaz, A. *Micología Médica Básica*. Editorial Méndez Cervantes. México (1991). Págs. 9-28, 443-450.
6. Cappuccino, J. G., Sherman, N. *Microbiology. A Laboratory Manual*. 3ª edición. Benjammin/Cummings. E. U. (1992) Págs. 195-209.
7. Díaz, R., Gamazo, C., López-Goñi, I. *Manual Práctico de Microbiología*. 2ª edición. Editorial Masson. 71-82. España. (1999). Págs. 71-82.
8. Finegold, s. M., Baron, E. J. *Diagnóstico Microbiológico*. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana. México (1989). Págs. 607-681.
9. Singler Lynne. *Microculture*. En Isenberg, H. D. *Clinical Microbiology Procedures Hand Book*. Vol 1. ASM Press. E. U. (1992). Págs. 6.12 .
10. Koneman, E. W., et al. *Diagnóstico Microbiológico*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1992).
11. Koneman, E. W., Roberts, G. D. *Micología Práctica de Laboratorio*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina (1987). Págs. 47-61, 73-101.
12. Romero, C. R. *Microbiología y Parasitología Humana. Bases E tiológicas de las Enfermedades Infecciosas*. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. (1999) Págs. 481-581.
13. Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. *Microbiología*. Ediciones REPLA. México. (1986) Págs. 101-114.
14. Volk, W. A. *Basic Microbiology*. 7ª edición. Harper Collins Publishers. E. U. (1992). Págs. 233-238.
15. Washington, J. A. *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. 2ª edición. Springer-Verlag. EU. (1985). Págs. 519-536.

CAPÍTULO No. 11

VIROLOGÍA

INTRODUCCION

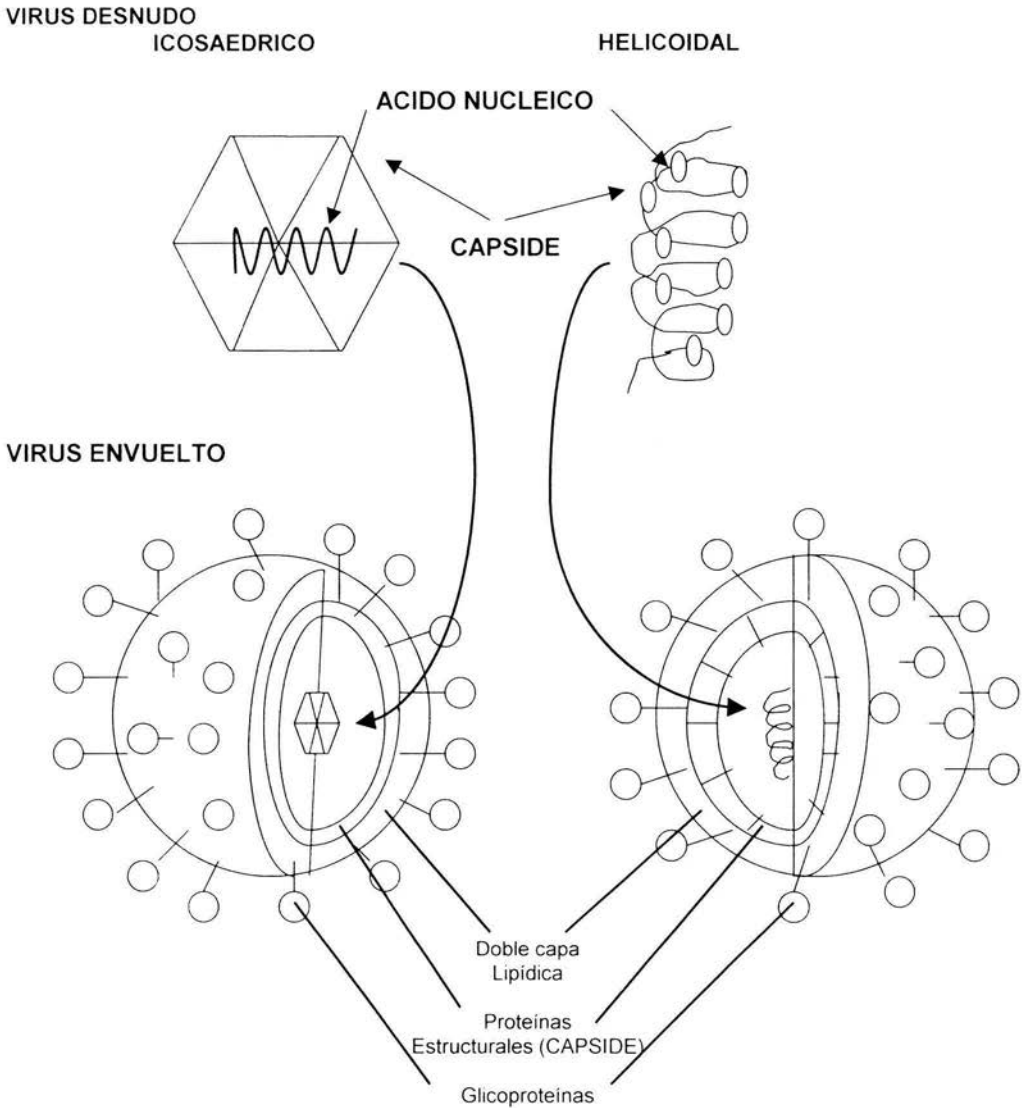
La **Virología** es una de las ramas de la Microbiología ocupada del estudio de los **virus** en general, sin embargo, en el área médica los virus se han relacionado siempre con enfermedades infecciosas, pues los virus son **parásitos** por excelencia; para replicarse necesitan estar a expensas de una célula y por lo tanto son **intracelulares**. Los virus se consideran partículas ultramicroscópicas, ultrafiltrables, ultracentrifugables, capaces de desarrollarse o replicarse en células vivas utilizando su maquinaria biosintética para generar nuevas partículas virales.^{5,6}

ESTRUCTURA GENERAL DE LOS VIRUS.

Los virus están compuestos básicamente por un genoma de un **ácido nucleico (ADN o ARN)** cubierto por una **cápside** de proteínas compuesta por muchas subunidades denominadas **capsómeros**, cuya disposición determina la simetría del virus (**icosaédrica o helicoidal**); algunas partículas poseen una **envoltura** que contiene lípidos y glicoproteínas (Figura 11.1). Estas últimas pueden funcionar como receptores o proteínas de fijación viral capaces de unirse a estructuras de las células hospedero o bien a eritrocitos produciendo el fenómeno de hemaglutinación. Parte de la envoltura de los virus es de naturaleza celular pero antigénica y funcionalmente de origen viral.^{1,5,6}

Algunos virus también contienen las enzimas necesarias para su replicación, como los retrovirus, que poseen una **transcriptasa inversa** que transforma el ARN viral en ADN. Actualmente los virus se clasifican de acuerdo a elementos propios del mismo tales como: el tamaño, la estructura, la clase de ácido nucleico que contienen (ARN o ADN), la simetría de la nucleocápside, si posee o no envoltura, etc. (Cuadro 11.1) Los virus envueltos por lo general son muy sensibles a la bilis, al medio ambiente y a los solventes orgánicos como el éter; ya que su envoltura es de una bicapa de fosfolípidos con proteínas genéticamente codificadas por el virus; por el contrario, los virus desnudos son más resistentes.^{2,5}

FIGURA 11.1 ESTRUCTURA GENERAL DE LOS VIRUS.



REPLICACION VIRAL.

La **replicación viral** se puede resumir en algunas fases: una fase de **adherencia** en la que el virus se fija a la célula hospedero; una fase de **penetración** en la que entra a la célula, lo cual se puede llevar a cabo por una forma de fagocitosis (**viriopexis**) en los virus desnudos, o bien por fusión

de membranas (**budding**) en el caso de virus envueltos; una fase de **desnudamiento** en donde se realiza la liberación del genoma dentro de la célula; una fase de **eclipse** (transcripción temprana y tardía), donde se da toda la síntesis de macromoléculas que forman el virus; una fase de **ensamble**, cuando se unen todos los componentes del virus y finalmente, una fase de **liberación** del virus, donde sale de la célula para dirigirse a infectar otra célula (Figura 11.2).⁶

Como ya se mencionó, los virus son parásitos intracelulares obligados, de aquí que el parasitismo viral se puede clasificar en productivo lítico, productivo no lítico, persistente y transformante.

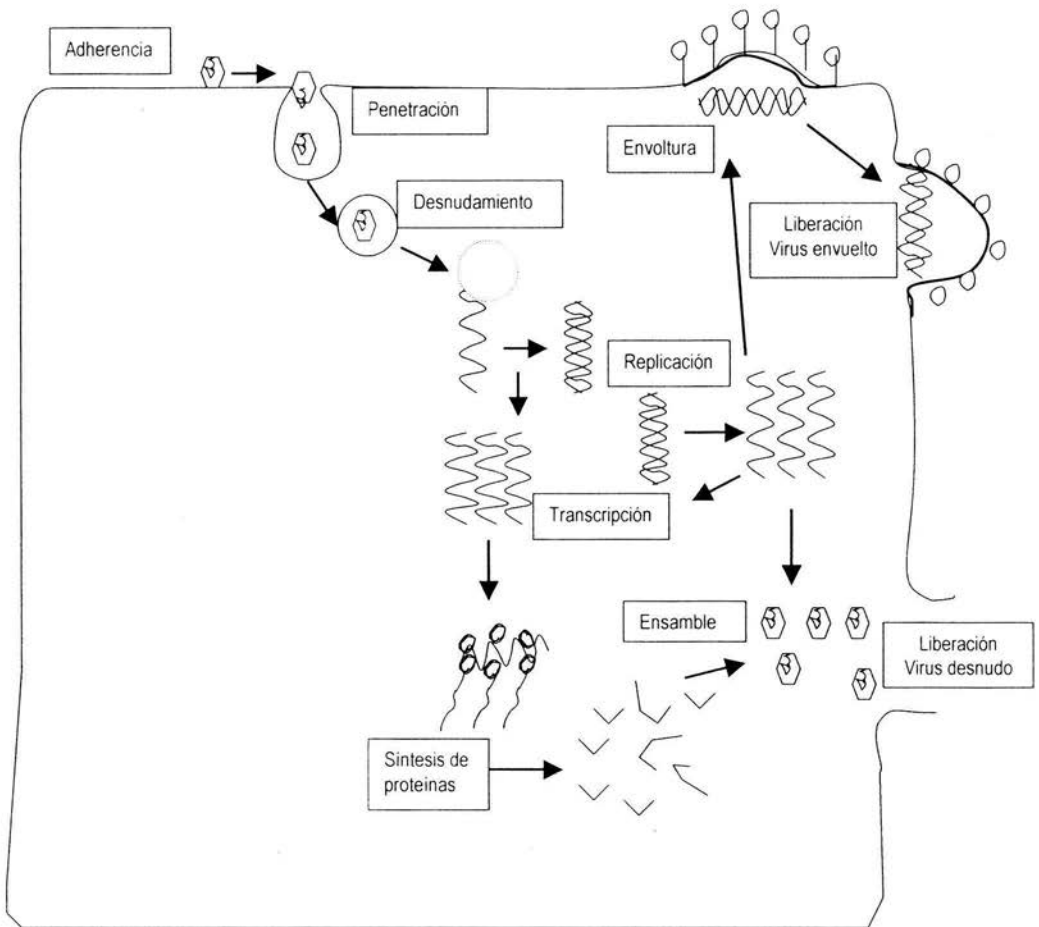
El **parasitismo productivo lítico** consiste en la replicación de los virus dirigiendo la totalidad de la maquinaria biosintética celular para la formación de nuevos viriones y durante su salida de la célula, la lisan destruyéndola por completo; la mayoría de estos virus son icosaédricos desnudos (familia Picornaviridae).

El **parasitismo productivo no lítico** consiste en la coexistencia del virus y la célula hospedero; la mayoría son helicoidales envueltos (familias Paramixoviridae y Ortomixoviridae), ya que poseen una envoltura similar a la membrana celular pero con antígenos virales.

El **parasitismo persistente** pertenece a un grupo limitado de virus y se subdivide en **latente recurrente** (familia Herpesviridae – la infección se vuelve latente en ganglios linfáticos y la enfermedad se repite periódicamente), **lento** (familia Retroviridae – su periodo de incubación dura varios años) y **crónico** (Virus de la hepatitis B – la infección se vuelve crónica). En este tipo de parasitismo el virus infecta, se replica y causa la enfermedad, pero el virus permanece o persiste por toda la vida del individuo. Es importante mencionar que, existen factores tanto virales como del hospedero que influyen en la persistencia viral; entre los factores virales se encuentran la incapacidad de los virus para salir de las células infectadas por la formación de virus defectuosos debido a mutaciones durante su replicación, y la disminución de la virulencia por efectos inmunológicos. Los factores del hospedero se dan por una pobre producción de interferón (IFN) y por un sistema inmunológico humoral y celular deficiente, por ejemplo en el SIDA.^{4,5,6,8}

Finalmente, el **parasitismo transformante** se produce cuando el virus incorpora su ácido nucleico al de la célula y activa oncogenes ya presentes (Virus del herpes, retrovirus y virus del papiloma humano) iniciando la formación de tumores cancerígenos.^{5,6}

FIGURA 11.2 ESQUEMA GENERAL DE LA REPLICACION VIRAL.



CUADRO 11.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE VIRUS CON IMPORTANCIA MÉDICA.

GRUPO / CARACTERÍST. FAMILIA	PICORNAVIRUS	ORTOMIXOVIRUS	PARAMIXOVIRUS	RABDOVIRUS	TOGAVIRUS	RETROVIRUS	ADENOVIRUS	HEPADNAVIRUS	HERPESVIRUS
TAMANO	Picornaviridae (RNA) filamento único. 22-30 nm esférico 60 subunidades	Ortomixoviridae (RNA) filamento único. 100 nm esférico o pleomórfico	Paramixoviridae (RNA) filamento único. 150-300 nm, esférico o pleomórfico	Rabdoviridae (RNA) filamento único. 50-95 X 130-390 nm, en forma de bala	Togaviridae (RNA) filamento único. 40-70 nm	Retroviridae (RNA) filamento único. 80-100 nm, esférico	Adenoviridae (DNA) doble filamento 70-90 nm	Hepadnaviridae (DNA) doble filamento 42 nm	Herpesviridae (DNA) doble filamento 100-200 nm
SIMETRÍA	Icosaédrica	Helicoidal	Helicoidal	Helicoidal	Icosaédrica	Helicoidal	Icosaédrica	Cúbica	Icosaédrica
ENVOLUTURA	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
GENERO/ TIPOS	Enterovirus Poliovirus 1,2,3 Coxsackievirus A Coxsackievirus B Echovirus Enterovirus Virus de la hepatitis A Rhinovirus	Influenzavirus Virus A y B de la influenza Sin nombre Virus C de la influenza	Morbilivirus Virus del sarampión Pneumovirus Virus respiratorio sincicial (VRS) Paramixovirus Parainfluenzavirus (1 a 4) A, B, C y D, Virus de la Parotiditis	Vesiculovirus Virus de la Estomatitis vesicular (VSV) Lyssavirus Grupo B de la rabia	Alivirus Grupo A de Arbovirus Flavivirus Arbovirus Rubivirus Virus de la Rubéola	Lentivirus Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1, VIH-2)	Mastadenovirus Adenovirus	No establecido Virus de Hepatitis B Virus de Hepatitis C	Alfaherpesvirinae Virus del herpes simple 1 y 2 (VZV) Virus de la varicela-zoster (VZV) Betaherpesvirinae Citomegalovirus (CMV) Gammaherpesvirinae Virus de Epstein-Barr (VEB)
ANTIGENOS	Hemaglutinina (H), neuraminidasa (N)	P. ej., para el VIH Gp120, Gp41, p24	Fibra (IV), hexones (VI/II) y pentones (III)	Core (HBCAg), Superficie (HBSAg) Temprano (HBeAg)
HABITAT NATURAL	Virus gastrointestinales y respiratoria	Humanos y algunos animales	Humanos	Animales domésticos, silvestres y humanos	Animales pequeños, insectos y humanos	Humanos	Humanos, ratas y ratones.	Humanos	El hombre y algunos animales
DISTRIBUCION	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial
TRANSMISION	Fecal-oral, de persona a persona o por agua contaminada Aerosol (rinovirus)	Aerosoles, de persona a persona	Aerosoles, de persona a persona, gotas e inoculación directa.	Secreciones infelicitantes, generalmente por mordedura.	Por picadura del vector, secreciones, aerosoles, transplacentaria.	Sexual, parenteral por sangre y derivados, perinatal.	Respiratoria, fecal-oral y sexual.	Vía parenteral, sexual, intrauterina, secreciones, sangre y derivados.	Por secreciones orales o genitales, sangre y transplacentaria.
ROUTA DE INFECCION	Gastrointestinal Respiratoria	Respiratoria	Respiratoria	Cutánea o respiratoria	Cutánea, respiratoria y transplacentaria	Sexual, parenteral e intrauterina.	Respiratoria y gastrointestinal	Sexual, parenteral e intrauterina.	Respiratoria, cutánea, intrauterina, transplacentaria.
ENFERMEDAD	Enfermedad febril, Paralisis flaccida Meningitis, encefalitis, miocarditis Resfriado común (rinovirus)	Coriza, traqueobronquitis, neumonía	Sarampión, traqueobronquitis, neumonía, parotiditis pancreatitis, orquitis, meningitis	Encefalitis (rabia) Estomatitis vesicular.	Hepatitis, meningitis encefalitis, artritis, fiebre, exantema, infección congénita	Síndrome de inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)	Faringitis, fiebre faríngea, conjuntival, querato- conjuntivitis, diarrea infantil, cistitis	Sexual, parenteral e intrauterina. Hepatitis B, C, D y E, carcinoma hepático, carcinoma hepático	Respiratoria, cutánea, intrauterina, transplacentaria. CMV, Sepsis neonatal faringitis, cervicitis, lesiones cutáneas, neumonía VZV exantema, faringitis VEB mononucleosis, hepatitis.

Adaptado de Escobar, G. A., et al. (1995) y Koneman, E. W. (1992)

MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS VIRUS.

Para el estudio de los virus se dispone de herramientas tales como la **microscopía electrónica**, el **cultivo de los virus en embriones de aves**, en **animales de laboratorio** y en **cultivos celulares**. Sin embargo, estas metodologías no son aplicables en laboratorios comunes, donde se requiere la identificación de los virus con fines diagnósticos; en este caso lo que se emplea como alternativa es la identificación de los componentes virales en los sujetos infectados, o bien la presencia de anticuerpos específicos contra dichos componentes, así como antígenos virales mediante **inmunoensayos**. Además, en la actualidad se cuenta con pruebas de biología molecular para la detección del ácido nucleico viral, como la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, que por sus requerimientos de costo e infraestructura aún no son aplicables a gran escala.^{1,2,3,5,7}

CULTIVO DE VIRUS.

Para poder cultivar un **virus en embriones de aves** (pollo o ganso), es necesario preparar las muestras para concentrarlas y se emplean antibióticos para evitar la contaminación bacteriana; los embriones son de 9 a 11 días de edad (Figura 11.3) y pueden ser inoculados por diferentes rutas o vías de inoculación entre las que se encuentran, la vía amniótica, la alantoidea, la embrionaria, la corioalantoidea y el saco vitelino. Las inoculaciones se realizan en medio estéril y los embriones se observan por varios días identificando los signos de enfermedad y/o muerte del embrión (Figura 11.4).^{1,4,8}

La **inoculación en animales de laboratorio** se realiza en la especie más adecuada según convenga y por la vía de inoculación que asegure una infección efectiva y la existencia de un control estricto sin que haya interferencias por otros agentes infecciosos. Entre los animales más empleados destacan el ratón, conejo, cobayo y equinos; empleando principalmente las vías intracerebral, subcutánea, intraperitoneal, respiratoria y gástrica.^{1,4,8}

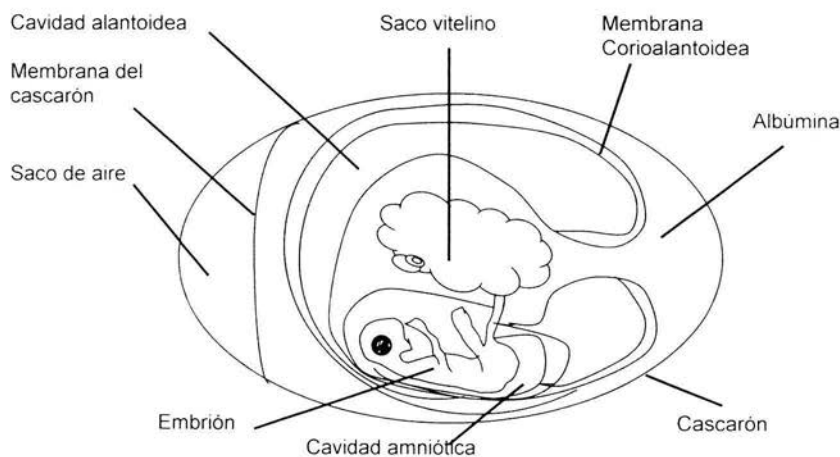
El aislamiento de los virus en **cultivos celulares** se realiza in vitro, cultivando células disociadas que se pegan a superficies de vidrio o de plástico en condiciones de esterilidad y empleando medios de cultivo con los nutrientes necesarios para la multiplicación de las células, para que éstas puedan ser infectadas con el virus correspondiente. Existen tres tipos de cultivos celulares: el **cultivo primario**, el **cultivo de células diploides o cepas celulares** y las **líneas celulares**.^{3,4}

El **cultivo primario** se compone de células recién extraídas de un tejido u órgano (embriones completos, riñón o pulmón) por medio de métodos enzimáticos para disgregarlas y obtener un

monoestrato celular; pueden mantenerse vivas por un tiempo limitado y resisten uno o dos subcultivos o pases celulares. Las **cepas celulares** consisten en células con carácter diploide adaptadas a un medio de cultivo, soportan no más de 70 pases celulares y se emplean principalmente en la elaboración de vacunas. Las **líneas celulares** son células heteroploides que soportan pases indefinidos, provienen de tejidos normales (células VERO – riñón de mono verde africano, CHO – ovario de hamster chino, PK15 – riñón porcino pase 15) o generalmente de neoplasias epiteliales (células HeLa - tumor cérvico uterino humano, Hep2 – carcinoma laríngeo humano).²

Las células de cultivos celulares se conservan en botellas de vidrio o de plástico en condiciones de esterilidad y cuando se obtiene un crecimiento del 100 % o confluyente, las células se disocian con tripsina y se siembran en botellas, tubos o microplacas para posteriormente ser inoculados con el virus correspondiente.²

FIGURA 11.3 ESTRUCTURA DEL EMBRION DE POLLO DE 9 A 11 DIAS DE EDAD.



OBJETIVOS.

Adquirir los conocimientos generales a cerca de la Virología y su enfoque actual.

- Realizar la multiplicación de un virus mediante la inoculación de un embrión de pollo por diferentes vías.
- Realizar la prueba de hemaglutinación para la titulación del virus de Newcastle después de la cosecha del mismo.
- Preparar un cultivo celular primario a partir de fibroblastos de pollo.

MATERIAL Y EQUIPO.

Ovoscopio
Pinzas y tijeras de disección estériles
Recipientes para desechos
Cajas Petri
Charolas porta huevos
Jeringas de 1 mL con aguja de 25 X 16
Jeringas de 1 mL con aguja de 22 X 32
Jeringas de 1 mL con aguja de 27 X 13
Torundas de algodón
Esmalte de uñas
Perforador
Lápiz
Bombilla o perilla
Tubos de centrifuga
Baño de hielo
Microplaca de titulación con 96 pozos
Microdiluctor o micropipeta de 50 μ l
Puntas para micropipeta
Bisturi
Clip en forma de gancho
Jeringa de 10 mL sin aguja
Matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapón de rosca
Botellas para cultivo celular con tapón de rosca
Mechero Bunsen
Microscopio invertido

REACTIVOS.

Alcohol al 70%

Solución salina fisiológica (NaCl al 0.9 %) estéril (SSF)

Tripsina al 0.025 % en PBS

PBS adicionado con antibióticos

MATERIAL BIOLÓGICO.

Embriones de pollo de 9 a 11 días de edad.

Vacuna de la viruela aviar activo

Vacuna del virus de Newcastle activo

Globulos rojos de pollo al 0.5 % en SSF

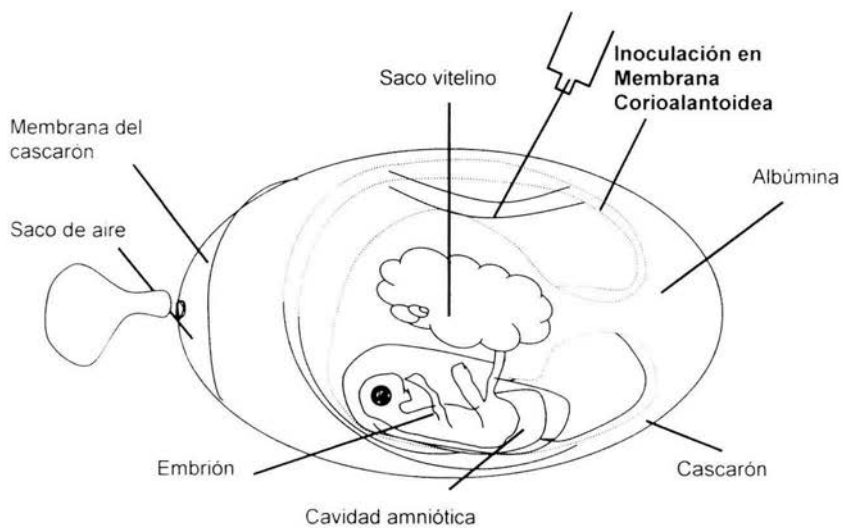
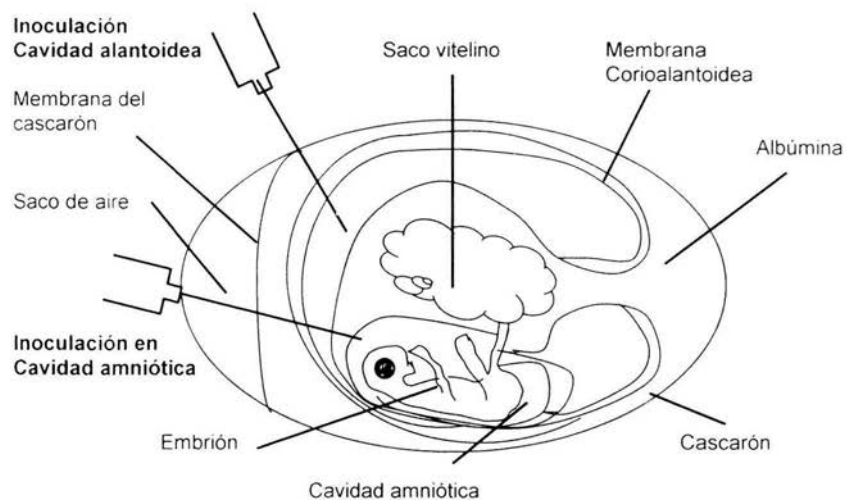
METODO**MULTIPLICACIÓN DE UN VIRUS EN EMBRION DE POLLO (EP).^{1,4,7}**

- a) Examinar el EP con el ovoscopio (Detectar viabilidad por los movimientos, por la irrigación y por la localización del ojo).
- b) Marcar la localización del EP y de la cámara de aire con lápiz (Figura 11.3).
- c) Desinfectar completamente el cascarón con alcohol al 70%.
- d) Mantener el área estéril con la flama de un mechero.

INOCULACION DE VIRUS POR DIFERENTES VIAS.^{1,4}**Cavidad alantoidea (CA).**

1. Sobre la cámara de aire cerca de la base y opuesto al embrión, insertar la aguja de la jeringa que contenga el virus de Newcastle aproximadamente 1cm (Figura 11.4).
2. Inocular de 0.1 a 0.2 mL de la vacuna del virus de Newcastle activo.
3. Retirar la aguja y sellar la perforación con el esmalte de uñas.
4. Incubar el embrión a 32 °C durante 4 días.
5. Verificar la viabilidad del embrión a las 16, 18 y 24 horas para descartar la muerte por traumatismo.
6. Observar los embriones durante los siguientes días hasta completar el tiempo requerido.
7. La multiplicación del virus se puede verificar por la muerte del embrión a los 4 días o por una prueba de hemaglutinación empleando como muestra el líquido alantoideo rico en virus, el cual tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos.

FIGURA 11.4 VIAS DE INOCULACIÓN EN EL EMBRION DE POLLO DE 9 A 11 DIAS DE EDAD.



Membrana corioalantoidea (MCA).^{1,3,4}

1. Perforar la cámara de aire.
2. Succionar con bulbo o perilla en el orificio de la cámara de aire para formar una cámara de aire artificial sobre la MCA (Figura 11.4).
3. Perforar el sitio de inoculación opuesto al embrión y donde se identifica claramente el desarrollo de vasos sanguíneos (Figura 11.4).
4. Introducir ligeramente la aguja de 27 X 13 con el bisel hacia abajo y depositar el inóculo (0.1 a 0.2 mL) del virus de la viruela aviar sobre la MCA.
5. Balancear suavemente el huevo para distribuir el inóculo.
6. Sellar con esmalte de uñas primero el punto de inoculación y después el de perforación sobre la cámara de aire.
7. Incubar en posición horizontal a 37 °C durante 3 días.
8. Verificar la viabilidad del embrión a las 16, 18 y 24 horas para descartar la muerte por traumatismo.
9. Observar los embriones durante los siguientes días hasta completar el tiempo requerido.
10. La infección del virus se manifiesta por la presencia de pústulas en la MCA.

COSECHA DE VIRUS DE LÍQUIDO ALANTOIDEO.^{1,4}

1. Examinar el EP con el ovoscopio (Detectar viabilidad por los movimientos, por la irrigación y por la localización del ojo)
2. Marcar la localización del EP y de la cámara de aire con lápiz.
3. Enfriar los embriones a 4 °C durante 12 horas.
4. Desinfectar el área que cubre la cámara de aire.
5. Remover el casquete que cubre la cámara de aire y las membranas del cascarón y corioalantoidea con las pinzas y las tijeras estériles.
6. Con las pinzas estériles retirar a un lado el embrión.
7. Con una jeringa y aguja estériles aspirar el líquido alantoideo y depositarlo en un tubo estéril.
8. Centrifugar el líquido obtenido a 1500 rpm durante 10 minutos.
9. Separar el sobrenadante en otro tubo estéril y congelar hasta su uso en volúmenes de 0.5 mL.

COSECHA DE VIRUS DE MCA.^{1,4}



1. Seleccionar embriones vivos inoculados en la MCA y enfriarlos a 4 °C durante 12 horas.
2. Desinfectar el cascarón y removerlo a nivel de la falsa cámara de aire.
3. Con pinzas y tijeras estériles retirar la MCA y depositarla en una caja de Petri estéril.
4. Buscar la presencia de pústulas y contarlas en un fondo oscuro para calcular las unidades formadoras de placas por mL de virus inoculado.

- Para cosechar el virus, lavar la membrana con SSF estéril depositando el líquido en tubos estériles.
- Centrifugar si es necesario y congelar en volúmenes de 0.5 mL hasta su uso.

TITULACION DE COSECHA DE VIRUS MEDIANTE HEMAGLUTINACION. ^{1,5}

- Preparar diluciones dobles de la cosecha de virus del líquido alantoideo (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, ..., 1:2048) mediante mezclado y transferencia en una microplaca de titulación con 96 pozos, de acuerdo al esquema siguiente:

Pozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	Testigo
Agregar: SSF (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Cosecha de virus (µl)	50											
		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
												Desechar
Glóbulos rojos de pollo (50 µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

- Incubar a 4 °C durante 30 minutos.
- Realizar la lectura, observando el fondo de los pozos en busca de una malla usando un espejo o de un botón  obteniendo un resultado positivo o un resultado negativo, respectivamente y el resultado se reporta. 

PREPARACION DE UN CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE EMBRION DE POLLO. ²

- Examinar el EP con el ovoscopio, verificando su viabilidad.
- Desinfectar el cascarón con alcohol al 70 %.
- Retirar el casquete de la cámara de aire.
- Con un clip en forma de gancho previamente desinfectado por flameado, sacar el embrión y colocarlo en una caja Petri estéril.
- Cortar alas, patas y cabeza, y enjuagar el tronco con PBS estéril en un vaso de precipitados.

6. Colocar el cuerpo del EP en una jeringa de 10 mL sin aguja, quitando previamente el émbolo y volviéndolo a colocar.
7. Vaciar la masa celular en un matraz de 125 mL con 10 mL de Tripsina al 0.025 % y agitar durante 10 minutos en baño de hielo sin formar espuma.
8. Colocar el matraz en forma inclinada y dejar reposar hasta retirar el sobrenadante.
9. Agregar 20 mL de medio de cultivo, filtrar con gasas y recibir en tubos de centrifuga.
10. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
11. Descartar el sobrenadante y lavar con PBS repitiendo la centrifugación.
12. Resuspender en 3 mL de medio de cultivo y pasar a una botella con 10 mL de medio
13. Incubar en posición horizontal a 37 °C y revisar diariamente con un microscopio invertido.

OBSERVACIONES.

ANALISIS DE RESULTADOS.

CONCLUSIONES.

Cuestionario.

- a) ¿Qué es un virus?
- b) Ilustre la estructura general de los virus, tanto envueltos como desnudos?
- c) Mencione los principales métodos para el estudio de los virus:
- d) ¿Qué tipo de pruebas de identificación viral se emplean más comúnmente con fines diagnósticos?

BIBLIOGRAFIA.

1. Barrón Romero, B. L., et al. Manual de Prácticas del Laboratorio de Virología. 2ª edición. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. (1995) Págs. 9-66.
2. Bird, B. R. y Forrester, F. T. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control. E.U. (1981) Págs. 11-13, 21-32, 81-99.
3. Cunninham, C. H. Virología Práctica. 6ª edición. Editorial Acribia. España. (1971) Págs. 44-144.
4. Escobar, G. A.; et al. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen 1. I.N.D.R.E.-Secretaría de Salud. México. (1995) Págs. VIR5-VIR11, VIR13-VIR30.
5. Koneman, E. W., et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1992). Págs. 769-837.
6. Murray, P. R., et al. Microbiología Médica. Editorial Mosby. (1994) Págs. 439-480.
7. Rovozzo, G. C. y Burke, C. N. A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice-Hall. E. U. (1973) Págs. 17-125
8. Zárate, A. M. L., et al. Manual de Diagnóstico de la Red de Laboratorios de Enfermedades Febriles Exantemáticas. Publicación Técnica No. 21. I.N.D.R.E.- Secretaría de Salud. México. (1993) Págs. 29-52, 58-67, 76-82.

CAPÍTULO No. 12

INMUNOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

Dentro del estudio de la Microbiología se encuentra la **Inmunología** como una de sus ramas, la cual creció fuera del estudio de las enfermedades infecciosas y de las respuestas del organismo a ellas. Hace aproximadamente 2 siglos, un médico inglés llamado Edward Jenner extendió el concepto de **contagio** como un estudio de la **inmunidad** producida en el hospedero, es decir, un estudio de la respuesta de un organismo completo a la infección, y con esto se fundan las bases para el comienzo de la **Inmunología**. Al transcurrir el tiempo se llegó progresivamente a un estudio más básico, pasando a través de fases de énfasis en serología, inmunología celular, inmunología molecular e inmunogenética. Al mismo tiempo, la inmunología ha crecido abarcando muchos campos tales como alergia, inmunología clínica, inmunoquímica, inmunopatología, inmunofarmacología, inmunología tumoral, transplantes y autoinmunidad. ^{4,11,12,14}

De acuerdo a lo anterior, la inmunología se dedica al estudio de la **inmunidad**, que se refiere a la exención de enfermedad, a la protección contra algo extraño, o bien, a la susceptibilidad o resistencia de un cierto individuo a lo extraño, por ejemplo la protección contra un microorganismo patógeno. Para que exista la inmunidad es necesaria la participación del **sistema inmune (SI)** como el conjunto de componentes y mecanismos de un ser vivo para estar protegido contra algo extraño a su organismo. ^{2,4,11,12}

MECANISMOS DE PROTECCIÓN.

Existen estados patológicos producidos por agentes infecciosos que dependen de la interacción del agente etiológico, del **SI** del individuo u hospedero y del medio ambiente. Para el estudio del **SI** es necesario separarlo en tres fases: 1) una inmediata, inespecífica y no inducible; 2) otra inespecífica, pero que es inducible y sin memoria, y finalmente 3) otra que es específica, inducible y con memoria. Esta última fase se refiere a lo que se denomina la **respuesta inmune (RI)** y su resultado varía de un hospedero a otro, según diferencias en su genética, edad, sexo, la calidad y cantidad de su nutrición, su estado fisiológico y de patologías concomitantes tales como el SIDA (Cuadro 12.1). ^{2,3,4,10,11,12,15,18}

La fase **inmediata, inespecífica y no inducible** corresponde a la resistencia natural, siendo inespecífica porque los mecanismos involucrados actúan igual ante una amplia gama de agentes

infecciosos por medio de moléculas y células normalmente presentes en los fluidos y tejidos de un individuo, de aquí que su participación es inmediata ante la presencia del agente (Cuadro 12.1).^{2,4,12}

En la fase **inespecífica, inducida y sin memoria**, el agente mismo o sus componentes activan mecanismos moleculares normalmente inactivos (complemento, coagulación, fibrinólisis) o células (cebadas, endoteliales, leucocitos, células NK, fibroblastos), con lo cual aparecen otras moléculas que actúan directamente o son mediadoras y amplificadoras de otros procesos (fiebre, inflamación, fagocitosis, citotoxicidad); sin embargo, el tiempo de aparición de esta fase y su magnitud son los mismos independientemente del tipo y la ocasión en que se presente el agente inductor, por lo que también carece de memoria (Cuadro 12.1).^{1,4,8,11,12}

La fase **específica, inducida y con memoria**, corresponde a la respuesta inmune (RI) como un proceso que se induce por la presencia de componentes (**inmunógenos – “antígenos”**) del agente infeccioso, siendo mediada por moléculas que se combinan específicamente (**anticuerpos**) con el inmunógeno inductor, por células que matan a otras (**citotoxicidad celular**) y por moléculas activadoras de funciones celulares (**citocinas**). La **RI** tiene memoria porque el contacto subsecuente con el mismo inmunógeno provoca una respuesta más rápida y de mayor magnitud (**respuesta secundaria**) y es transferible porque sus elementos efectores (anticuerpos o citocinas) pueden ser separados del individuo que los produjo (donador) y continuar funcionales al introducirse a otro individuo (receptor) (Cuadro 12.1).^{1,4,8,11,12}

CUADRO 12.1 MECANISMOS DE PROTECCIÓN CONTRA AGENTES INFECCIOSOS.

FASES	ELEMENTOS MOLECULARES	ELEMENTOS CELULARES	MANIFESTACIONES
NO INDUCIBLE, INESPECIFICA Y SIN MEMORIA.	Mucinas, transferrina, lisozima, betalinas, lactoferrina, fibronectina.	Células NK Leucocitos Polimorfonucleares (PMN)	Resistencia natural
INDUCIBLE, INESPECIFICA Y SIN MEMORIA.	Histamina, prostaglandinas, leucotrienos, lipoxanos, mediadores de la activación de los sistemas de las cininas, coagulación, fibrinólisis, radicales oxigenados, enzimas lisosomales de PMN, alguna citocinas (IL-1, TNF- α , IFN, IL-8, etc.).	Leucocitos PMN, monocitos y macrófagos. Células NK.	Inflamación, leucocitosis, sornolencia, anorexia, fiebre
INDUCIBLE, ESPECIFICA Y CON MEMORIA.	Anticuerpos, citocinas.	Linfocitos B, linfocitos T cooperadores y citotóxicos, células presentadoras de antígenos (CPA).	Respuesta Inmune (RI).

Modificado de Escobar, G. A., et al. (1992)

La **RI** se produce cuando los linfocitos T y B a través de sus receptores membranales que reconocen ciertas regiones de los **inmunógenos (determinantes antigénicos o epitopos)**, se activan, proliferan y forman una clona celular con células diferenciadas; además, se requiere de otros estímulos dados por citocinas sintetizadas por la misma u otras células. En cada clona coexisten dos tipos de células: unas **efectoras**, que no se pueden multiplicar más, están fisiológica y morfológicamente diferenciadas y son responsables de fenómenos como la citotoxicidad, producción de linfocinas y síntesis de anticuerpos; otras son **células de memoria** con una vida media prolongada. Existen dos clases de **RI**, una **primaria**, en la que los linfocitos con receptores complementarios a epitopos de un inmunógeno que se presente participan en una **respuesta primaria** que es global, lenta, de baja magnitud y de corta duración. A través de las células de memoria es posible que se produzca una **respuesta secundaria** al presentarse por segunda vez un inmunógeno determinado, ya que dicha respuesta se produce en un tiempo muy corto, alcanza una magnitud mayor y dura más tiempo. ^{1,4,8,12}

SISTEMA INMUNE.

Es importante aclarar que un **inmunógeno** es toda sustancia capaz de inducir una **RI** y que un **antígeno (Ag)** es una sustancia capaz de reaccionar con lo que el **SI** produce (**anticuerpos**); de aquí que la **inmunogenicidad** es la capacidad de una molécula para inducir una **RI** y la **antigenicidad** es la propiedad que posee dicha molécula para combinarse con los anticuerpos resultantes. Todos los antígenos son macromoléculas orgánicas de naturaleza proteica y polisacárida, con un peso molecular de 5 y 10 kDa respectivamente; además, cuentan con uno o más **determinantes antigénicos o epitopos** que son estructuralmente complementarios a los **sitios activos o paratopos** de los anticuerpos. ^{2,4,8,11}

El **sistema inmune (SI)** es el conjunto de células, tejidos y órganos que intervienen en la inducción, regulación y distribución de los elementos de la **RI**. Las células que conforman al **SI** son los linfocitos T y B, y las células accesorias presentadoras de antígenos (**CPA**): monocitos y macrófagos. El **SI** se distribuye en todo el individuo y está organizado en compartimentos tales como las mucosas, la piel, el tejido linfóide y el sistema nervioso central. Los **anticuerpos (Ac)** son glicoproteínas de la familia de las **inmunoglobulinas (Ig)** constituidas por una o más unidades básicas y conformadas por tres porciones globulares: dos de éstas son idénticas y cada una contiene un sitio de unión con el epitopo conocido como **Fab** o fragmento de unión al antígeno, y la tercera, que no participa en la reacción con el antígeno, es diferente para cada clase y se conoce como **Fac** o fragmento cristalizado. Las **Ig** humanas se dividen en cinco clases o isotipos básicos: **IgM, IgG, IgA, IgD** e **IgE** y seis subclases: **IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1** e **IgA2** (Cuadro 12.2). Los **Fab** poseen **sitios activos** o

paratopos que son áreas complementarias a los epitopos y dan la especificidad al anticuerpo. Cada sitio activo tiene a su vez epitopos que le son exclusivos y constituyen el **idiotipo**, el cual induce en el mismo individuo anticuerpos **anti-idiotipo**.^{1,2,4,6,8,12}

Entre los isotipos principales de anticuerpos, por sus características y funciones destacan la **IgM** y la **IgG** (Cuadro 12.2). La **IgM** se produce durante la respuesta primaria y debido a que es pentamérica, cuenta con diez sitios activos potenciales que la hacen el anticuerpo más eficiente; además, es neutralizante y aglutinante con excelente eficacia. Debido a todo lo anterior, la determinación de anticuerpos **IgM** contra algún agente infeccioso es importante cuando se quiere determinar la fase aguda de una infección o bien que ésta ha ocurrido recientemente. La **IgG** es característica de la respuesta secundaria y aunque sólo cuenta con dos sitios activos, su elevada concentración y su vida media de tres semanas la hacen el anticuerpo de mayor importancia. También es neutralizante, participa en la fagocitosis al opsonizar, se fija a una gran variedad de células que cuentan con receptores para su Fc dando como resultado la activación celular y el transporte intracelular entre otras funciones. Por lo anterior, la determinación de anticuerpos **IgG** contra algún agente infeccioso constituye una herramienta importante para determinar una infección activa, o bien, cierta protección por inmunización o por una infección pasada.^{1,2,4,6,8,12}

Los elementos efectores en la **RI** inducida por un agente infeccioso pueden o no proteger al individuo según la capacidad que tengan para contrarrestar los mecanismos de patogenicidad de dicho agente. De este modo, los anticuerpos no tienen importancia en la protección cuando el agente es intracelular o bien están dirigidos contra antígenos que no participan en la patogenia del agente.^{1,4,8,9,12}

INMUNOENSAYOS.

Por otro lado, la inmunología siempre ha dependido de y estimulado la aplicación de la tecnología, por ejemplo, el uso del microscopio, electroforesis, radiomarcado, inmunofluorescencia, ADN recombinante y animales transgénicos. En el pasado, el tradicional acercamiento a la investigación de las enfermedades infecciosas incluyó técnicas de cultivo, las primeras pruebas serológicas y ensayos bioquímicos. El **serodiagnóstico** fue realizado por medio del uso de precipitinas, aglutinación y pruebas de fijación de complemento, pero estas técnicas son relativamente sensibles y no muy específicas. En la década pasada, los **inmunoensayos** iniciaron un extenso uso, primero con el desarrollo de la inmunofluorescencia (**IF**) y el **radioinmunoensayo (RIA)** y luego con los ensayos inmunoenzimáticos (**EIAs, ELISA**). La **IF** es todavía usada en una variedad de aplicaciones, pero las técnicas de **EIA** han sustituido ampliamente al **RIA**, principalmente en aplicaciones diagnósticas.^{2,6,7,13,14,16,17}

CUADRO 12.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS HUMANAS.^{4,12}

ISOTIPO	IgM	IgG				IgA	IgD	IgE
SITIOS ACTIVOS	10	2				4	2	2
CARBOHIDRATOS	12%	3%				7-11%	9-14%	12%
UBICACIÓN (LOCALIZACIÓN)	Intravascular (suero)	Intravascular y extracelular. (suero)				Intravascular, extravascular y en secreciones.	Linfocitos B	Intravascular, Subepitelial. (Células cebadas y basófilos)
SUBCLASES	0	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	0
PESO MOLECULAR (kDa)	900	146	146	170	146	380	380	180
PORCENTAJE DEL TOTAL DE Ig	5-10	45-60	14-26	4-7	0.5-4	6-12	1-3	0.003
CONCENTRACION EN SUERO mg/mL	1.5	15				4	6	0.05
VIDA MEDIA (DÍAS)	5	21	20	7	21	6	6	3
PASO POR PLACENTA	--	++	+	++	+	--	--	--
UNION A:								
PROTEINA A (<i>Staphylococcus aureus</i>)	--	+	+	--	+	--	--	--
PROTEINA G (<i>Staphylococcus pyogenes</i>)	--	+	+	+	+	--	--	--
ACTIVACION DEL COMPLEMENTO	+++	++	++	++	--	--	--	--
CADENA PESADA	μ	γ				α	δ	ε
CADENA LIGERA	κ/λ	κ/λ				κ/λ	κ/λ	κ/λ
COEF. DE SEDIMENT FORMA	19S	7S				11S	8S	8S
	Pentamero	Monomero				Dimero	Monomero	Monomero

Adaptado de Escobar, G. A., et al. (1992) y Montaraz, C. J. A. (1997).

El diagnóstico de enfermedades infecciosas por inmunoensayos involucran dos partes generales: una es la detección específica de antígenos microbianos, y otra la representa la detección de anticuerpos específicos contra antígenos microbianos; las pruebas para antígenos se denominan **directas** porque detectan el antígeno en una muestra clínica y las de anticuerpos son **indirectas** porque revelan la respuesta del **SI** como la presencia de anticuerpos contra un inmunógeno determinado, que pueden ser **IgG** o **IgM**.^{2,12,13,11,19}

Otro aspecto importante de los inmunoensayos lo constituye el valor diagnóstico de una prueba en particular, el cual puede ser medido en términos de **sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativo y positivo**. La **sensibilidad** de una prueba se refiere al porcentaje de individuos con una enfermedad específica y que proporcionan un resultado positivo; de aquí que un resultado negativo en una persona que tiene la enfermedad es denominado como un falso negativo. La **especificidad** de un ensayo se refiere al porcentaje de personas que no tienen la enfermedad y proporcionan un resultado negativo, y donde un resultado positivo se considera como un falso positivo. El **valor predictivo** de un inmunoensayo se refiere a la probabilidad de que una prueba detecte correctamente la presencia o ausencia de la enfermedad. Por otro lado, la **sensibilidad analítica** se refiere a la cantidad mínima de un antígeno o anticuerpo que puede ser medido por una prueba determinada y la **especificidad** indica la capacidad que posee una prueba para distinguir un antígeno o un anticuerpo determinado de otros.^{7,14,18}

Entre los **inmunoensayos** más utilizados se encuentran las pruebas de aglutinación, hemaglutinación, coaglutinación, floculación, inmunofluorescencia, los ensayos inmunoenzimáticos (EIA's) y la inmunoelectrotransferencia o Western blot. Estos inmunoensayos se basan en reacciones antígeno-anticuerpo (**Ag-Ac**).^{2,5,6,13,14,16,17}

PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN.

Las pruebas de aglutinación se fundamentan en el uso de anticuerpos o antígenos específicos inmovilizados sobre partículas (látex, gelatina, eritrocitos o bacterias), las cuales son estables por largos periodos, requieren de poco tiempo, material y ofrecen una alternativa a los EIAs, sin embargo, son menos sensibles y específicas que éstos.^{5,19}

Aglutinación con látex o gelatina.

La aglutinación con micropartículas de látex o gelatina recubiertas con anticuerpos o con antígenos es simple en su ejecución. Las micropartículas son de un tamaño uniforme (aproximadamente de 1 μ) y pueden estar recubiertas con anticuerpos o con antígenos, para después mezclarse e incubarse con muestras de prueba. Después de un tiempo determinado se realiza la

lectura visual de presencia o ausencia de aglutinación. Estos ensayos se pueden realizar en tubo, en microplacas o en portaobjetos y también se pueden medir fotométricamente. La aglutinación con látex se ha aplicado en la detección de antígenos solubles presentes en fluidos corporales normalmente estériles, tales como: líquido cefalorraquídeo plasma y suero de pacientes con probable infección por algunas bacterias y hongos. La sensibilidad de una prueba de aglutinación puede ser satisfactoria para la detección de antígenos bacterianos, pero no lo es para la detección de antígenos virales, los cuales representan mucho menos masa antigénica que los antígenos bacterianos. Las pruebas de este tipo se encuentran disponibles en equipos comerciales que contienen todos los reactivos necesarios y el procedimiento estandarizado (Figuras 12.1 y 12.2).^{5,7,13,17,19}

Hemaglutinación.

La hemaglutinación se fundamenta en la sensibilización de eritrocitos de pollo o de carnero, ya sea con antígenos o con anticuerpos. Entre los antígenos que se han empleado destacan los treponémicos para la detección de anticuerpos específicos contra el *Treponema pallidum* y entre los anticuerpos usados se encuentran los específicos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Es importante mencionar que en este tipo de pruebas se deben emplear en cada muestra de prueba y en los testigos negativo y positivo, un control de eritrocitos no sensibilizados, es decir, con o sin el antígeno o el anticuerpo específicos. Estas pruebas se encuentran disponibles en equipos comerciales con todo lo necesario (Figuras 12.3 y 12.4).^{5,6,17,19}

FIGURA 12.1 Detección de antígenos por aglutinación con látex o gelatina sensibilizado con anticuerpos.

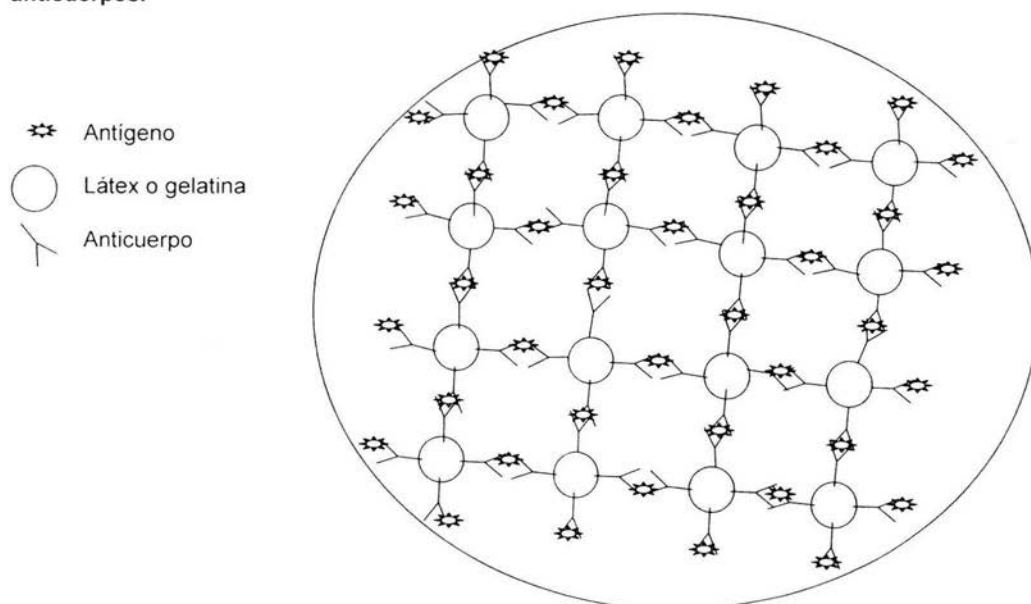


FIGURA 12.2 Detección de anticuerpos por aglutinación con látex o gelatina sensibilizado con antígenos.

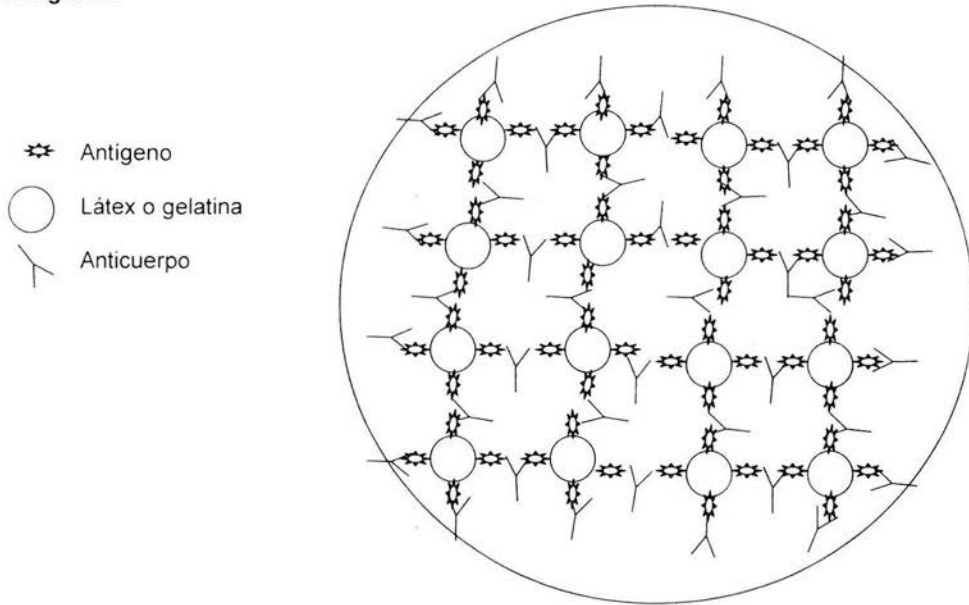


FIGURA 12.3 Detección de antígenos por hemaglutinación con eritrocitos sensibilizados con anticuerpos.

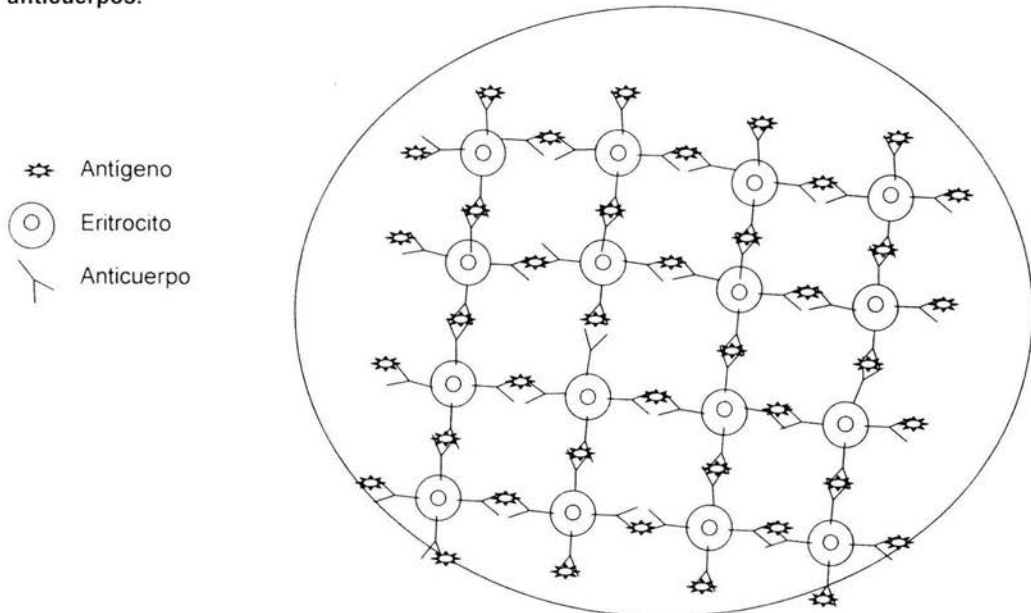
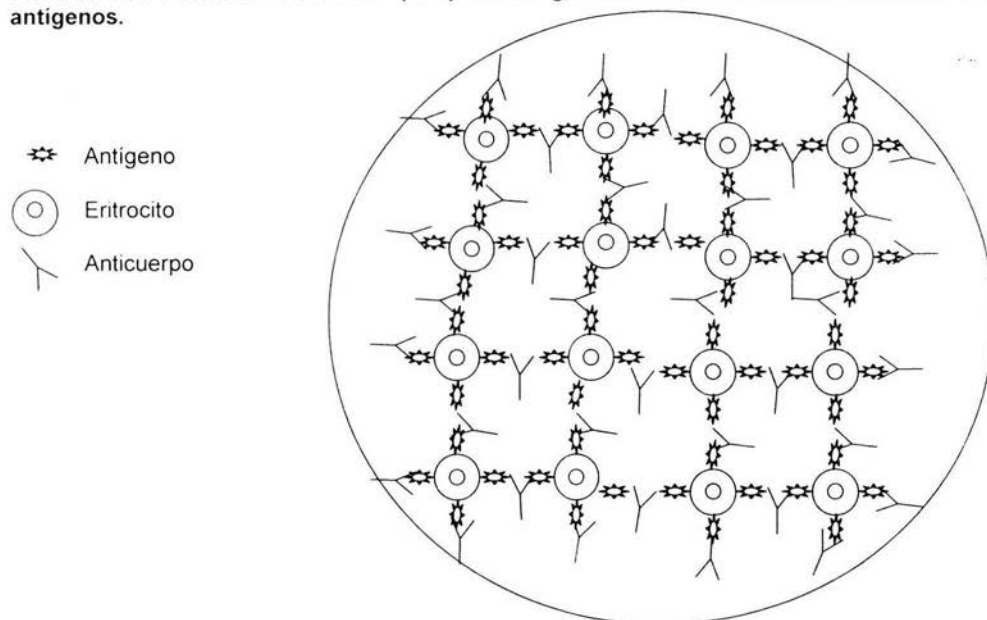


FIGURA 12.4 Detección de anticuerpos por hemaglutinación con eritrocitos sensibilizados con antígenos.



Coaglutinación.^{9,13,14}

Las aglutinaciones empleando acarreadores como el látex, gelatina o la coaglutinación estafilocócica son útiles para identificar antígenos microbianos. En 1973 se llevó a cabo la primera tipificación de pneumococo por coaglutinación con *Staphylococcus aureus* rico en proteína A como vehículos de anticuerpos específicos. Esta técnica es aplicable para detectar antígenos de pneumococo en líquido cefalorraquídeo para diagnóstico de neumonía pneumocócica. También es aplicable a muestras de exudado faríngeo para detectar *Streptococcus pyogenes*. Las células de *Staphylococcus aureus* ricas en proteína A enlazan anticuerpos IgG de muchas especies animales y este recubrimiento de las células está listo para usarse en reacciones de aglutinación (Figura 12.5).

Los antígenos son mezclados con anticuerpos específicos unidos a células de *Staphylococcus aureus*. Los anticuerpos se unen a un componente del *S. aureus* conocido como proteína A. El complejo antígeno-anticuerpo-*S. aureus* forma una aglutinación visible que aparece en uno o dos minutos de reacción (Figura 12.5).

Floculación.^{14,16}

Esta reacción es el fundamento de la prueba de VDRL (Venereal Disease Research Laboratories) o floculación no treponémica, usada para el tamizaje de pacientes sospechosos de estar infectados con el *Treponema pallidum*, en los cuales se buscan anticuerpos no específicos

llamados reaginas. El antígeno empleado es no treponémico, por lo que no es absolutamente específico del *T. pallidum*, ya que está compuesto por una mezcla de cardiolípidina, colesterol y lecitina disuelta en etanol y diluida en PBS. Se basa en el fenómeno de floculación que se produce cuando se hacen reaccionar anticuerpos no específicos (reaginas) de pacientes sífilíticos, con cardiolípidina bovina.

La prueba se realiza empleando 50 μ l de suero humano descomplementado a 58°C durante 10 minutos, el cual es puesto en placas de vidrio con anillos de cerámica. Se agrega una gota del antígeno mediante una jeringa con aguja calibre 18 sin bisel o calibre 23 con bisel dando la inclinación adecuada para que gotee 60 ± 2 gotas por mililitro del antígeno. Agitar la laminilla durante 4 minutos en un agitador mecánico a 180 rpm. Leer inmediatamente al microscopio con ocular 10X y objetivo 10X (Figura 12.6). Reportar los resultados como:

Grupos medianos y grandes = Positivo
 Grupos pequeños = Positivo débil
 Sin grumo o con ligera aspereza = Negativo

Se puede realizar una prueba cuantitativa al diluir el suero en diluciones dobles (1:2, 1:4, 1:8, 1:16...) con solución salina de cloruro de sodio al 0.9% y cada dilución se trata como un suero original según lo descrito anteriormente. Antes de cada corrida de pruebas, es necesario probar la reactividad del antígeno con sueros control conocidos (positivo débil y negativo).

FIGURA 12.5 COAGLUTINACION. (DETECCION DE ANTIGENO)

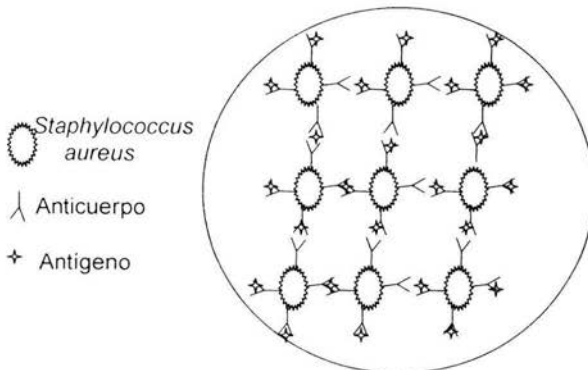
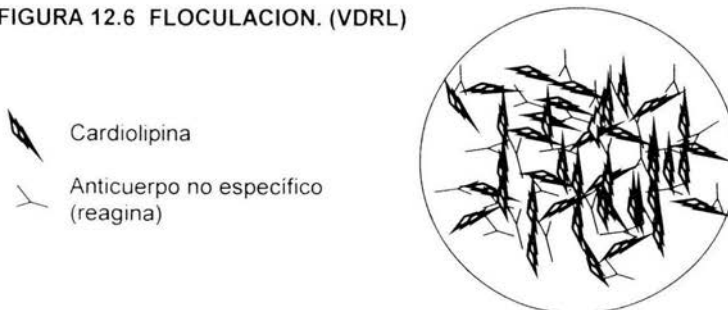


FIGURA 12.6 FLOCULACION. (VDRL)

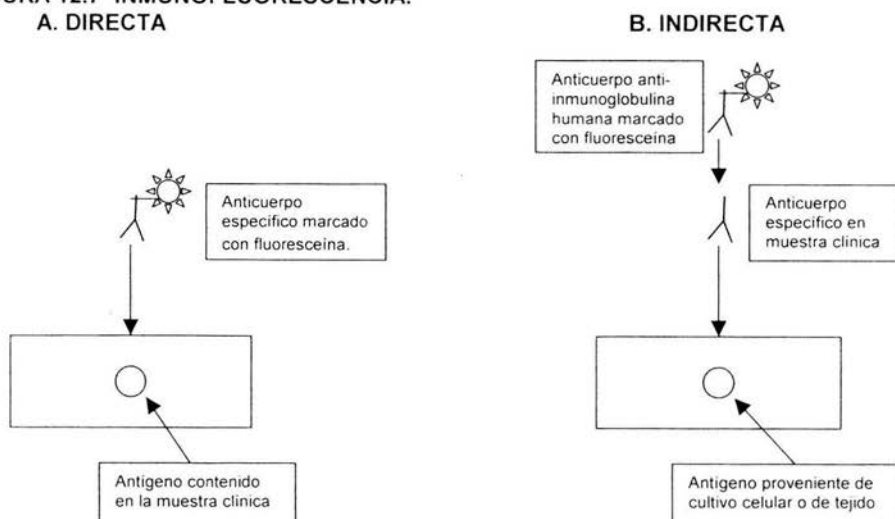


PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA. ^{2,5,17,19}

Estas pruebas pueden ser **directas** o **indirectas**, ya sea que se detecten antígenos o anticuerpos. La prueba de **inmunofluorescencia indirecta** más utilizada es la prueba de anticuerpos treponémicos fluorescentes absorbidos (FTAabs) que se emplea como prueba confirmatoria de la presencia de anticuerpos contra el *Treponema pallidum* en sueros de pacientes con sífilis. Entre las pruebas de **inmunofluorescencia directa** se encuentran, la detección de los virus del herpes simplex tipos 1 y 2, virus de dengue, virus de la rabia y la detección de bacterias como la *Chlamydia trachomatis*.

Los antígenos preparados o las muestras clínicas siempre se fijan en portaobjetos con acetona o metanol fríos. Para la detección de anticuerpos, se fija un antígeno purificado y se agrega el suero sospechoso de contener anticuerpos específicos, después se enjuaga el portaobjetos para eliminar lo que no reaccionó específicamente y se agrega un conjugado de anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos contra anticuerpos humanos, el cual se incuba y se lava para eliminar el exceso. En la detección de antígenos, las muestras clínicas se fijan al portaobjetos y se agrega un conjugado de anticuerpos marcados con fluoresceína que son específicos contra el antígeno buscado, se incuba y se lava el exceso. En ambos casos se agrega glicerol como medio de montaje y se coloca un cubreobjetos. Los portaobjetos son examinados con un microscopio de fluorescencia buscando áreas brillantes de fluorescencia amarillo-verdosa y se comparan con testigos positivo y negativo para establecer el resultado correspondiente (Figura 12.7).

FIGURA 12.7 INMUNOFLUORESCENCIA.



PRUEBAS DE ELISA. ^{2,3,5,11,13,18,19}

Actualmente las pruebas de **ELISA** o **EIA** son los inmunoensayos más empleados en la detección de antígenos o anticuerpos. Las siglas **ELISA** vienen del inglés "Enzyme Linked Immunosorbent Assay", es decir, **análisis de la enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte**, el cual corresponde a un **ensayo inmunoenzimático (EIA)** heterogéneo, ya que, el antígeno o el anticuerpo primero se fijan a un soporte inerte y luego se hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente, que estará marcado con una enzima (conjugado); se lava el conjugado que no reaccionó y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato, determinándose el grado de transformación de un sustrato incoloro a un producto colorido por medio de un espectrofotómetro.

Las pruebas de **ELISA** pueden clasificarse en **competitivas** y **no competitivas**, dependiendo de que el antígeno o el anticuerpo libres compitan o no con un antígeno o anticuerpo ligados a una enzima. También, se pueden clasificar en **directas** e **indirectas**, dependiendo de que se detecten antígenos o anticuerpos respectivamente (Figuras 12.8 y 12.9).

CLASIFICACION DE LAS PRUEBAS DE ELISA.

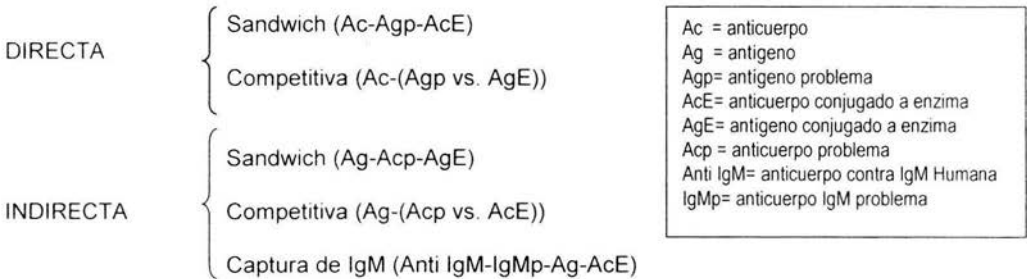


FIGURA 12.8 ELISA INDIRECTO- (DETECCION DE ANTICUERPOS)

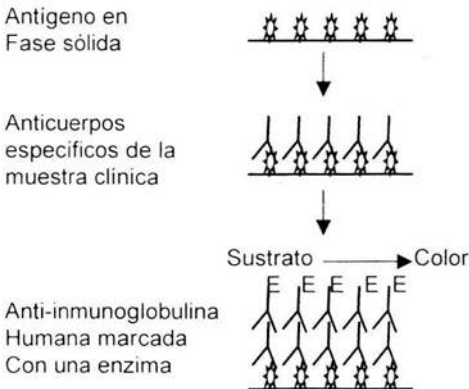
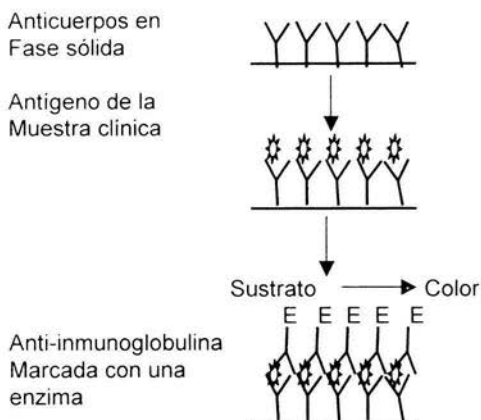


FIGURA 12.9 ELISA DIRECTO-sandwich (DETECCION DE ANTIGENO)



El antígeno que se emplea en **ELISA** puede ser soluble o insoluble, y se recomienda lo más puro posible. La fase sólida o inmunoabsorbente generalmente es de **poliestireno** y sirve para la adsorción pasiva en medio alcalino de anticuerpos o antígenos mediante un buffer de carbonato-bicarbonato a pH 9.6. Las enzimas más comunes son **fosfatasa alcalina**, **peroxidasa de rábano** y **glucosa oxidasa**. El conjugado se prepara al unir una enzima con un anticuerpo o un antígeno empleando agentes de unión tales como el **glutaraldehído** y el **periyodato de sodio**. Antes de emplear el conjugado, se debe establecer la dilución óptima para la reacción, lo cual se logra al titular el conjugado, a fin de obtener diferencias máximas entre sueros negativos y sueros positivos.

El sustrato cromógeno empleado debe carecer inicialmente de color y cuando son transformados por la acción de la enzima presentan un color intenso, además deben ser seguros, baratos y fáciles de usar. Cuando se emplea como enzima la fosfatasa alcalina, el sustrato empleado es el p-nitrofenilfosfato y cuando se emplea la peroxidasa se puede usar la diaminobencidina, la ortofenilendiamina (OPD), o bien la tetrametilbencidina (TMB).

Como todas las reacciones catalizadas por enzimas se ven afectadas por el pH, esto se aprovecha para detener la reacción enzimática al agregar como solución de paro ácidos o bases fuertes, principalmente ácido sulfúrico 1N ó 4N, ácido clorhídrico 1N, o bien hidróxido de sodio.

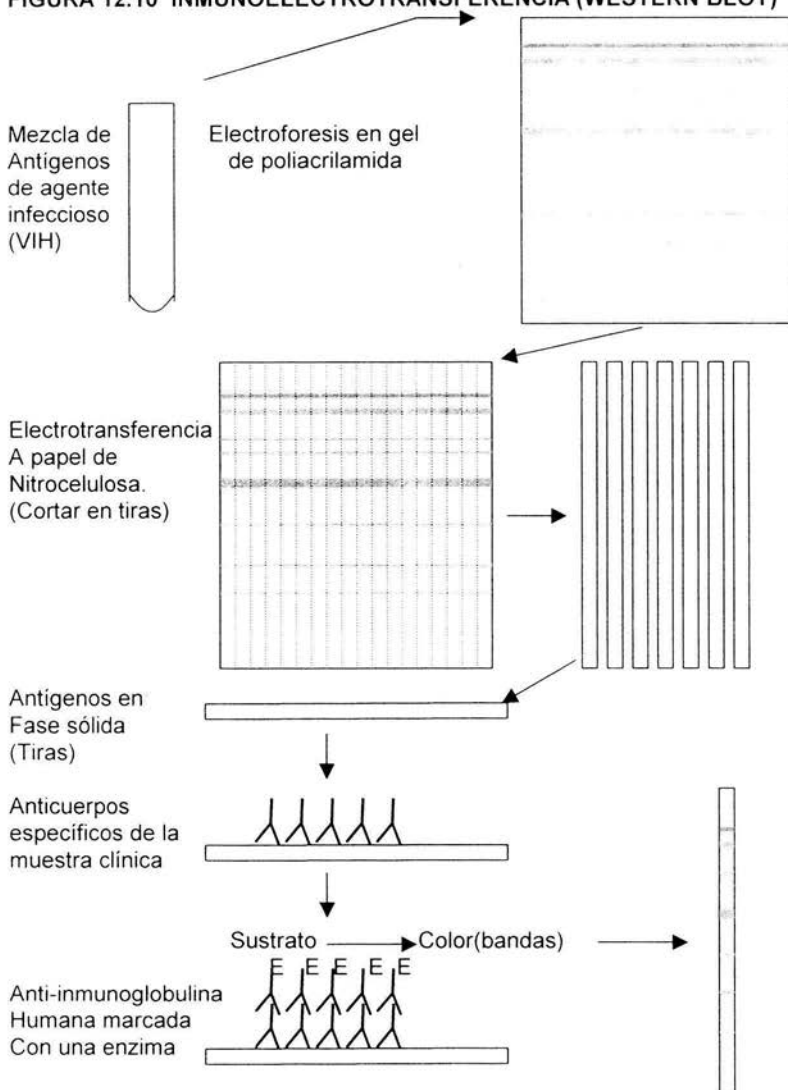
PRUEBA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT) O INMUNOBLOTTING DE PROTEINAS. 2,3,5,10,15,18

Esta prueba sirve para la detección de anticuerpos específicos contra proteínas antigénicas inmobilizadas en un soporte sólido (nitrocelulosa), las cuales fueron previamente separadas por su peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidas a papel de nitrocelulosa, con lo que se preparan tiras. Los formatos empleados recientemente tienen gran similitud con una prueba de ELISA indirecto sobre soporte sólido (Figura 12.10).

La detección de anticuerpos se basa en incubar muestras reactivas en pruebas de escrutinio con las proteínas presentes en las tiras previamente preparadas, y si existen anticuerpos específicos contra las proteínas, éstos quedarán unidos a la tira después del lavado de la misma. Después se incuban las tiras con un anticuerpo anti IgG humana conjugado a una enzima, el cual se enlazará a los anticuerpos capturados en la tira. Con algunos lavados se elimina el exceso de conjugado y se agrega un sustrato cromógeno, que se precipita y colorea la tira a manera de bandas únicamente en el lugar donde quedó unido el conjugado, indicando la presencia de anticuerpos específicos contra las proteínas. Como reactivo de paro se emplea agua destilada. La intensidad de color de las bandas es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra y la posición de éstas se compara con las de una tira de referencia desarrollada con un suero control positivo (Figura 12.10).

La prueba de Western Blot se utiliza ampliamente en investigación básica y clínicamente en pruebas de confirmación serológica para una variedad de enfermedades infecciosas como la hepatitis C y principalmente para la detección confirmatoria de infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

FIGURA 12.10 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

**OBJETIVOS.**

- Conocer los conceptos básicos en Inmunología y obtener un panorama general de los principales inmunoensayos empleados actualmente en el campo del diagnóstico microbiológico.
- Realizar la prueba de coagulación para la detección del polisacárido del grupo A del *Streptococcus pyogenes*.
- Realizar algún (os) ensayo (s) demostrativos de los inmunoensayos.

MATERIAL.

Con base en el material disponible, se realizarán ensayos demostrativos por parte del asesor siguiendo la metodología específica del tipo de ensayo y si está involucrado un estuche comercial, se seguirán las instrucciones del fabricante.

MATERIAL Y EQUIPO

Hisopos de algodón estériles
 Pipetas Pasteur
 Tubos de ensayo de 13X100
 Placa para aglutinación
 Mechero Bunsen
 Incubadora
 Centrifuga
 Aplicadores de madera
 Asa bacteriológica

REACTIVOS.

Solución salina fisiológica (SSF) (NaCl 8.5%) estéril
 PBS neutro.
 Formaldehído
 Placas con agar sangre.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Cepa de *Streptococcus pyogenes*.
 Muestras de exudado faríngeo.
 Cepa de *Staphylococcus aureus*
 Antisuero con anticuerpos anti-polisacárido del grupo A.
 Suero humano

METODO.

COAGLUTINACION PARA LA DETECCIÓN DEL POLISACARIDO DEL GRUPO A DEL *Streptococcus pyogenes*.^{9,13,14}

Estabilización de *S. aureus*:

1.- Un concentrado de *S. aureus* se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos y se lava 2 veces en PBS a 5°C y se resuspende al 10% (peso/volumen) en PBS con 1 a 3% de formaldehído.

- 2.- Luego se incuba 1 hora a temperatura ambiente, se centrifuga 2500 rpm durante 5 minutos y se elimina el formaldehído.
- 3.- Después se incuba a 80°C durante 10 minutos en PBS para eliminar remanentes con actividad lítica.
- 4.- Finalmente, las células se conservan indefinidamente en PBS neutro a 4°C.

Preparación del reactivo de coagulación.

- 1.- Se mezcla un volumen del antisuero anti-polisacárido del grupo A con 9 volúmenes del *S.aureus* estabilizado al 10% en PBS a pH 7.5 y a temperatura ambiente, con lo que se logra el recubrimiento de las células bacterianas con los anticuerpos.
- 2.- Se mezcla un volumen de suero humano normal con 9 volúmenes del *S.aureus* estabilizado al 10% en PBS a pH 7.5 y a temperatura ambiente, con lo que se logra el recubrimiento de las células bacterianas con anticuerpos no específicos para obtener el reactivo testigo de coagulación.

Prueba de coagulación.

- 1.- Tomar una colonia de *Streptococcus pyogenes* y resuspenderla en un tubo con 1 mL de SSF estéril como testigo positivo.
- 2.- Preparar una suspensión gruesa en un tubo con 1 mL de SSF estéril de un estreptococo beta hemolítico aislado de una muestra de exudado faríngeo y realizar diluciones dobles con SSF (1:2, 1:4, y 1:8).
- 3.- Se mezcla una gota de *S. pyogenes* y una gota del reactivo de coagulación en un primer pozo de la placa para aglutinación como testigo positivo.
- 4.- Se mezcla una gota de SSF y una gota del reactivo de coagulación en un segundo pozo de la placa para aglutinación como testigo negativo.
- 5.- Se agregan dos gotas del reactivo testigo de coagulación en un tercer pozo de la placa para aglutinación como testigo para descartar la autoaglutinación del mismo.
- 6.- Se mezcla una gota de la suspensión bacteriana concentrada y una gota del reactivo de coagulación en otro pozo de la placa para aglutinación.
- 7.- Se realiza el paso anterior para las diluciones de la suspensión bacteriana.
- 8.- Se mezcla durante 1 o 2 minutos a temperatura ambiente.
- 9.- Se realiza la lectura de ausencia o presencia de aglutinación como indicativo de resultado negativo o positivo para cada uno de los pozos.

Testigos. Se comprueba que los testigos negativo y positivo al antígeno en cuestión proporcionen los resultados esperados y que el testigo del reactivo de coagulación con células sensibilizadas con anticuerpos normales no específicos no autoaglutine.

Nota: Los antígenos en exceso pueden inhibir la coaglutinación por lo que hay que diluir más la muestra en caso de resultado débil positivo en la última dilución realizada y exista la sospecha de infección por *S. pyogenes*.

OBSERVACIONES Y RESULTADOS.

ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Cuestionario.

- a) Describa brevemente al sistema inmune:
- b) Mencione las características generales de la respuesta inmune:
- c) Defina los términos inmunógeno, antígeno y anticuerpo:
- d) Mencione los fundamentos de los siguientes inmunoensayos:

Aglutinación.

Floculación.

Inmunofluorescencia.

ELISA.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Aguilera, F. J. L., et al. Resúmenes del Simposio de Inmunología del Aparato Respiratorio. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994). 91 p.
2. Abbas, A. K., et al. Inmunología Celular y Molecular. 2ª edición. Interamericana McGraw-Hill. España. (1995) 1-3, 38-71.
3. Alvarez Lucas, C., et al. Guía para la Atención Médica de Pacientes con Infección por VIH/SIDA en Consulta Externa y Hospitales. 4ª edición. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CONASIDA). Secretaría de Salud. México. (2000). Págs. 19-22.
4. Escobar, G. A., et al. Vacunas, Ciencia y Salud. Inmunidad y Vacunas. I.N.D.R.E.- Secretaría de Salud. México. (1992) Págs. 29-53.
5. Escobar, G. A., et al. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen 1. I.N.D.R.E.-Secretaría de Salud. México. (1995) Págs. VIR26-VIR30, VIR49-VIR54, VIR74-VIR75, VIR86-VIR89, VIR106-VIR115.
6. Harlow, E., Lane, D. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. EU. (1988) Págs. 555-612.
7. Harbeck, R. J. Diagnostic Immunology Laboratory Manual. Raven Press. EU. (1991) Págs. 173-183.
8. Janda, W. M. Immunology. En Isenberg, H. D. Essential Procedures for Clinical Microbiology. ASM Press. E. U. (1998). Págs. 562-577.
9. Kohler, R. B. Antigen Detection to Diagnose Bacterial Infections. Volumen I. Methodology. CRC Press. EU. (1986) Págs. 9-34.
10. Lane, H. C. Human Immunodeficiency Virus. En Rose, M. R., et al. "Manual of Clinical Laboratory Immunology". 5ª Edic. ASM Press. E. U. (1997).
11. Margni, R. A. Inmunología e Inmunoquímica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1989) Págs. 571-586.
12. Montaraz, C. J. A. Introducción a la Inmunología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México (1997). 93 p.
13. Morilla, G. A. y Bautista, G. C. R. Manual de Inmunología. Editorial Diana. México. (1986) Págs. 129-145.
14. Murray, P. R; Baron, E. J., et al. Manual of Clinical Microbiology. 7ª edición. ASM Press. E U. (1999) Págs.110-122.
15. Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Secretaría de Salud. CONASIDA. México. (1993). 42 p.
16. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud. Serie Paltex. OPS – OMS. Colombia (1983) Págs. 288-296.

17. Phillips, T. M. Analytical Techniques in Immunochemistry. Marcel Dekker. EU. (1992) Págs. 103-130, 263-298.
18. Schochetman., G., George, J. R. AIDS Testing. Methodology and Management Issues. Springer-Verlag. USA. (1992).
19. Zárate, A. M. Ll, et al. Manual de Diagnóstico de la Red de Laboratorios de Enfermedades Febriles Exantemáticas. Publicación Técnica No. 21. I.N.D.R.E.- Secretaría de Salud. México. (1993) Págs. 30-34, 41-49, 59-67, 78-82.

CAPITULO No. 13.

PRUEBAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

INTRODUCCION

Los métodos de diagnóstico tradicionalmente usados en Microbiología clínica, consisten en el aislamiento de microorganismos por medio de cultivos de bacterias y hongos, propagación de virus en cultivos celulares, o bien inmunoensayos para la detección de anticuerpos o antígenos que confirmen la infección por determinado agente patógeno. Sin embargo, los cultivos de bacterias y hongos, así como la propagación de virus en cultivos celulares pueden ser desplazados por las novedosas pruebas de **Biología Molecular**, debido a que las primeras se basan en lentos procesos y las segundas requieren muy poco tiempo de procesamiento.^{2,4,6}

Las pruebas de **Biología Molecular** tienen como fundamento el aprovechar las características estructurales y funcionales de los ácidos nucleicos de los seres vivos y en cuyas secuencias está contenida la información que requiere un organismo para llevar a cabo sus funciones vitales. Estos ácidos nucleicos son el desoxiribonucleico (ADN) y el ribonucleico (ARN), los cuales son polímeros de los nucleótidos de adenosina (A), guanosina (G) y citosina (C), además de timidina (T) para el ADN y uridina (U) para el ARN, este es un polímero de una cadena no ramificada, mientras el ADN es un polímero de doble cadena. La secuencia de nucleótidos en el ADN de las células es la portadora de toda la información genética y la mayoría de las aplicaciones de la Biología Molecular en el diagnóstico consisten en encontrar una secuencia de ADN que previamente se ha demostrado que únicamente está presente en la patología, ya sea de origen infeccioso o de origen crónico degenerativo.^{1,5}

La mayoría de las pruebas de Biología Molecular se basan en la novedosa tecnología de la **amplificación molecular**, la cual tuvo sus orígenes en la tecnología de las sondas de ácidos nucleicos hace más de una década, como una herramienta de identificación de cualquier ser vivo. Inicialmente se prepararon sondas de ácidos nucleicos y se usaron directamente sobre muestras clínicas en un intento por identificar un microorganismo; desafortunadamente, debido a que en una muestra clínica existen muy pocas moléculas blanco, dichas pruebas se caracterizaron por una sensibilidad inaceptablemente baja; de aquí que, era indispensable una previa **amplificación** de las moléculas blanco contenidas en la muestra para su posterior identificación.^{2,3,6}

El término **amplificación** significa: hacer muchas entidades a partir de una pequeña cantidad de las mismas, por lo que, las entidades más comúnmente usadas en las pruebas de amplificación incluyen las siguientes: ADN o ARN blancos, una señal o molécula reportera, o bien, una sonda de

ácido nucleico. Estas entidades son usadas en tres tipos de sistemas de amplificación, que se clasifican como sigue:

1. **Amplificación de molécula blanco**, donde se producen muchas copias del ácido nucleico blanco.
2. **Amplificación de una señal**, donde una señal o molécula reportera unida a la sonda es detectada, y la señal es amplificada enormemente.
3. **Amplificación de sondas**, donde se producen muchas copias de la sonda, la cual detecta el ácido nucleico blanco.

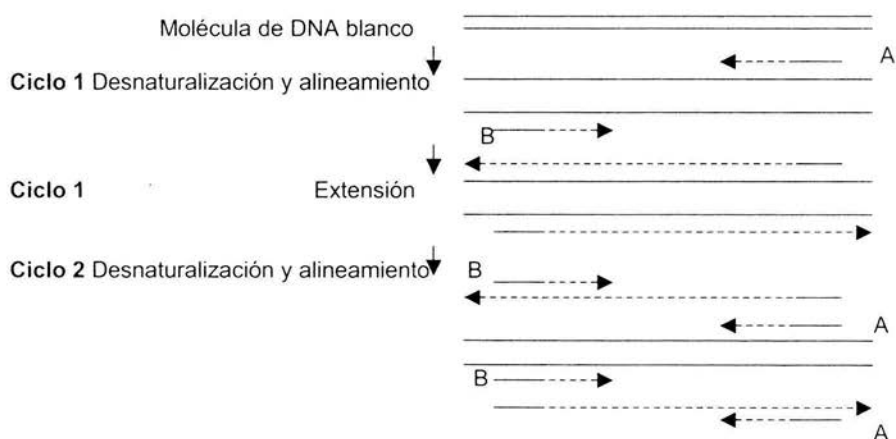
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Entre los métodos para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos se encuentran: la hibridación de ácidos nucleicos y la amplificación de ácidos nucleicos. El sistema de amplificación más antiguo y frecuentemente usado es un sistema de amplificación de molécula blanco conocido como **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**, donde se amplifica ADN blanco o ARN blanco (como Transcriptasa Reversa PCR [RT-PCR]). Actualmente están disponibles estuches comerciales de PCR para la detección de *Chlamydia trachomatis* y *Mycobacterium tuberculosis*, así como para la determinación de carga viral del VIH. La principal aplicación de las pruebas de Biología Molecular se encuentra en: la detección de microorganismos de lento o difícil crecimiento (p. ej. *M. tuberculosis*, *N. gonorrhoeae*); microorganismos altamente infecciosos o peligrosos (p. ej. VIH); microorganismos para los cuales no están comercialmente disponibles los métodos de cultivo (p. ej. *Treponema pallidum*, *Mycobacterium spp.* y *Pneumocystis carinii*); y la detección de microorganismos en recién nacidos en quienes la serología puede ser engañosa (p. ej. infección congénita por el VIH y por el *T. pallidum*). Además existen pruebas de PCR para *Micobacterium spp.*, y una diversidad de virus tales como: Dengue, Poliovirus, Rubéola, Citomegalovirus, Epstein Baar, Rotavirus, Hepatitis A, B y C; y Ebola entre otros.^{4,6,7}

La prueba de **PCR** es un método enzimático que aprovecha la actividad catalítica de enzimas que replican polinucleótidos, en el que se producen múltiples copias de un segmento de ADN blanco predeterminado. Este proceso de amplificación se logra con dos primeros o cebadores de oligodesoxinucleótidos (A y B) que no hibridan entre si y que son complementarios a una región específica del ADN blanco, una polimerasa de ADN termoestable (Taq polimerasa u otras enzimas termoestables) y los cuatro desoxirribonucleósidos (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) trifosfatados que actúan sobre el patrón de ADN en cuestión. El primero A se acopla al final de uno de los filamentos del ADN y el primero B al final del filamento complementario (Figura 13.1).^{2,4,7}

Cuando el patrón de ADN blanco es desnaturalizado por calor (94°C) y luego enfriado (37°C), los primeros se alinean a sus filamentos de ADN blanco y luego son extendidos por la polimerasa de ADN para así generar cadenas complementarias; enseguida, ocurre otra desnaturalización del ADN y su correspondiente polimerización (alineamiento y extensión) en un nuevo ciclo. Durante varios ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión ocurre un aumento exponencial de la cantidad de ADN específico, produciéndose millones de copias de la molécula original. (Figura 13.1) El ADN amplificado es detectado al separarse mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizarse con luz ultravioleta.^{4,7}

FIGURA 13.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



OBJETIVO.

- Conocer los conceptos básicos en Biología Molecular y obtener un panorama general de las principales aplicaciones empleadas actualmente en el campo del diagnóstico microbiológico.

MATERIAL Y MÉTODO.

Este capítulo se puede desarrollar a manera de una plática descriptiva en la que se utilice material didáctico.

CONCLUSIONES.

Cuestionario.

- a) Describa brevemente el significado de Biología Molecular:
- b) Mencione las características generales de los ácidos nucleicos:
- c) Defina los términos hibridación y amplificación:
- d) Mencione brevemente el fundamento de la prueba de PCR:

BIBLIOGRAFIA.

1. Escobar, G. A.; et al. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen 3. I.N.D.R.E.-Secretaría de Salud. México. (1995). Págs. BiMo 5-69.
2. Persing, D.H., et al. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. ASM. E. U. (1993). Págs. 3-25.
3. Rickwood, D. y Hames B. D. Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Vol. I Editado por T. A. Brown. Inglaterra. (1991). Págs. 185-207.
4. Sandin, R. L. Practical Microbiology. The ABCs of Molecular Amplification. Infections in Medicine. EU. (1999). 16 (2): 98-99.
5. Sofer, W. H. Introduction to Genetic Engineering. Butterworth-Heinemann. EU. (1991). Págs. 1-31.
6. Tang, Y. W., Persing, D. H. Molecular Detection and Identification of Microorganisms. En Murray, P. R., Baron, E. J., et al. Manual of Clinical Microbiology. 7ª edic. ASM Press. E. U. (1999).
7. Taylor, G. R. PCR: A Practical Approach. Editado por McPherson, M. J. Inglaterra. (1991). Págs. 1-14.

CONCLUSIONES.

Durante la elaboración del presente trabajo fue posible concentrar los métodos básicos comúnmente empleados en Microbiología, proporcionando a su vez una opción de apoyo y consulta para facilitar el aprendizaje de los estudiantes interesados en esta área.

Por otro lado, este material puede utilizarse como complemento previo a la realización de las prácticas escolares y profesionales.

Finalmente, este trabajo expone los conceptos básicos de forma sencilla, para que los interesados en la Microbiología, posteriormente puedan profundizar y consultar otras fuentes de información especializada.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilera, F. J. L., et al. Resúmenes del Simposio de Inmunología del Aparato Respiratorio. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994).
- Abbas, A. K., et al. Inmunología Celular y Molecular. 2ª edición. Interamericana McGraw-Hill. España. (1995).
- Adelberg, E. A., et al. Biosafety in the Laboratory. National Research Council. National Academy Press. E.U. (1989).
- Albert, B., Bry, D., Lewis, J., y Watson, J. D. Biología Molecular de la Célula. 23ª edición. Editorial Omega. España (1990).
- Alcamo, I. E. Fundamentals in Microbiology. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1991).
- Alvarez Lucas, C., et al. Guía para la Atención Médica de Pacientes con Infección por VIH/SIDA en Consulta Externa y Hospitales. 4ª edición. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CONASIDA). Secretaría de Salud. México. (2000).
- Alvarez Manrique, C. I; Mendoza Elvira, S. E. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994).
- Arenas, R. Micología Médica Ilustrada. Editorial Interamericana / McGraw Hill. México. (1993).
- Backer, F. J. Manual de Técnica Bacteriológica. 2ª edición. México. (1981).
- Barker, R. At the Bench. A Laboratory Navigator. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EU. (1998) Págs. 263, 276.
- Barrón Romero, B. L., et al. Manual de Prácticas del Laboratorio de Virología. 2ª edición. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. (1995).
- Beaver, P. Ch., et al. Parasitología Clínica. Compañía Editorial Salvat. México. (1988).
- Beishir, L. Microbiology in Practice. 6ª edición. Addison Wesley Longman Inc. EU. (1996) Págs. 143-150.
- Bergoglio, R. Antibióticos. 5a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. (1993).
- Bird, B. R. y Forrester, F. T. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control. E.U. (1981).
- Block, S.S. Desinfection, Sterilization and Preservation. 4ª edición William & Wilkins. USA. (1995).
- Bonifaz, A. Micología Médica Básica. Editorial Méndez Cervantes. México (1991).
- Breach, M. R. Esterilización. Métodos y Control. El Manual Moderno. México. (1976).

- Brock, T. D., Madigan, M. T. Microbiología. 6ª edición. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana. México. (1993).
- Bryan, A. H., Bryan, Ch. A. Bacteriología. Prácticas y Principios. 6a. Edición. Editorial Continental, México – España. (1976).
- Botero, D., Restrepo, M. Parasitosis Humanas. 2ª edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. (1992).
- Budavari, S., et al. The Merck Index. 12a edición. Merck & Co., Rahway, N. J., EU. (1996). Misc. 58 y 59.
- Cappuccino, J. G., Sherman, N. Microbiology. A Laboratory Manual. 3ª edición. Benjamin/Cummings. EU. (1992)
- Castañeda, P., Giral, C. Guía de Validación de Medios de Cultivo. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Dirección General de Control de Insumos para la Salud. Secretaría de Salud. México. (1990).
- Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. Microbiological Methods. 7ª edición. Butterworth – Heinemann. Inglaterra. (1995).
- Cruz, J. G. Sainz, M. J. E. Segura, R. P. Manual de Bacteriología Clínica. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. (1994) Págs. 95-99.
- Cunningham, C. H. Virología Práctica. 6ª edición. Editorial Acribia. España. (1971).
- Delaat, N. Microbiología. 2a Edición. Edit. Latinoamericana. México. (1985).
- Díaz, R., Gamazo, C., López-Goñi, I. Manual Práctico de Microbiología. 2ª edición. Editorial Masson. 71-82. España. (1999).
- Engler, R. Disinfectants. En Official Methods of Analysis. Environmental Protection Agency. EU. (1984) Págs. 65-77.
- Escobar, G. A., Valdespino, G. J. L., Sepúlveda A. J. Vacunas, Ciencia y Salud. I.N.D.R.E.-S.S.A. México. (1992).
- Escobar, G. A.; et al. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen 1. I.N.D.R.E.-Secretaría de Salud. México. (1995).
- Escobar, G. A.; et al. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen 3. I.N.D.R.E.-Secretaría de Salud. México. (1995).
- Finegold, S. M., Baron, E. J. Diagnóstico Microbiológico. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana. México (1989).
- Fish Back, T.T. Manual de Pruebas Diagnósticas. 5ª edición. McGraw Hill Interamericana. México. (1997).

- Gaviño de la Torre G., Juárez L. J. Carlos, Figueroa T. Hugo. Técnicas Biológicas. 2ª edición. Limusa. México. (1995).
- Harlow, E., Lane, D. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. EU. (1988).
- Harbeck, R. J. Diagnostic Immunology Laboratory Manual. Raven Press. E. U. (1991).
- IMSS. Manual de Procedimientos para el Control y Manejo de Residuos Biológicos- Infecciosos. Tóxicos-Peligrosos, Comunes y Reciclables. Secretaría de Salud.
- Janda, W. M. Immunology. En Isenberg, H. D. Essential Procedures for Clinical Microbiology. ASM Press. E. U. (1998).
- Jawets, E., Melnick, J. L. Microbiología Médica. 13ª edición. El Manual Moderno. México. (1990).
- Johnson, T. R., Case, Ch. L. Laboratory Experiments in Microbiology. 3ª edición. Benjamin / Cummings. EU. (1992).
- Kohler, R. B. Antigen Detection to Diagnose Bacterial Infections. Volumen I. Methodology. CRC Press. EU. (1986).
- Koneman, E. W., et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1992).
- Koneman, E. W., Roberts, G. D. Micología Práctica de Laboratorio. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina (1987).
- Krueger, W. B., Kolodziej, B. J. Laboratory Procedures for General Microbiology. Kendall / Hunt Publishing. EU. (1986).
- Lane, H. C. Human Immunodeficiency Virus. En Rose, M. R., et al. "Manual of Clinical Laboratory Immunology". 5ª Edic. ASM Press. E. U. (1997).
- Lansing, M. P. Microbiología. 4ª edición. Mc Graw-Hill. España. (2000).
- Lennette H. Edwin. Manual de Microbiología Clínica. 4ª. Edición. Panamericana. Argentina. (1993).
- Letayf, J., González, G. C. Seguridad, Higiene y Control Ambiental. Mc Graw Hill. México. (1994).
- Lim, D. Microbiology. 2a. Edición. WCB/McGraw-Hill. EU. (1998).
- López, M. C., Magis, R. C., Hernández, T. G. Guía de Prevención y Tratamiento para la Exposición Ocupacional al VIH. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA. Secretaría de Salud. México. (1998).

- López, M. C., Hernández, T. G. Guía de Prevención y Tratamiento para la Exposición Ocupacional al VIH. Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA. Secretaría de Salud. México. (2000) 80 págs.
- Mac Faddin, J. F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana. México. (1990).
- Margni, R. A. Inmunología e Inmunoquímica. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. (1989).
- Martínez, L. P. y Morales, M. A. Manual de Laboratorio de Parasitología Médica. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México (1996).
- Montaraz, C. J. A. Introducción a la Inmunología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México (1996).
- Morilla, G. A. y Bautista, G. C. R. Manual de Inmunología. Editorial Diana. México. (1986).
- Murray, P. R.; Baron, E. J., et al. Manual of Clinical Microbiology. 7ª edición. ASM Press. EU. (1999).
- Murray, P. R., et al. Microbiología Médica. Editorial Mosby. (1994).
- NCCLS. Métodos de Dilución para el Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana para Bacterias de Crecimiento Aeróbico. 4ª edición (Norma Aprobada). Documento NCCLS M7-A4. Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS). Vol. 17 No. 2, EU. (1997)
- NCCLS. Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de la Susceptibilidad Antimicrobiana. 8º Suplemento Informativo. Documento NCCLS M100-S8. Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS). Vol. 18 No. 1, EU. (1998)
- NCCLS. Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de la Susceptibilidad Antimicrobiana Mediante Discos. 6ª edición (Norma Aprobada). Documento NCCLS M2-A6. Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS). Vol. 17 No. 1, EU. (1997)
- Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Secretaría de Salud. CONASIDA. México. (1993).
- Norma Oficial Mexicana. NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Secretaría de Salud. México. (2002).
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud. Serie Paltext. OPS – OMS. Colombia. (1983).
- Ortega, L. M., García, V. S., y Cruz, S. T. A. Manual de Prácticas de Microbiología Veterinaria. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. Págs. 98-101.

- Phillips, J. A., Brock, T. D. General Microbiology: A Laboratory Manual. Prentice - Hall. EU. (1984)
- Phillips, T. M. Analytical Techniques in Immunochemistry. Marcel Dekker. EU. (1992).
- Pelczar, Jr. M. J., et al. Microbiología. 2ª edición. Mc Graw – Hill. México. (1993).
- Persing, D.H., et al. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. ASM. E. U. (1993). Págs. 3-25.
- Ponce de León, R. S., et al. Manual de Prevención y Control de Infecciones Hospitalarias. Organización Panamericana de la Salud – OMS. (1995).
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1994. Secretaría de Desarrollo Social. México. (1994).
- Rickwood, D. y Hames B. D. Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Vol. I Editado por T. A. Brown. Inglaterra. (1991).
- Romero, C. R. Microbiología y Parasitología Humana. Bases Etiológicas de las Enfermedades Infecciosas. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. (1999).
- Rovozzo, G. C. y Burke, C. N. A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice-Hall. EU. (1973).
- Sandin, R. L. Practical Microbiology. The ABCs of Molecular Amplification. Infections in Medicine. EU. (1999). 16 (2): 98-99.
- Schochetman., G., George, J. R. AIDS Testing. Methodology and Management Issues. Springer-Verlag. USA. (1992).
- Sofer, W. H. Introduction to Genetic Engineering. Butterworth-Heinemann. EU. (1991). Págs. 1-31.
- Stanier, R. Y., Adelberg, E. A., Ingraham, J. L. Microbiología. Ediciones REPLA. México. (1986).
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L. Microbiología. Reverte. España. (1996). Págs. 155-157.
- Tang, Y. W., Persing, D. H. Molecular Detection and Identification of Microorganisms. En Murray, P. R., Baron, E. J., et al. Manual of Clinical Microbiology. 7ª edic. ASM Press. E. U. (1999).
- Taylor, G. R. PCR: A Practical Approach. Editado por McPherson, M. J. Inglaterra. (1991).
- Tortora, G. J., et al, Introducción a la Microbiología. 3ª. edición. Acribia. España. (1993)
- Volk, W. A. Basic Microbiology. 7ª edición. Harper Collins Publishers. E. U. (1992). Págs. 233-238.
- Washington, J. A. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. 2ª edición. Springer-Verlag. EU. (1985). Págs. 519-536.

- William M. O Leary, Ph.D. Practical Handbook of Microbiology. 2ª. Edición. USA. (1990).
- Zárate, A. M. L., et al. Manual de Diagnóstico de la Red de Laboratorios de Enfermedades Febriles Exantemáticas. Publicación Técnica No. 21. I.N.D.R.E.- Secretaría de Salud. México. (1993).