



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

“GUÍA PRÁCTICA DE MICROBIOLOGÍA GENERAL”

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
KARLA EDITH AGUILAR VÁZQUEZ**

ASESORA: Q.F.B. LETICIA CUBILLO CARRILLO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2012



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.



Agradecimientos

Cuando un sueño se hace realidad no siempre se le atribuye al empeño que pongamos en realizarlo. Detrás de cada sueño siempre hay personas que nos apoyan y que creen en nosotros. Son seres especiales que nos animan a seguir adelante en nuestros proyectos brindándonos, de diferentes maneras, su solidaridad.

Gracias, primero a Dios por darme la vida y después el amor de esta, mi familia. Que me ha apoyado en momentos difíciles y ha sonreído conmigo en los días felices. Te doy gracias Dios por dejarme vivir.

A mis padres por haberme brindado la oportunidad de estudiar una Licenciatura, por sus esfuerzos, dedicación y eterna confianza.

Emelia Vázquez Paredes, gracias por tu apoyo, por ser mi fuerza para seguir adelante, este camino lo escogí por ti. Gracias por tu paciencia, por ayudarme sin pedirme nada a cambio, por acompañarme a todos lados y por estar ahí desvelándote conmigo. Siempre estaré contigo y recuerda que Te Amo Mamí.

Juan Aguilar Aguilar, gracias por tu apoyo, la orientación y por iluminar mi camino y darme la pauta para poder realizarme en mis estudios y en mi vida. A pesar de la distancia gracias por el cariño, por siempre estar cuando más te necesitamos. Recuerda que a pesar de todo Te Amo Papí.

A **Juan Daniel Aguilar Vázquez**. Hermano, no quiero ser un ejemplo para ti porque tu siempre serás mi ejemplo a seguir, siempre te admirare por tu forma de ser y pensar, por tu independencia y por aferrarte a lo que quieres; aunque no creas siempre te observo y se como te sientes. Gracias por apoyarme en esos momentos difíciles que hemos pasado y mi eterno agradecimiento por estar ahí, compartiendo tus conocimientos. Te Amo hermano.

A quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado en los momentos buenos y malos de mi vida, hago este triunfo compartido, sólo esperando que comprendan que mis ideales y esfuerzos son inspirados en cada uno de ustedes. Con amor, agradecimiento y respeto.

Familia Vázquez y Familia Aguilar



A través de nuestra vida junta, hubo tantos momentos felices e inolvidables que siempre quedaran en mi corazón. Gracias por haberme dado fortaleza cuando mi corazón estuvo a punto de desfallecer. Gracias por su apoyo y su comprensión.

Jesús F. Mera Hernández y Familia

Quiero agradecer a todos los buenos amigos, por que gracias a su apoyo, a su compañía, a sus buenos consejos y por estar siempre con una palabra de aliento cuando los he necesitado..., un beso y todas mis bendiciones.

Sarahi Ricaño Lara, Bruno Solís Cruz, Daniel Hernández Patlan.
Valeria Vilchis García, Vanessa García Cano, David Ladislao Sánchez
y a el Dr. Víctor Zendejas B.

A la sección de Microbiología: a mis profesoras y profesores...sus formas de enseñar, todas diferentes y características, me incentivaron en muchos sentidos a seguir adelante y sin ustedes esto no hubiera sido posible.

En especial Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo,
A la M. en C. Andrea A. Becerril O.
y a la M. en C. Ma. Guadalupe Avilés.

Al laboratorista de Microbiología Martín Neri Mondragón quien con el apoyo moral y su contribución fue posible la realización de esta tesis. Quien día a día se preocupa por darnos el mejor medio de cultivo y quien gracias a el durante mi desarrollo en el área de Microbiología pude observar adecuadamente los cambios en las pruebas bioquímicas. Gracias.

Un agradecimiento especial a la M. V. Z. Gabriela Fuentes Cervantes. Aunque no tuve la oportunidad de que fuera mi profesora en la asignatura de Parasitología, le agradezco sus consejos y el apoyo brindado al compartir las laminillas para la ilustración de este material. Gracias.



Dedicatoria

Este trabajo esta dedicado a mi mamá y a mi papá: quienes me hicieron madurar, aferrarme a mi sueño ahora alcanzado, a pensar en un futuro estable y lleno de alegrías, por apoyarme en todos sentidos sin pedirme nada a cambio. Perdónenme por todo aquello que les hizo enfadar algún día. Los amo, siempre estarán en mi corazón.



ÍNDICE

INDICE.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	IV
INDICE DE CUADROS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VI
INDICE DE FOTOS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
PROLOGO.....	XIV
1. Bioseguridad.....	1
2. Esterilización	
Introducción.....	7
Preparación de una suspensión bacteriana.....	8
Esterilización por calor húmedo en condiciones ideales.....	9
Esterilización por calor seco en condiciones ideales.....	13
Esterilización por filtración.....	15
Esterilización con lámpara UV.....	17
Técnica de comprobación de esterilización con óxido de etileno en productos plástico y telas.....	19
3. Desinfección	
Introducción.....	21
Procedimiento para determinación de CMI de un desinfectante comercial.....	23
Procedimiento para comprobar la efectividad de un desinfectante comercial en una superficie.....	26
4. Medios de cultivo	
Introducción.....	30
Método de preparación de medio de cultivo en caja con esterilización en autoclave.....	31
Procedimiento de preparación de medio de cultivo sólido enriquecido (Agar Sangre).....	32
Método de preparación de medio de cultivo en caja sin esterilización.....	33
Procedimiento de preparación de medio de cultivo sólido (Agar Sulfito Bismuto).....	34
Método de preparación de pruebas bioquímicas.....	37
5. Técnicas de sembrado	
Introducción.....	39
Técnica de sembrado por dilución (Técnica Americana).....	40
Técnica de extensión en superficie o sembrado masivo.....	42
Forma de manipular un cultivo en tubo.....	46
Inoculación de un medio de cultivo líquido.....	48
Inoculación de medios de cultivo sólido, semisólido	48



y líquido en tubo.....	
6. Tinciones	
Introducción.....	59
Preparación de un frotis bacteriano a partir de una muestra de un medio sólido.....	60
Preparación de un frotis bacteriano a partir de una muestra líquida	61
Método para realizar la tinción de Gram.....	63
Técnica para realizar la tinción de bacilos alcohol ácido resistentes (método de Ziehl-Neelsen).....	65
Técnica para la tinción de esporas (Método de Schaeffer-Fulton).....	67
Técnica para la tinción de cápsula (Tinción negativa).....	71
7. Pruebas Bioquímicas Primarias	
Introducción.....	73
Tinción de Gram.....	74
Prueba de Catalasa.....	78
Prueba de Oxidasa.....	80
Prueba de Motilidad.....	82
Prueba de Oxidación-Fermentación.....	84
8. Pruebas Bioquímicas Secundarias	
Introducción.....	86
Prueba de citratos de Simmons.....	88
Prueba de malonato de Ewing modificado.....	90
Prueba de urea (Stuart y Christensen).....	92
Prueba de SIM (Sulfhídrico, Indol, Motilidad).....	94
Prueba de MR-VP (Rojo de Metilo – Voges-Proskauer).....	97
Prueba de nitratos (NO ₃).....	100
Prueba de KIA (Agar con Hierro de Kligler) y Prueba de TSI (Agar con Azúcar triple y Hierro).....	103
Descarboxilación de aminoácidos.....	107
Prueba de MIO (Motilidad IndolOrnitina).....	107
Prueba de LIA (Agar Hierro Lisina).....	110
Prueba de Arginina.....	112
9. Pruebas de evaluación de antibióticos	
Introducción.....	114
Antibiograma por el Método Kirby-Bauer.....	116
Antibiograma por el Método de sensibilidad por dilución en tubo (MIC).....	119
10. Parásitos	
Introducción.....	123
<i>Giardia lamblia</i>	125
<i>Trichomonas vaginalis</i>	127
<i>Entamoeba histolytica</i>	129



<i>Cryptosporidium ssp</i>	131
<i>Trypanosoma cruzi</i>	133
<i>Leishmania chagasi</i>	135
<i>Toxoplasma gondii</i>	136
<i>Sarcocystis ssp</i>	138
Platelmintos, Nematelmintos, Artrópodos, Miasis y Garrapatas.....	139
11. Hongos	
Introducción.....	144
Técnica de microcultivo.....	146
Técnica de sembrado por puntos aislados para Hongos filamentosos.....	148
Preparación con cinta de celofán adhesiva.....	149
Preparación para realizar la tinción de azul de algodón lactofenol.....	150
Técnica de sembrado, observación y descripción morfológica de Levaduras.....	152
12. Virus	
Introducción.....	153
Técnica de inoculación en Saco vitelino.....	156
Técnica de inoculación en Membrana corioalantoidea.....	158
Técnica de inoculación en Cavidad alantoidea.....	160
Técnica de inoculación en Líquido amniótico.....	162
Conclusiones.....	164
Anexos.....	167
Referencias por Tema.....	209



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Desinfectantes y antisépticos comunes.....	22
Fig. 2	Formas de manipular una placa para su sembrado.....	39
Fig. 3	Colocación de la impronta a partir de una muestra líquida para realizar un sembrado por dilución.....	40
Fig. 4	Colocación de la impronta a partir de un cultivo en placa para realizar un sembrado por dilución.....	40
Fig. 5	Sembrado por dilución después de colocar la impronta.....	41
Fig. 6	Colocación de la impronta con hisopo a partir de un cultivo en placa para realizar un sembrado masivo.....	42
Fig. 7	Colocación de la impronta con hisopo estéril a partir de una muestra líquida para realizar un masivo.....	42
Fig. 8	Sembrado masivo después de colocar la impronta.....	43
Fig. 9	Colocación de la impronta con asa calibrada a partir de una muestra líquida y forma de realizar el sembrado masivo.....	44
Fig. 10	Forma de manipular un cultivo en tubo.....	46
Fig. 11	Formas de inoculación de medios de cultivo sólido en tubo.....	49
Fig. 12	Formas de inoculación de medios de cultivo semisólido y líquido en tubo.....	49
Fig. 13	Partes que componen al microscopio estereoscópico.....	51
Fig. 14	Estudio macroscópico de las colonias bacterianas.....	51
Fig. 15	Preparación de un frotis bacteriano a partir de una muestra de un medio sólido.....	60
Fig. 16	Preparación de un frotis bacteriano a partir de una muestra líquida.....	61
Fig. 17	Pasos de la tinción de Gram.....	63
Fig. 18	Pasos de la Técnica para realizar la tinción de BAAR.....	66
Fig. 19	Pasos de la Técnica para la tinción de esporas.....	68
Fig. 20	Forma de describir la forma y posición de la espora, así como el efecto que casusa esporulación en la célula bacteriana.....	69
Fig. 21	Pasos de la Técnica para la tinción de cápsula.....	71
Fig. 22	Esquema de la pared celular de bacterias Gram (+) y Gram (-).....	74
Fig. 23	Forma y agrupación bacteriana.....	76
Fig. 24	Diferentes disposiciones de los flagelos bacterianos.....	82
Fig. 25	Visión General del Mecanismo de acción antimicrobiana.....	115
Fig. 26	Técnica de colocación de los sensidiscos para un antibiograma.....	116
Fig. 27	Lectura de los halos de inhibición de un antibiograma por el Método Kirby-Bauer.....	117
Fig. 28	Esquema de <i>Giardia lamblia</i>	125



Fig. 29	Esquema de <i>Trichomonas vaginalis</i>	127
Fig. 30	Esquema de <i>Entamoeba histolytica</i>	129
Fig. 31	Esquema de <i>Cryptosporidium sp.</i>	131
Fig. 32	Esquema de <i>Trypanosoma cruzi</i>	133
Fig. 33	Esquema de <i>Leishmania chagasi</i>	135
Fig. 34	Esquema de <i>Toxoplasma gondii</i>	136
Fig. 35	Esquema de <i>Sarcocystis spp.</i>	138
Fig. 36	Algunas estructuras de los hongos filamentosos.....	145
Fig. 37	Algunas estructuras de los hongos levaduriformes.....	145
Fig. 38	Partes que conforman un microcultivo.....	147
Fig. 39	Descripción morfología macroscópica de la colonia de los hongo filamentosos.....	149
Fig. 40	Partes de un huevo embrionado.....	155
Fig. 41	Partes de una autoclave de gas.....	168
Fig. 42	Procedimiento para utilizar la autoclave de gas.....	169
Fig. 43	Preparación de una caja Petri para esterilización.....	170
Fig. 44	Preparación de una pipeta con tapón de algodón para esterilización.....	170
Fig. 45	Elaboración de un hisopo.....	171
Fig. 46	Preparación de par de hisopos de madera/algodón para esterilización.....	171
Fig. 47	Elaboración de capuchón para matraz o tubo.....	172
Fig. 48	Elaboración de tapón de algodón para matraz o tubo.....	172
Fig. 49	Partes que conforman un microscopio óptico.....	188



INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo.....	2
Cuadro 2.	Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo.....	2

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de los RPBI según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1 2002.....	3
Tabla 2.	Mecanismos de acción de algunos desinfectantes.....	22
Tabla 3.	Ejemplos de medios de cultivo según la clasificación de acuerdo a su aplicación y uso.....	31
Tabla 4.	Ejemplo de medios servidos en tubo.....	37
Tabla 5.	Consejos para una mejor visualización y manipulación de l microscopio óptico.....	189
Tabla 6.	Rango de dilución de antibióticos para la prueba de MIC.....	193
Tabla 7.	Continuación. Rango de dilución de antibióticos para la prueba de MIC.....	194
Tabla 8.	Clasificación de los antibióticos según su estructura química.....	195



ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1.	Laboratorio de Microbiología de la FESC- 1.....	5
Foto 2.	Rombo: Código de colores para sustancias.....	5
Foto 3.	Señalamiento de usos obligatorio en el laboratorio de Microbiología.....	5
Foto 4.	Contenedores de RPBI: punzocortantes y desechos empapados con Sangre.....	6
Foto 5.	Señalamiento de prohibición.....	6
Foto 6.	Localización de equipos de seguridad, auxilio y prevención.....	6
Foto 7.	Reglamento interno del Laboratorio.....	6
Foto 8.	Campana de flujo.....	6
Foto 9.	Señalamiento de ubicación de la salida de emergencia.....	6
Foto 10.	Preparación de una suspensión bacteriana.....	8
Foto 11.	Serie fotográfica: Utilización de la autoclave.....	10
Foto 12.	Continuación: Utilización de la autoclave.....	11
Foto 13.	Eliminación completa de <i>E. coli</i> utilizando el método de esterilización por calor húmedo.....	12
Foto 14.	Indicadores biológicos y químicos utilizados para monitorear y validar ciclos de esterilización por calor húmedo.....	12
Foto 15.	Crecimiento bacteriano antes de la esterilización por calor seco en Horno Pasteur.....	14
Foto 16.	Crecimiento bacteriano después de la esterilización por calor seco en Horno Pasteur.....	14
Foto 17.	Eliminación completa de <i>E. coli</i> utilizando el método de esterilización por filtración.....	16
Foto 18.	Eliminación de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando el método de esterilización por rayos UV.....	18
Foto 19.	Productos en CN antes de ser incubados a 37°C para comprobar su esterilidad.....	20
Foto 20.	Comprobación de la esterilidad con oxido de etileno de materiales termolábiles y no termolábiles (Después).....	20
Foto 21.	Concentración Mínima Inhibitoria del Benzal.....	25
Foto 22.	Delimitación del área (mesa de trabajo).....	27
Foto 23.	Hisopado antes del uso del benzal.....	27
Foto 24.	Cultivo antes del tiempo de acción del benzal.....	27
Foto 25.	Tiempo de acción del benzal sobre la superficie (5min.).....	27
Foto 26.	Muestreo después del tiempo de acción del benzal.....	27
Foto 27.	Cultivo después del tiempo de acción del benzal.....	27
Foto 28.	Muestreo de Estufa bacteriológica antes del uso del fenol al 5%.....	28
Foto 29.	Cultivo antes del tiempo de acción del fenol al 5%.....	28



Foto 30	Tiempo de acción (3 min) del Fenol al 5%.....	28
Foto 31	Muestreo de Estufa bacteriológica después del uso del Fenol al 5%.....	28
Foto 32	Cultivo después del tiempo de acción Fenol al 5%.....	28
Foto 33	Muestreo de manos antes del uso del Gel antibacterial.....	29
Foto 34	Cultivo antes del tiempo de acción del Gel antibacterial.....	29
Foto 35	Aplicación del desinfectante (Gel antibacterial).....	29
Foto 36	Muestreo de manos después del uso del Gel antibacterial.....	29
Foto 37	Cultivo después del tiempo de acción del Gel antibacterial.....	29
Foto 38	Serie fotográfica. Preparación de los medios de cultivo.....	35
Foto 39	Serie fotográfica de vaciado de medios de cultivo en placa.....	36
Foto 40	Medios sólidos servidos en tubo	38
Foto 41	Medios semisólidos.....	38
Foto 42	Medios líquidos.....	38
Foto 43	Serie fotográfica colocación de la impronta de bacteria para realizar estriado del medio de cultivo en placa.....	45
Foto 44	Serie fotográfica de la manipulación de un medio de cultivo en tubo.....	47
Foto 45	Rotulación de los medios de cultivo en placa o en tubo.....	48
Foto 46	Inoculación por picadura.....	50
Foto 47	Inoculación por estría en agar inclinado.....	50
Foto 48	Crecimiento de <i>E. coli</i> en Agar Mac Conkey.....	52
Foto 49	Crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> en Agar Mac Conkey.....	52
Foto 50	Crecimiento de <i>E. coli</i> en Agar Verde Brillante.....	53
Foto 51	Crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> en Agar Verde Brillante.....	53
Foto 52	Crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> en Agar Salmonella y Shigella.....	54
Foto 53	Crecimiento de <i>E. coli</i> en Agar Salmonella y Shigella.....	54
Foto 54	Crecimiento de <i>E. coli</i> en Agar Eosina y Azul de Metileno.....	55
Foto 55	Crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> en Agar Eosina y Azul de Metileno.....	55
Foto 56	Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Sales y Manitol.....	56
Foto 57	Crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en Agar Sales y Manitol.....	56
Foto 58	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Agar Cetrimida.....	57
Foto 59	Fluorescencia bajo luz UV <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57



Foto 60	Crecimiento masivo de <i>Escherichia coli</i> en Agar de Nutritivo.....	58
Foto 61	Tipos de hemolisis en Agar Sangre.....	58
Foto 62	Serie fotográfica donde se observa los diferentes pasos de una tinción.....	62
Foto 63	Cocobacilos Gram (-) en pares y sin agrupación.....	64
Foto 64	Bacilos largos Gram (+) sin agrupación; con esporas deformantes terminales.....	64
Foto 65	Bacilo ácido-alcohol resistentes. (Tinción de Ziehl-Neelsen).....	67
Foto 66	Tinción de esporas A.....	70
Foto 67	Tinción de esporas B.....	70
Foto 68	Cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i>	72
Foto 69	Bacilos Gram (-) sin agrupación.....	77
Foto 70	Cocos Gram (+) en racimos.....	77
Foto 71	Bacilos Gram (-) curvos (forma de coma).....	77
Foto 72	Técnica en placa para la prueba de catalasa.....	79
Foto 73	Técnica en tubo para la prueba de catalasa.....	79
Foto 74	Técnica en sensidisco para la prueba de oxidasa.....	81
Foto 75	Presentaciones del reactivo de lectura para la prueba de oxidasa.....	81
Foto 76	Preparación de la técnica de motilidad por gota suspendida.....	83
Foto 77	Motilidad positiva.....	83
Foto 78	Prueba de Oxidación – Fermentación.....	85
Foto 79	Pruebas Bioquímicas Secundarias.....	87
Foto 80	Prueba de Citratos de Simmons.....	89
Foto 81	Prueba de Malonatos de Ewing modificado.....	91
Foto 82	Caldo urea de Stuart.....	93
Foto 83	Agar urea de Christensen.....	93
Foto 84	SIM: Prueba de indol y motilidad.....	96
Foto 85	SIM: Prueba de H ₂ S.....	96
Foto 86	Prueba de Rojo de Metilo y Voges Proskauer.....	99
Foto 87	Prueba de Voges Proskauer.....	99
Foto 88	Prueba de Nitratos.....	102
Foto 89	Prueba de Nitratos con campana de Durham.....	102
Foto 90	Prueba de KIA y algunos de sus probables resultados.....	106
Foto 91	MIO. Descarboxilación de la ornitina.....	109
Foto 92	Descarboxilación de la lisina y producción de H ₂ S.....	111
Foto 93	Desaminación y descarboxilación de la lisina.....	111
Foto 94	Descarboxilación de la arginina.....	113
Foto 95	Antibiograma en MH- Sangre correctamente realizado para <i>Streptococcus pyogenes</i>	118
Foto 96	Antibiograma para <i>Staphylococcus aureus</i>	118



Foto 97	Antibiograma correctamente realizado para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	118
Foto 98	Antibiograma para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con errores en la técnica.....	118
Foto 99	Antibiograma por el método de sensibilidad por dilución en tubo.....	122
Foto 100	Trofozoito de <i>Giardia lamblia</i>	126
Foto 101	Quiste de <i>Giardia lamblia</i>	126
Foto 102	Trofozoito de <i>Trichomonas vaginalis</i>	128
Foto 103	Trofozoito de <i>Entamoeba histolytica</i>	130
Foto 104	Quiste de <i>Entamoeba histolytica</i>	130
Foto 105	Ooquiste de <i>Cryptosporidium sp.</i>	132
Foto 106	Tripomastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	134
Foto 107	Amastigote de <i>Leishmania chagasi</i>	134
Foto 108	Quiste de <i>Toxoplasma gondii</i>	137
Foto 109	Bradizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i>	137
Foto 110	Ooquiste muscular de <i>Sarcocystis spp.</i>	138
Foto 111	<i>Fasciola hepática</i>	139
Foto 112	Lavas cisticercoides de <i>Taenia solium</i>	139
Foto 113	<i>Hymenolepis nana</i>	139
Foto 114	<i>Dipylidium caninum</i>	139
Foto 115	<i>Ancylostoma caninum</i>	140
Foto 116	<i>Ascaris lumbricoides</i> (hembra).....	140
Foto 117	<i>Ascaris lumbricoides</i> (macho).....	140
Foto 118	<i>Enterobius vermicularis</i> (hembra grávida).....	140
Foto 119	Liendre (huevos) de <i>Pediculus humanus capitis</i> . Localización: Piojo de la cabeza.....	141
Foto 120	<i>Phthirus pubis</i>	141
Foto 121	<i>Cimex lectularius</i>	141
Foto 122	<i>Ctenocephalides felis</i>	142
Foto 123	Larva de <i>Dermatobia homini</i>	142
Foto 124	<i>Amblyoma spp.</i>	142
Foto 125	<i>Otobius spp.</i>	143
Foto 126	<i>Bophilus spp.</i>	143
Foto 127	<i>Sarcoptes scabiei</i>	143
Foto 128	Serie fotográfica de microcultivos micológicos.....	147
Foto 129	Cultivo en SDA de <i>Aspergillus niger</i>	148
Foto 130	Cultivo en SDA de <i>Aspergillus flavus</i>	148
Foto 131	Toma de una muestra de hongo filamentoso para realizar una preparación con cinta de celofán adhesiva.....	150
Foto 132	Serie fotográfica de Hongos filamentosos teñidos con Azul de Algodón Lactofenol.....	151
Foto 133	Morfología colonial en SDA de una levadura: <i>Candida albicans</i>	152



Foto 134	Tinción de Gram (40x) de una levadura: <i>Candida albicans</i>	152
Foto 135	Embrión de pollo de 10 días.....	155
Foto 136	Vía de inoculación por Saco vitelino.....	157
Foto 137	Inoculación en membrana Corioalantoidea.....	159
Foto 138	Inoculación en Cavidad alantoidea.....	161
Foto 139	Inoculación en cavidad amniótica.....	163
Foto 140	Inoculación e incubación de medio de cultivo Cooked meat.....	175



LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Agar Dextrosa Papa
AST	Agar Soya Trypticaseina
ATP	Trifosfato de adenosina
BD	Becton, Dickinson and Company
CBHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
cm	Centímetro
CN	Caldo Nutritivo
CST	Caldo Soya Trypticaseina
Conc.	Concentrado (a)
Dr.	Doctor
ES	Estufa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fe	Hierro
Fig.	Figura
g	Gramo
H ₂ O	Agua
HEPA	High Efficiency y Particulate Air
hrs	Horas
I ₂	Yodo
KI	Yoduro de potasio
KIA	Agar Hierro de Kligler
L	Litro
lb	Libra de presión
LIA	Agar Hierro Lisina
MA	Manos
ME	Mesa
MH	Agar MuellerHinton
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minuto
MIO	Motilidad, Indol, Ornitina
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MR-VP	Rojo de metilo - Voges-Proskauer
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OF	Oxidación- Fermentación
OFF	Apagado
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Prendido
p.ej.	Por ejemplo
RNA	Acido Ribonucleico
RPBI	Residuos Biológicos Potencialmente Infecciosos
s	Segundo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>



SDA	Sabouraud Dextrosa Agar
SIM	Sulfuro Indol Movilidad
SSF	Solución Salina Fisiológica
TSI	Agar hierro triple azúcar
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UV	Ultra Violeta
μm	Micrómetros
$^{\circ}\text{C}$	Grado Centígrados
$^{\circ}\text{F}$	Grados Fahrenheit
'	Minutos
\leq	Menos o igual a
3D	Tercera dimensión



PRÓLOGO

Una guía es un documento o persona que orienta o dirige algo hacia un objetivo. Puede utilizarse en múltiples contextos (guía turística o guía de viaje, guía didáctica o guía de trabajo). Por ejemplo existen guías prácticas que contienen orientaciones básicas para realizar determinadas tareas o aprendizajes. Los manuales son textos utilizados como medio para coordinar, registrar datos e información en forma sistémica y organizada. También es el conjunto de orientaciones o instrucciones con el fin de guiar o mejorar la eficacia de las tareas a realizar.

La “Guía Práctica de Microbiología General” no es un manual, ha sido concebida como un material educativo que va a servir para afianzar conocimientos, desarrollar o fortalecer habilidades y destrezas, así como orientar la autoeducación permanente. Por ello se ubica como un material de lectura independiente, desempeña un papel motivador, se orienta a facilitar la lectura comprensiva, crear hábitos y actitudes, así como a desarrollar y fortalecer destrezas para el procesamiento de información, adquisición y generación de conocimientos.

Este guía explica minuciosamente como deben realizarse cada uno de los métodos y técnicas utilizadas por docentes para enseñar de forma práctica y didáctica que se apegan a los planes de estudio la asignatura de Microbiología General I/ Microbiología General.

Hoy en día la Microbiología es un área que se ocupa del estudio de los microorganismos y de sus interacciones con otros microorganismos y con el medio ambiente. El ser humano está en contacto diariamente con microorganismos como son las bacterias, hongos, virus y parásitos; algunos forman parte de una flora normal de cuerpo humano y otros son propios de una contaminación de superficies inertes o biológicas. Algunos de estos microorganismos causan enfermedad al ser humano, por lo que es importante su diagnóstico así como la aplicación de un tratamiento en superficies inertes o técnicas de eliminación (aplicación de antimicrobianos, fungicidas, métodos de esterilización, o desinfectantes). Otros de estos microorganismos son de importancia en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, entre otras (por sus aportaciones nutritivas, curativas o estéticas). Áreas en las cuales se desempeñaran profesionalmente el QFB, BQD y Lic. Farmacia.

Como estudiante de la licenciatura de Q.F.B. en la cual se incluye el estudio microbiológico he observado frecuentemente que los alumnos que tienen el primer contacto con el área de la Microbiología a pesar de una búsqueda bibliográfica no encuentran las técnicas y los métodos mas descriptivos, sino que están sintetizados y no son claros ya que se maneja terminología que en la mayoría de las ocasiones no comprenden por ser temas a ver durante el curso de la asignatura de Microbiología General I (QFB)/ Microbiología General (BQD y Lic. Farmacia).



Hay ocasiones en que los alumnos no conocen la interpretación de los resultados que obtienen durante la reproducción de los métodos y las técnicas; los resultados son más cualitativos que cuantitativos por lo que la observación y comparación serán las habilidades a fortalecer al presentar una serie de imágenes de los posibles resultados a obtener.

El objetivo general de la Guía Práctica de Microbiología General es que el alumno inicie en el conocimiento básico de los microorganismos, con sus características morfológicas, de crecimiento y control, y adquiera las habilidades necesarias para la aplicación y uso de técnicas de una forma clara y didáctica.

La presente guía, constituye un material de apoyo al desarrollo de la asignatura y está organizada en seis temas: Tema 1: Bioseguridad, Tema 2: Esterilización, Tema 3: Desinfección, Tema 4: Medios de Cultivo, Tema 5: Técnicas de sembrado, Temas 6: Tinciones, Tema 7: Pruebas bioquímicas primarias, Tema 8: Pruebas bioquímicas secundarias, Tema 9: Pruebas de evaluación de antibióticos, Tema 10: Parásitos, Tema 11: Hongos, Tema 12: Virus.

Aplicada comprende: Microbiología Clínica, Microbiología Alimentaria, Microbiología en la Industria Farmacéutica y Cosmética y de Trabajo de Campo; siendo una herramienta de consulta permanente tanto para la docencia como en la vida laboral.

Q.F.B. Karla Edith Aguilar Vázquez



TEMA 1

BIOSEGURIDAD

En el laboratorio de Microbiología debe ser primordial proteger la seguridad del personal de los riesgos relacionados con el manejo y estudio de los microorganismos así como de los residuos biológicos infecciosos que se generan con estas actividades; y proteger el medio ambiente y a la población que pudiera estar en contacto con estos residuos dentro y fuera de sus instalaciones. Por lo que la bioseguridad se define como el conjunto de medidas preventivas (conocimientos, técnicas y equipamiento) con el objetivo de reducir dichos riesgos.

Según la capacidad de causar infecciones en humanos, los microorganismos se clasifican en cuatro grupos de riesgo (Cuadro 1) (Gamazo, López-Goñi y Díaz, 2005). En un laboratorio de prácticas de microbiología se sugiere trabajar con microorganismos del grupo 1; pero también dependerá de las adecuaciones de las instalaciones, del equipo, las prácticas y los procedimientos necesarios para trabajar con seguridad con las que cuente dicho laboratorio. Con lo que podemos clasificar a los laboratorios de acuerdo a niveles de bioseguridad que brinden (Cuadro 2) (OMS, 2005).

El laboratorio de Microbiología es un lugar donde se pueden manejar y examinar microorganismos con normas establecidas. Uno de los principales objetivos cuando un estudiante esta en contacto por primera vez con microorganismos, es enseñarlo a manipularlos adecuadamente.

Aunque los microorganismos con los que se trabaje no sean considerados patógenos, todos los cultivos de todos los microorganismos deben ser manejados bajo normas de bioseguridad. Una vez manipulados y estudiados los microorganismos es de suma importancia la forma de eliminarlos de objetos, instrumentos y equipos por el manejo biológico que presentan. Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica de asépsia y por tanto se requiere un ambiente limpio y ordenado. Por ello, se debe de trabajar bajo condiciones de esterilidad. En el laboratorio de Microbiología encontraremos estas condiciones en cámaras de seguridad biológica, o bien, en la proximidad de la llama de un mechero de alcohol o de gas.



Cuadro 1 Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo

Grupo de riesgo 1 (*riesgo individual y poblacional escaso o nulo*)

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.

Grupo de riesgo 2 (*riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo*)

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo 3 (*riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo*)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Grupo de riesgo 4 (*riesgo individual y poblacional elevado*)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ª edición, Organización Mundial de la Salud, Ginebra Suiza, 2005.

Cuadro 2 Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo.

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas. CSB: cámara de seguridad biológica.

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ª edición, Organización Mundial de la Salud, Ginebra Suiza, 2005.




El laboratorio deberá de estar diseñado de manera que permita fácilmente su limpieza, debe contar con tarjas y grifos, con el material y equipo mínimo necesario el cual deberá de estar ordenado. Su entrada debe ser restringida solo para el personal autorizado para su permanencia dentro de él. El uso de bata es obligatorio ya que es una barrera de protección en caso de derrames o contaminación química o biológica, al igual de cubre bocas, guantes, trajes de protección especiales; el uso de estas barreras dependerá del nivel de riesgo donde se encuentre clasificado el microorganismo a trabajar. El trabajo dentro de las instalaciones debe ser tranquilo y siempre seguro en lo que se esta realizando, evitando así accidentes o riesgos biológicos.

Después del trabajo con los microorganismos queda una serie de material desechable, vidriería, entre otros; que se encuentran contaminados. Por lo que se debe de conocer el conjunto de dispositivos y procedimientos adecuados para un depósito y eliminación sin riesgo.



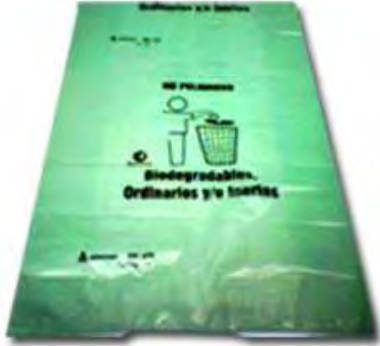
Dentro de la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, se detalla el manejo y eliminación de estos Residuos Biológicos Potencialmente Infecciosos (RPBI).

En el laboratorio de microbiología los principales RPBI que se generan son cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos, materiales desechables y de vidrio para contener, inocular, transferir y mezclas cultivos de dichos agentes. Estos deberán de ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen su eliminación y poder realizar su disposición final en sitios autorizados (ver tema 2 y 3). Para eliminar los desechos la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 maneja colores de bolsas y/o contenedores dependiendo el tipo de residuo a eliminar. A continuación se describe brevemente esta disposición por colores:

Tabla 1. Clasificación de los RPBI según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Tipo de residuos	Estado físico	Envasado/ color
Punzocortantes: Agujas de jeringas, lancetas, navajas de bisturí. Con sangre y sin sangre. Material de curación empapada en sangre o líquidos corporales. Materiales desechables que contengan secreciones de pacientes sospechosos de enfermedades infecciosas. Materiales desechables usados para el cultivo de agentes infecciosos.	Sólido	



Tipo de residuos	Estado físico	Envasado/ color
Patológicos: placentas, partes de tejido humano, partes del cuerpo humano. Cadáveres o parte del cuerpo de animales (que no se encuentren en formol).	Sólido	
Muestras para análisis de laboratorio excluyendo orina y excremento	Líquido	
Materiales libres de todo lo anterior (papel, cartón, plástico, desecho de alimentos, entre otros).	Sólidos	

No solo debemos de hacer énfasis al manejo adecuado de los RPBI y de los microorganismos, si no también la seguridad en caso de incendios, problemas eléctricos; el manejo, almacenamiento y la eliminación de compuestos químicos y sustancias reactivas, y las técnicas para levantar o desplazar con seguridad objetos pesados.

Las causas de accidentes son debido al incumplimiento de los estándares de seguridad y regulaciones de seguridad.



Foto 1. Laboratorio de Microbiología de la FESC-1



Foto 2. Rombo: Código de colores para sustancias.

Foto 3. Señalamiento de usos obligatorio en el laboratorio de Microbiología (cubre bocas, guantes, cofia y bata respectivamente).



Foto 4. Contenedores de RPBI: punzocortantes y desechos empapados con sangre.



Foto 5. Señalamiento de prohibición.



Foto 6. Localización de equipos de seguridad, auxilio y prevención.



Foto 7. Reglamento interno del Laboratorio.



Foto 8. Campana de extracción.



Foto 9. Señalamiento de ubicación de la salida de emergencia.



TEMA 2

ESTERILIZACIÓN

La esterilización es un proceso de eliminación de todo tipo de microorganismos y que asegura la ausencia absoluta de cualquier forma viviente. (Aquiahuatl Ramos, Pérez Chabela. 2004.). Se logra por medios físicos y químicos.

Los métodos físicos de esterilización son:

- Incineración: el material se reduce a cenizas, se aplican temperaturas desde los 870 a 980°C (p. ej. Flamear el asa bacteriológica después de su uso, incineración en muflas, hornos para la eliminación residuos sólidos orgánicos y algunos inorgánicos infecciosos).
- Calor húmedo: vapor bajo presión (autoclave). Para esterilizar principalmente desechos biológicos peligrosos y objetos termoestables. Las condiciones más utilizadas son 121°C, 15 lb, 15 min.
- Calor seco: se utilizan estufas de calor seco, el cual se genera con resistencias eléctricas. Requiere periodos de exposición prolongados de 1.5 – 3 horas y temperaturas superiores de 160 - 180°C, a diferencia de las utilizadas en el calor húmedo. Se puede esterilizar material de vidrio, aceites, vaselina o polvos.
- Filtración: puede ser de líquidos. Los líquidos se pasan a través de una membrana de acetato o nitrilo de celulosa por el efecto de vacío. El aire por mediante filtros diseñados para eliminar microorganismos de más de 0.3µm. método de elección para soluciones de antibióticos, vacunas.
- Radiación: las radiaciones ionizantes como los rayos gamma rayos X tienen una longitud de onda corta y energía transportan más energía comparada con las radiaciones no ionizantes. Estas radiaciones penetran profundamente pero pueden requerir horas para esterilizar grandes volúmenes. Utilizadas para materiales desechables como jeringas, guantes o catéteres.

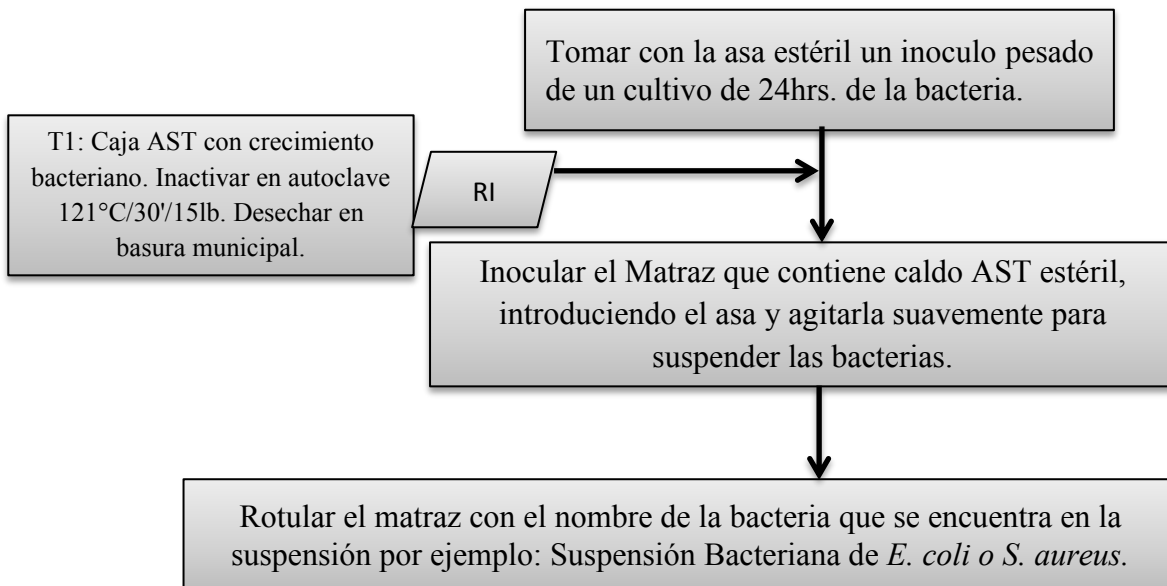
Las radiaciones no ionizantes tienen longitud de onda mayor. El mejor ejemplo de radiación no ionizante es la luz ultravioleta (UV). La luz lesionada el DNA de las células expuestas por que forman enlaces entre bases de pirimidina adyacentes. La longitud de onda UV más eficaz para eliminar a los microorganismo es de alrededor de 260nm; como no es muy penetrable los microorganismos deberán estar expuestos directamente a los rayos para que mueran.



Métodos químicos:

- El agente esterilizante químico mas común es el óxido de etileno, que se utiliza en forma de gas para la esterilización de objetos sensibles al calor.
- También se utiliza formaldehído en forma gaseosa y peróxido de hidrógeno para esterilizar filtros HEPA.
- Otro agente es el glutaraldehído que es un agente esporicida en 3-10hrs., este es muy utilizado para equipos médicos ya que es un agente que no corroe algunos materiales como micas, metal o goma.

Técnica de preparación de una suspensión bacteriana para su posterior utilización en algunos métodos de esterilización.



R1: Residuo 1

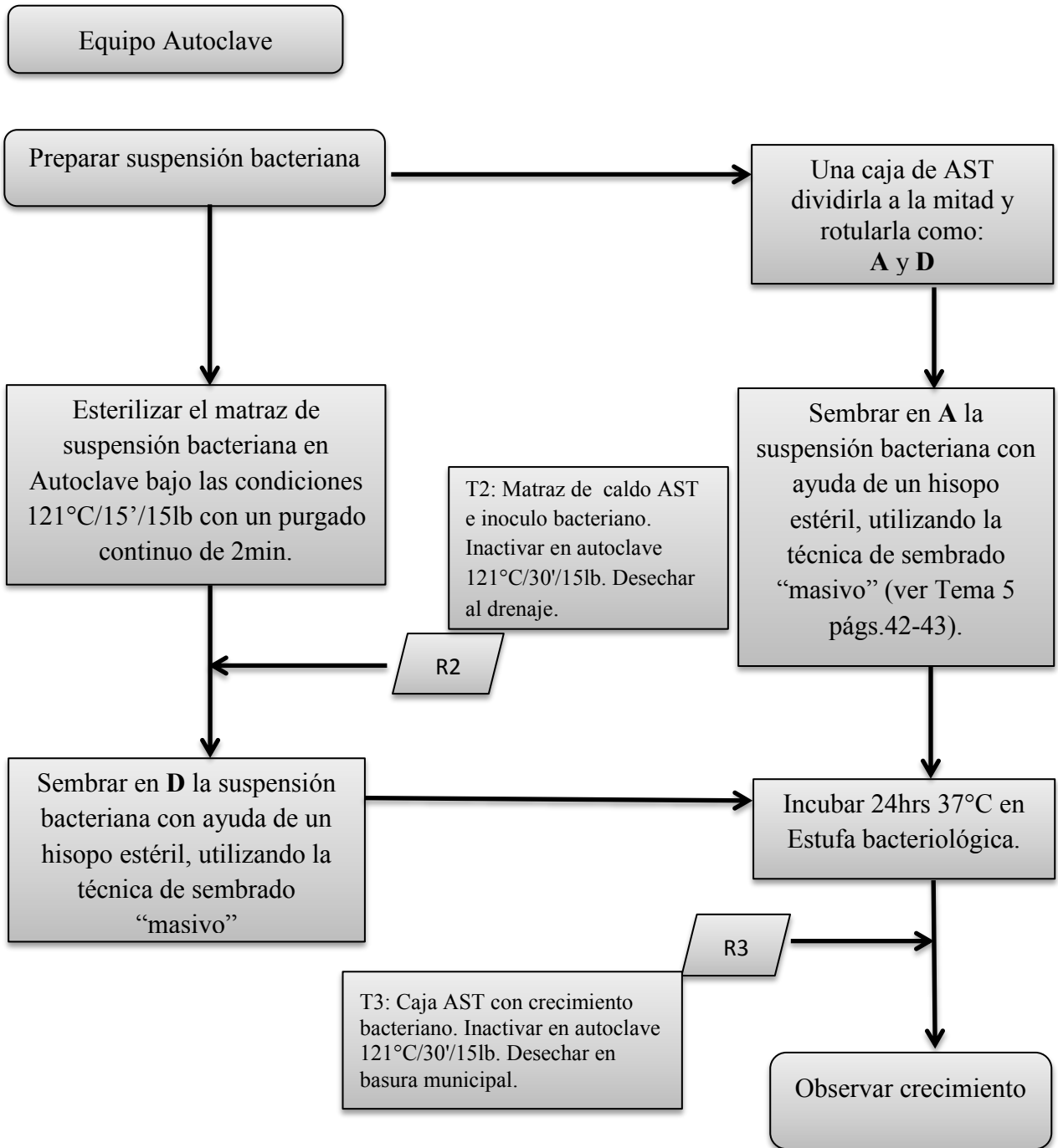
T1: Tratamiento 1



Foto 10. Preparación de una suspensión bacteriana.



Método 1: Esterilización por calor húmedo a condiciones ideales.



R2: Residuo 2
T2: Tratamiento 2
R3: Residuo 3
T3: Tratamiento 3
A: Antes
D: Después



Encendido de la autoclave: girar la perilla en calentamiento alto.



Preparar el material a esterilizar.



Colocación de la manguera de descarga aire/vapor.



Nivelación de las tapa para evitar fugas de vapor



Cerrado de la autoclave.



Purgado continuo.

Foto 11. Serie fotográfica utilización de la autoclave (Descripción detallada Anexo 1)



Esterilización en autoclave 15lb de presión, 121°C (250°F) y 15min.



Apagado de la autoclave.



Esperar a que la Autoclave se enfríe a temperatura ambiente.



Apertura de la autoclave con un mango de apoyo.



Retiro de la tapa direccionando de modo que el vapor caliente no tenga contacto con las manos.



Material esterilizado.

Foto 12. Continuación: Utilización de la autoclave (Descripción detallada Anexo 1)



Foto 13. Resultados obtenidos al comprobar la eliminación completa de *E. coli* utilizando el método de esterilización por calor húmedo



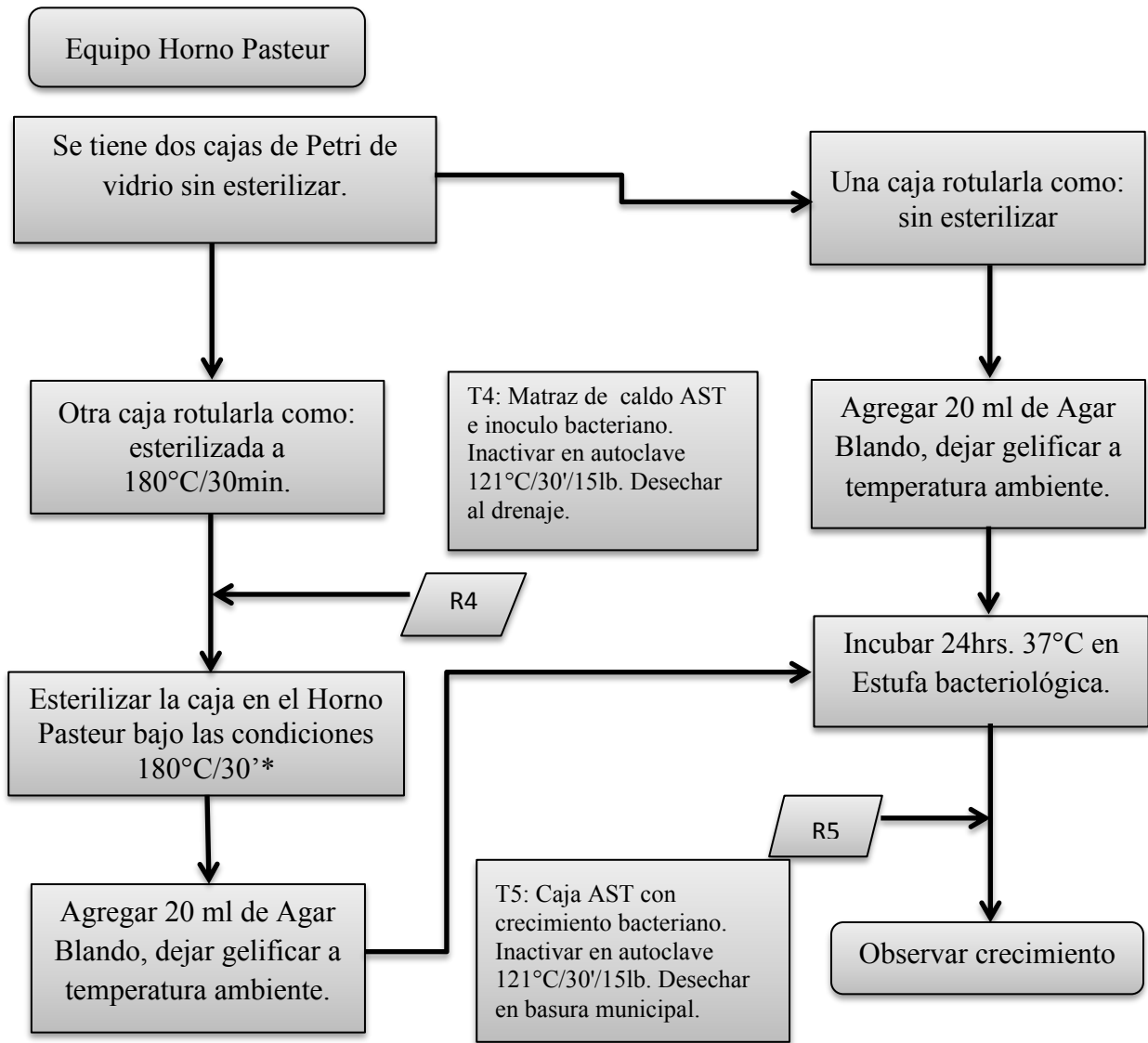
Foto 14. Indicadores biológicos y químicos utilizados para monitorear y validar ciclos de esterilización por calor húmedo.

Biológicos: esporas de *Bacillus stearothermophilus* o *B. subtilis* (amplolletas).

Químicos: sustancias químicas que cambian de color si se cumple un elemento clave del proceso de esterilización (papel especial, cintas autoadhesivas)



Método 2: Esterilización por calor seco a condiciones ideales



*Nota: Se pueden manejar otros tiempos (10, 15, 20min.)

R4: Residuo 4
T4: Tratamiento 4
R5: Residuo 5
T5: Tratamiento 5

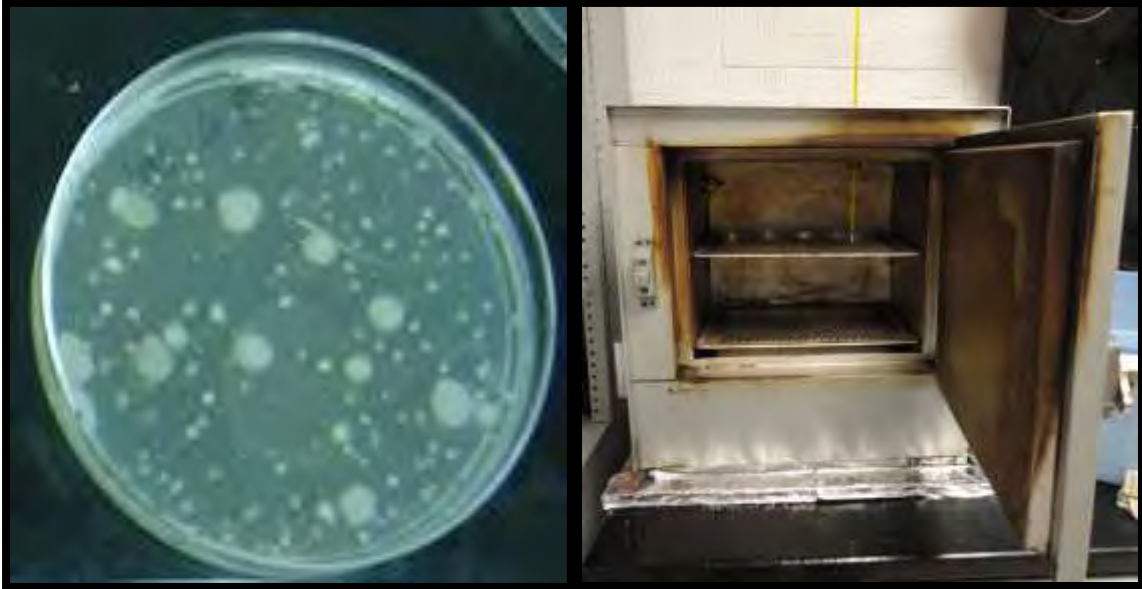


Foto 15. Resultados obtenidos al comprobar la contaminación bacteriana presente en una caja Petri de vidrio antes de ser sometida a esterilización por calor seco en Horno Pasteur: Observándose crecimiento y diferentes morfologías coloniales.

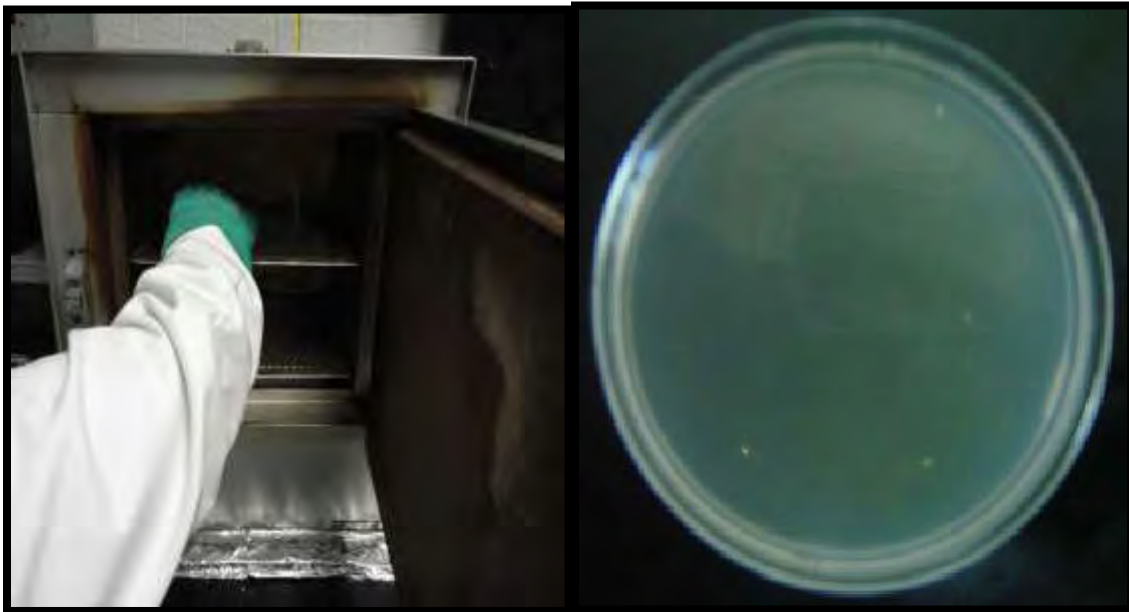
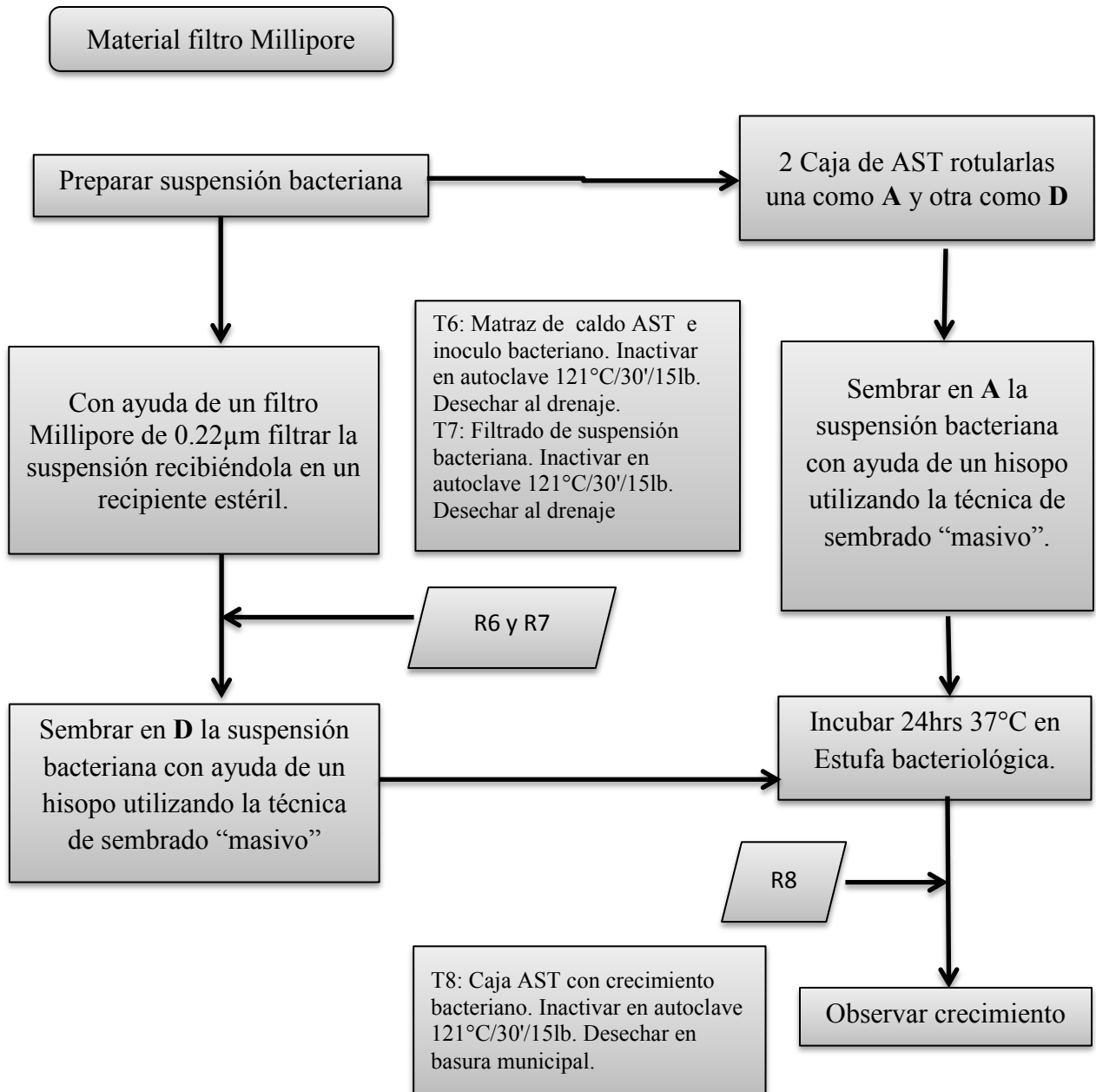


Foto 16. Resultados obtenidos al comprobar la eliminación de bacterias presente en la caja Petri de vidrio. Utilizando el método de esterilización por calor seco: después de someterse a las condiciones ideales (30min y 180°C en Horno Pasteur) sin crecimiento de bacteriano.



Método 3: Esterilización por Filtración



- R6: Residuo 6
- T6: Tratamiento 6
- R7: Residuo 7
- T7: Tratamiento 7
- R8: Residuo 8
- T8: Tratamiento 8
- A: Antes
- D: Después

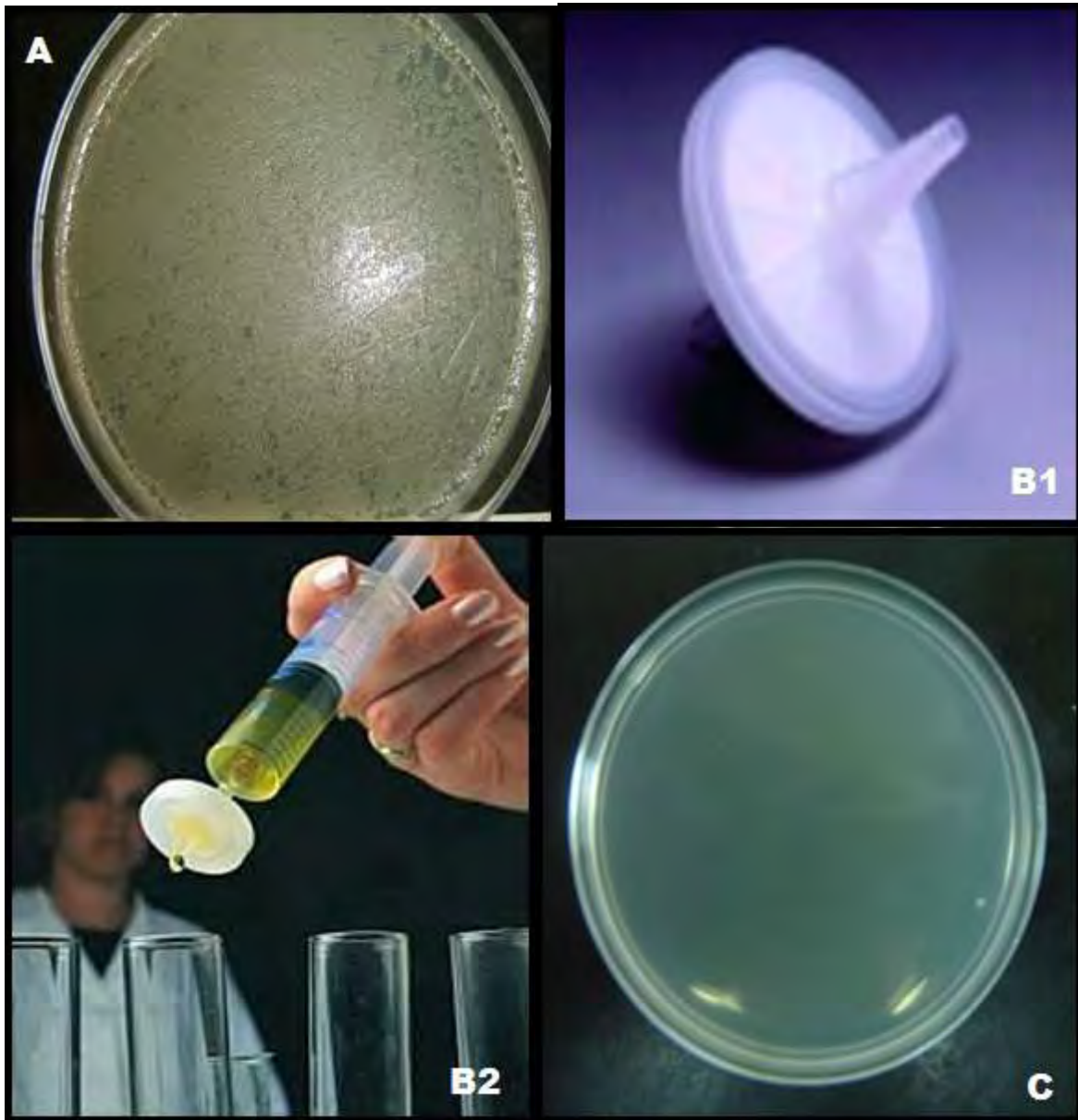
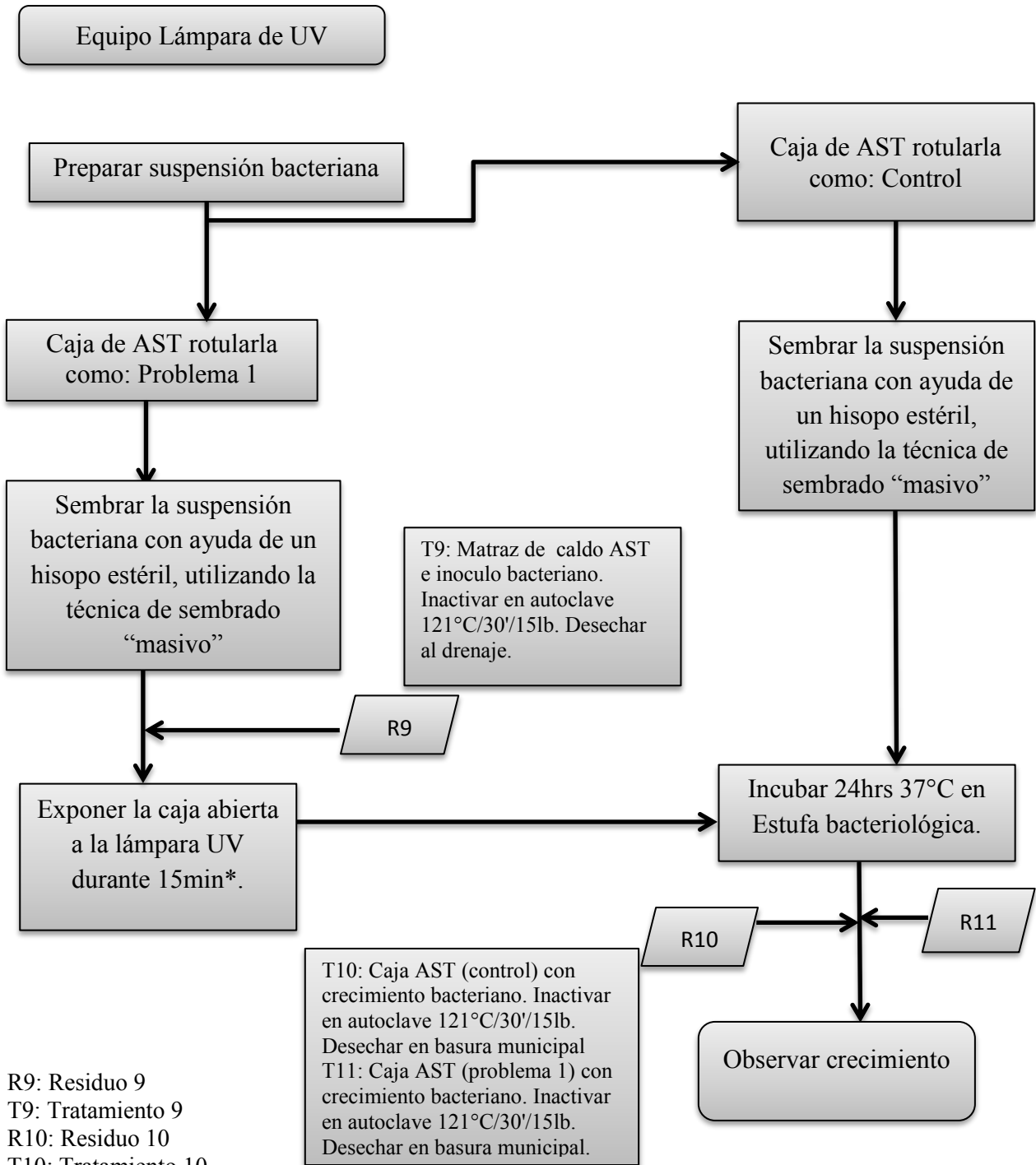


Foto 17. Serie fotográfica de resultados obtenidos al comprobar la eliminación completa de *E. coli* utilizando el método de esterilización por filtración (**B1** y **B2** filtro Millipore de $0.22\mu\text{m}$): **A**) antes de ser filtrada la suspensión bacteriana (Crecimiento de *E. coli*) y **C**) después de ser filtrada (sin crecimiento de *E. coli*).



Método 4: Esterilización por Rayos UV



R9: Residuo 9
T9: Tratamiento 9
R10: Residuo 10
T10: Tratamiento 10
R11: Residuo 11
T11: Tratamiento 11

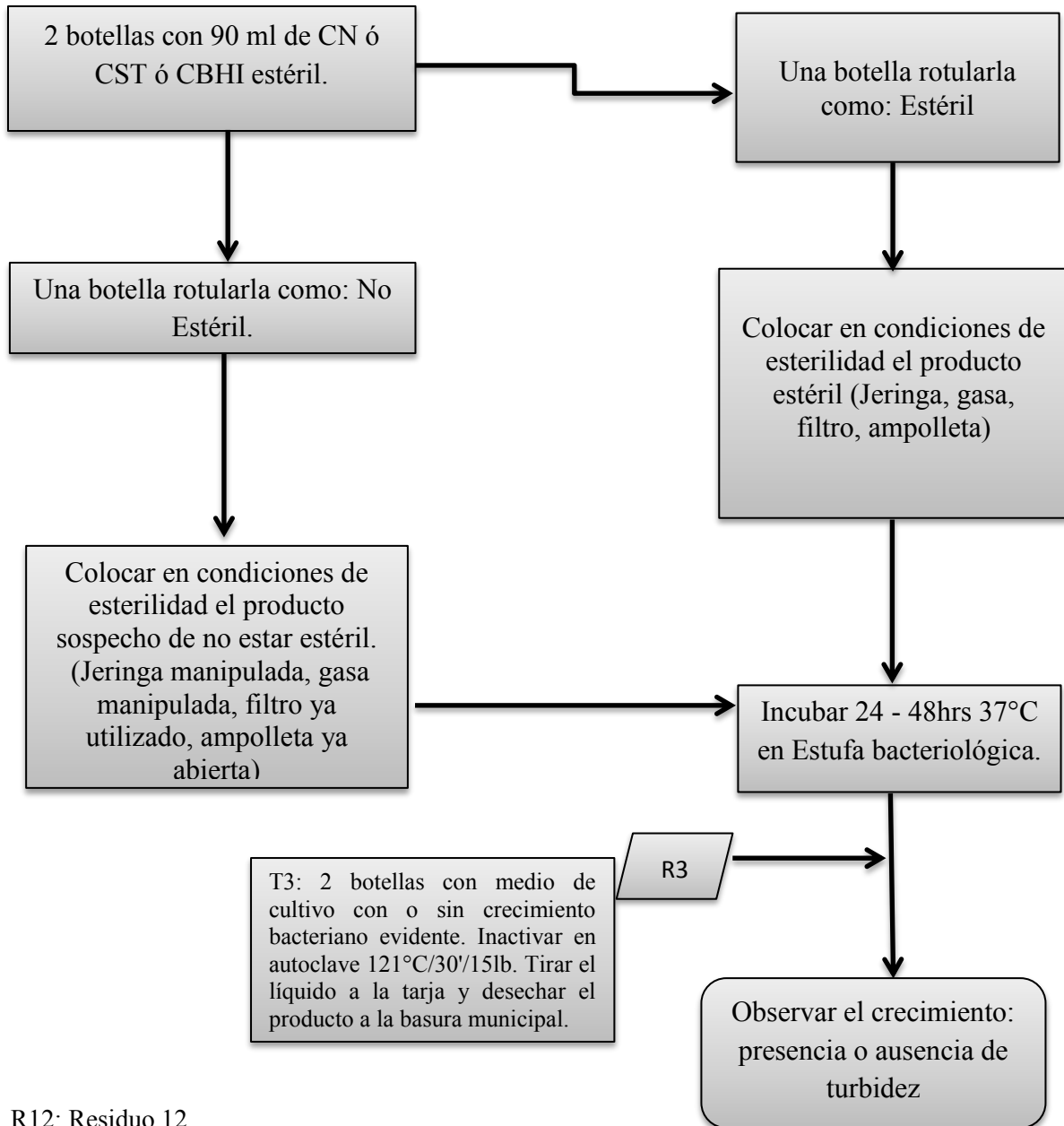
***Nota:** Se pueden manejar diferentes tiempos (10, 20,30 min.), para observar si entre mas tiempo de exposición die la cantidad de crecimiento bacteriano.



Foto 18. Serie fotográfica de resultados obtenidos al comprobar la eliminación completa de *S. aureus* utilizando el método de esterilización por rayos UV: antes de ser expuesta la suspensión bacteriana (Crecimiento de *S. aureus*) y después de ser expuesta en tiempos de 5 y 15 min. (Con crecimiento de *S. aureus*). Se concluye que la longitud de onda de la lámpara UV no fue suficiente para la eliminación de la bacteria.



Técnica de comprobación de la esterilización con oxido de etileno en productos plástico y telas.



R12: Residuo 12
T12: tratamiento 12

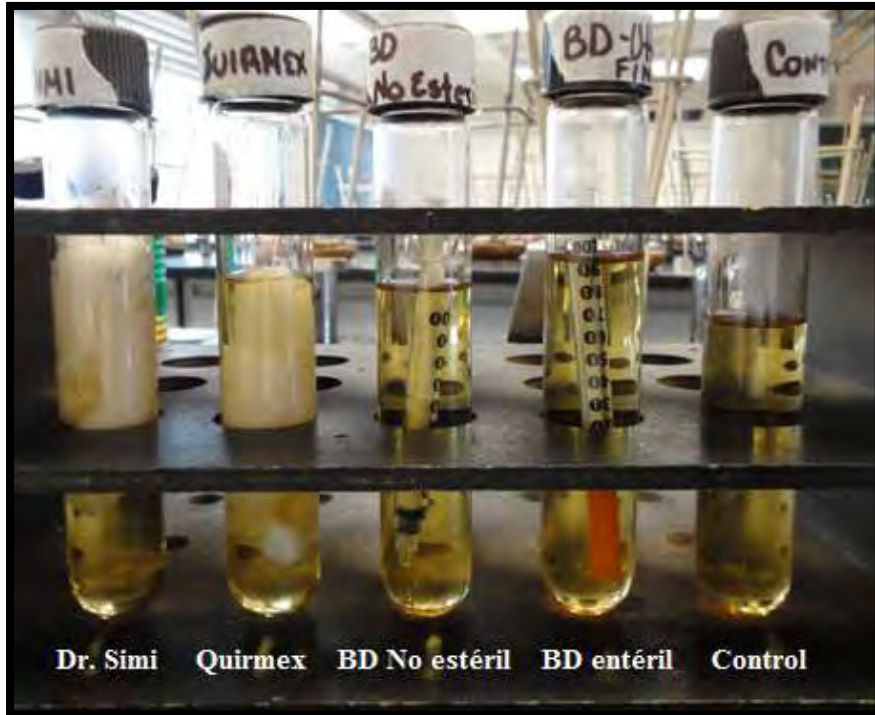


Foto 19. Productos en CN antes de ser incubados a 37°C para comprobar su esterilidad. Se observa que el medio de cultivo es translúcido.

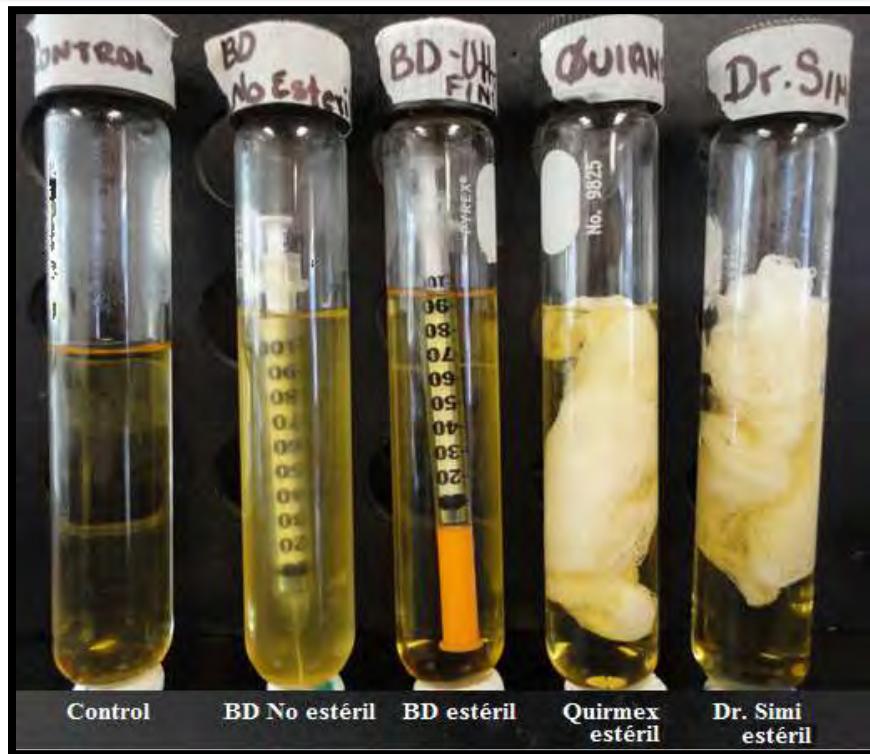


Foto 20. Resultados obtenidos después de 24hrs. de incubación a 37°C. Se observa crecimiento bacteriano solo en la jeringa no estéril (presencia de turbidez).



TEMA 3

DESINFECCIÓN

La desinfección es el proceso de eliminación de la carga microbiana sobre los objetos o superficies inanimadas con la excepción de las formas esporuladas (Aquihuatl Ramos, Pérez Chabela; 2004.). Al igual que en la esterilización, la desinfección se puede lograr mediante métodos físicos y químicos.

Un desinfectante es un producto que destruye o elimina microorganismos en superficies inanimadas. Por otro lado, un antiséptico es un producto que destruye la vida de una bacteria o un virus, pero se puede aplicar en superficies vivas.

Algunos métodos químicos de desinfección:

1. Alcoholes.
2. Aldehídos.
3. Halógenos.
4. Metales pesados.
5. Compuestos de amonio cuaternario.
6. Fenoles.
7. Colorantes.
8. Agentes Oxidantes.
9. Agentes surfactantes.
10. Biguadinas (clorheximina).

Los mecanismos de acción de los productos desinfectantes se pueden dividir en seis grupos:

1. Desnaturalización de proteínas.
2. Procesos de oxido-reducción.
3. Combinación de grupos ácido con grupos básicos.
4. Inactivación de enzimas.
5. Modificación de la permeabilidad de la membrana celular.
6. Interferencia con los grupos activos de las proteínas.

Diversos factores influyen en la actividad de los desinfectantes, por ejemplo:

- Tipos de microorganismos.
- Temperatura y pH del proceso.
- Cantidad de microorganismos (carga microbiana).
- Concentración del desinfectante.
- Cantidad de compuestos orgánicos (sangre, moco, pus).
- Naturaleza de la superficie a desinfectar (madera, metales, vidrio).
- Tiempo de exposición.
- Concentración de la solución.



Tabla 2. Mecanismos de acción de algunos desinfectantes

<ul style="list-style-type: none">▪ Glutaraldehído Alquilación de sus grupos sulfhidrilo, carboxilo y amino▪ Formaldehído Alquilación de sus grupos sulfhidrilo y amino▪ Ácido peracético Ruptura de uniones sulfhidrilo y sulfuro en proteínas y enzimas▪ Peróxido de hidrógeno Producción de radicales libres que destruyen lípidos de membrana, ADN y otros comp.▪ Cloro Oxidan a los grupos tiol y grupos amino▪ Compuestos fenólicos Destruye pared celular, precipita proteínas celulares y enzimas
--

Podemos clasificar a los desinfectantes en grados de acción:

- Grado alto: destruyen toda clase de microorganismos con excepción de esporas bacterianas.
- Grado intermedio: destruyen micobacterias, bacterias, la mayoría de los virus y hongos.
- Grado bajo: destruyen la mayor parte de bacterias, algunos hongos y algunos virus.

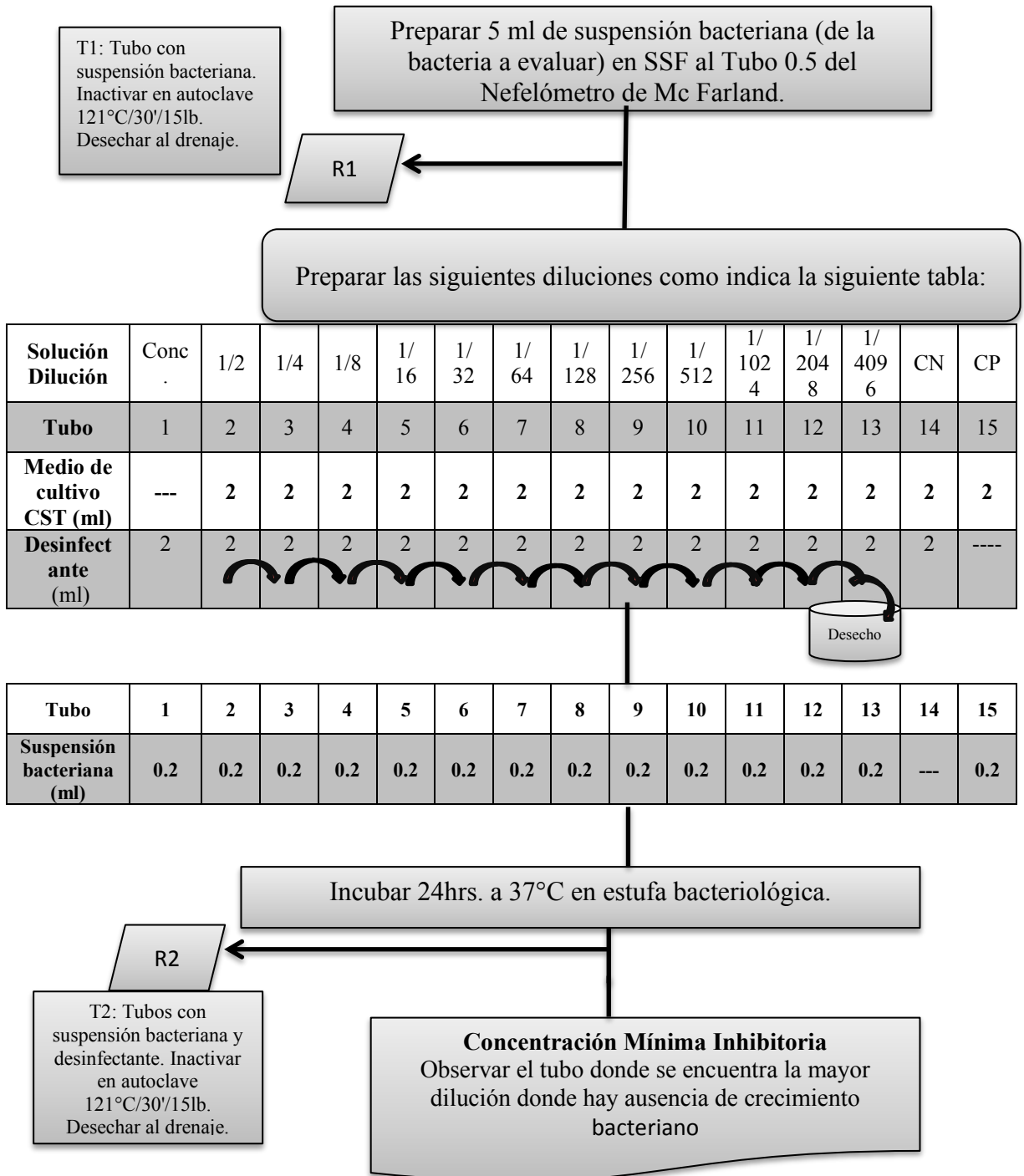
El punto mas importante que se debe de recordar al trabajar con desinfectantes es la preparación de una solución exactamente de acuerdo con las especificación del fabricante.

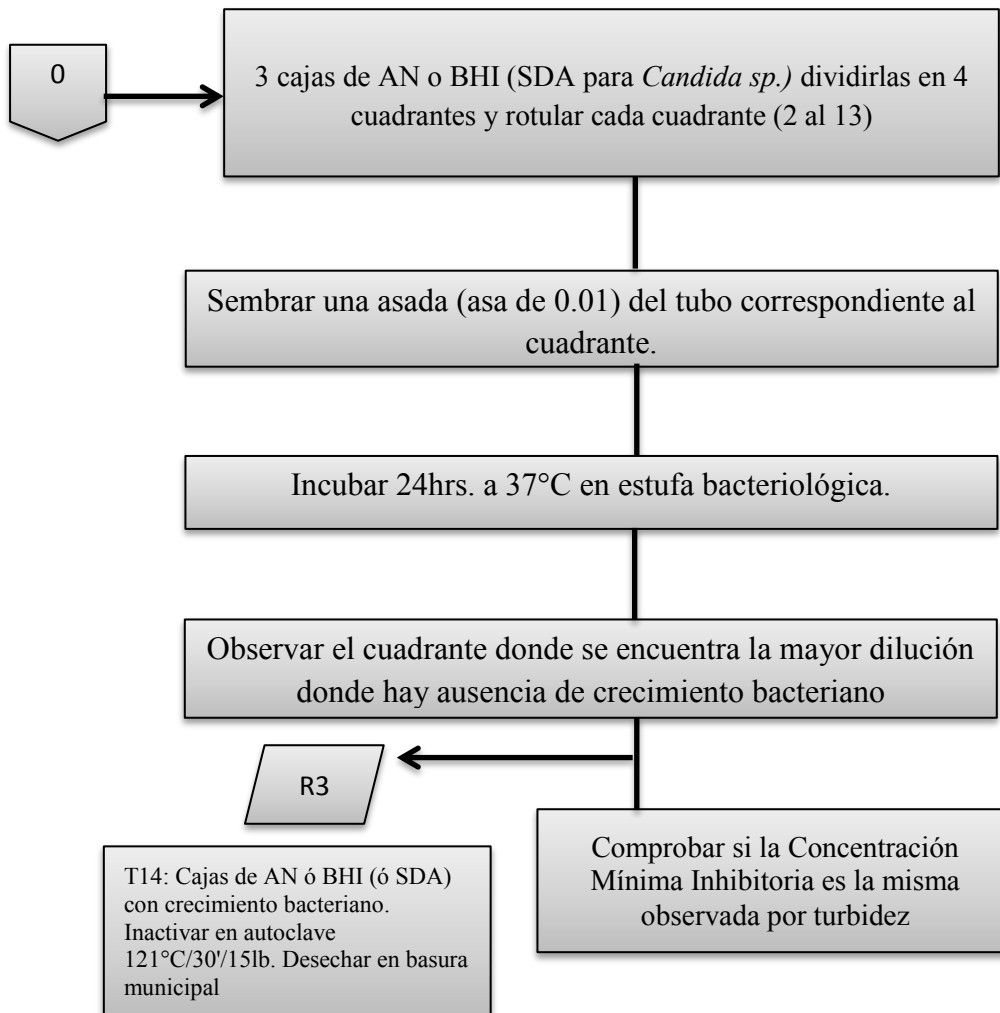


Fig. 1. Desinfectantes y antisépticos comunes.



Procedimiento para determinación de CMI de un desinfectante comercial





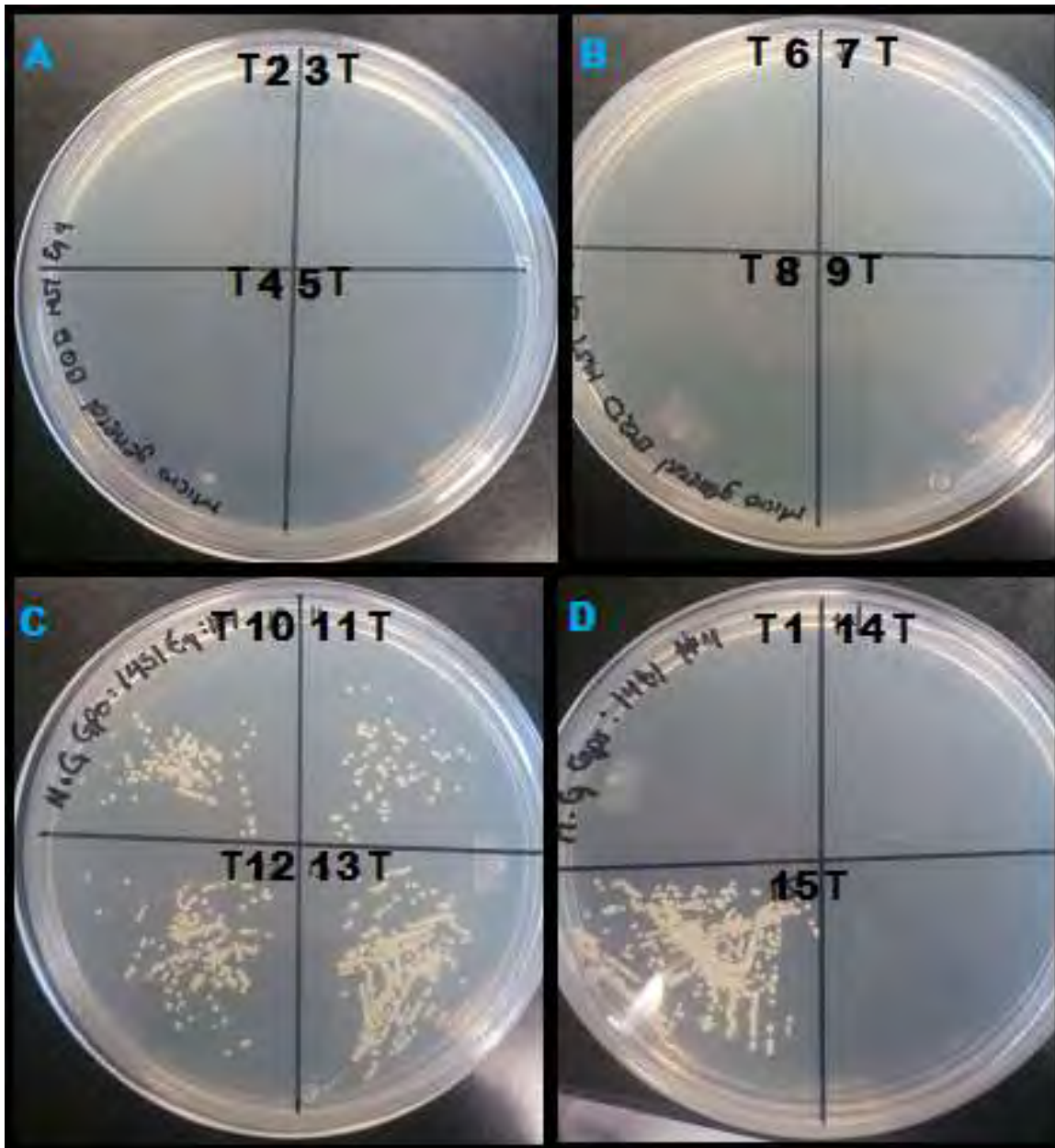


Foto 21. Concentración Mínima Inhibitoria del Benzal (cloruro de Benzalconio) contra *Candida albicans*.

- A) Inhibición del crecimiento de la levadura (T2-T5).
- B) Inhibición del crecimiento de la levadura T6- T9 donde en T 9: se encuentra la MIC).
- C) Crecimiento de la levadura (T10-T11).
- D) T1 corresponde a la acción del desinfectante concentrado inhibiendo su crecimiento en su totalidad. T14 control negativo comprobando que el desinfectante y el diluyente están libres de contaminación y el T15 Control positivo de crecimiento de la levadura.

NOTA: Para conocer la dilución y contracción correspondiente de T1 a T13 consultar Anexo 3.



Procedimiento para comprobar la efectividad de un desinfectante comercial en una superficie.

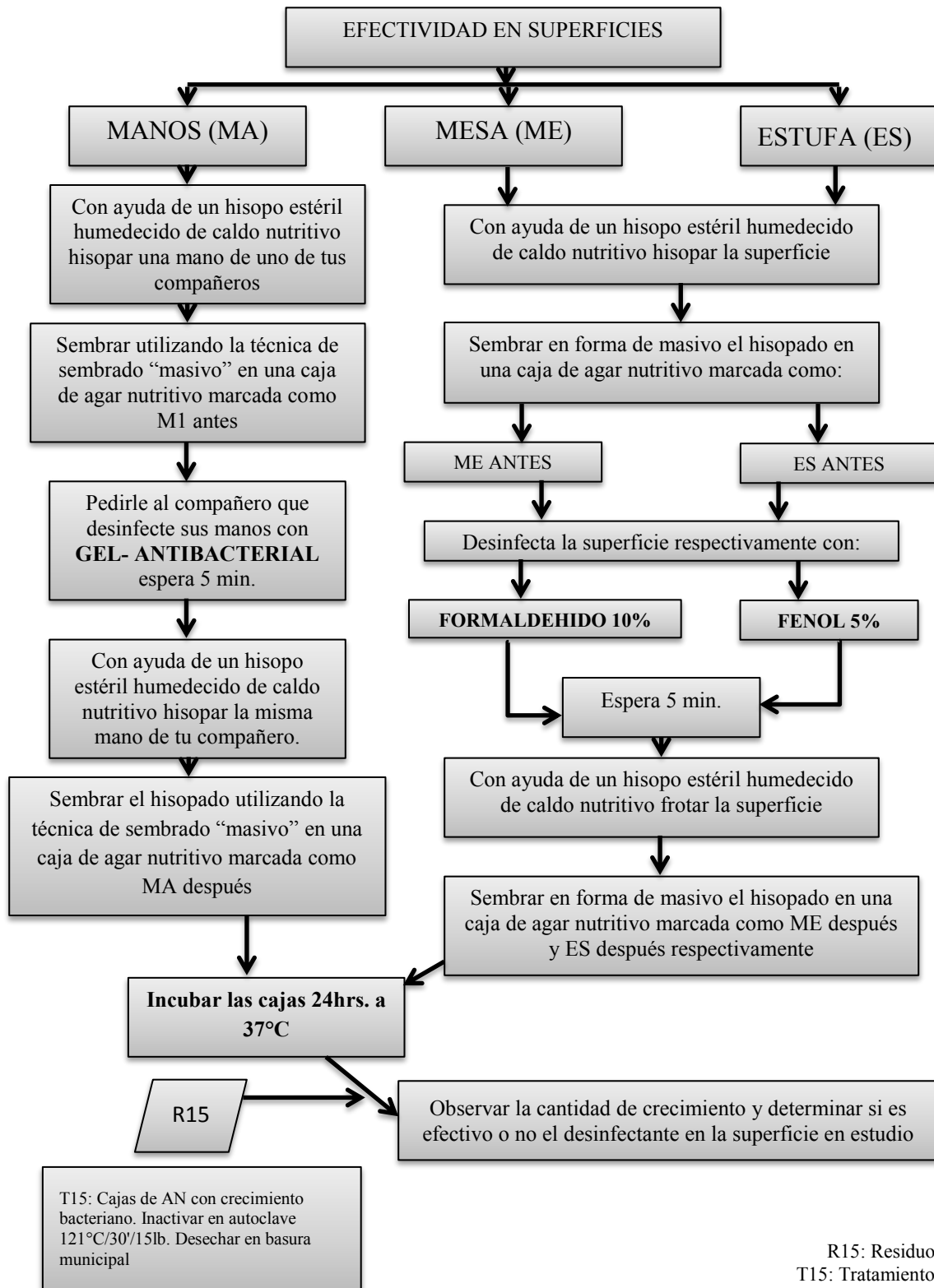




Foto 22. Delimitación del área (mesa de trabajo)



Foto 23. Hisopado antes del uso del desinfectante (benzal).

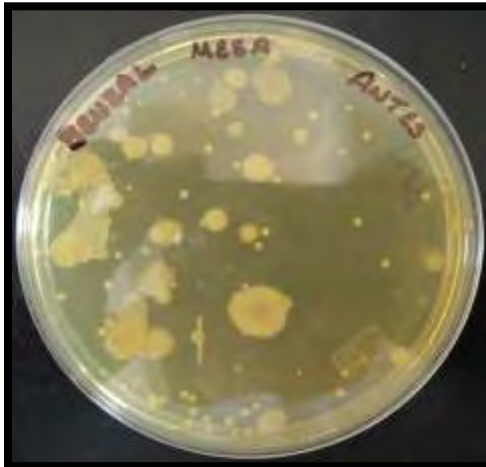


Foto 24. Cultivo antes del tiempo de acción del desinfectante. Observándose carga bacteriana.

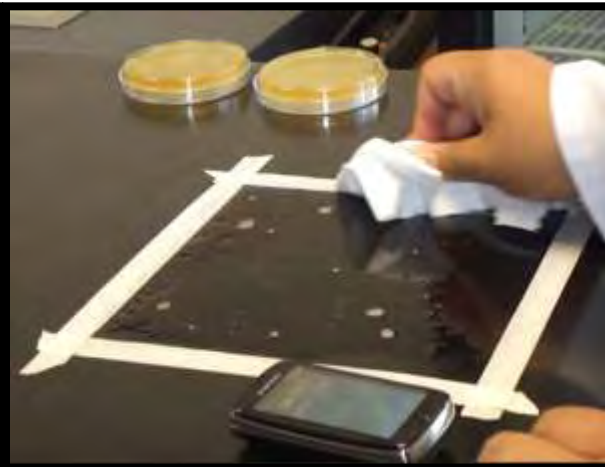


Foto 25. Tiempo de acción del desinfectante sobre la superficie (5min.).

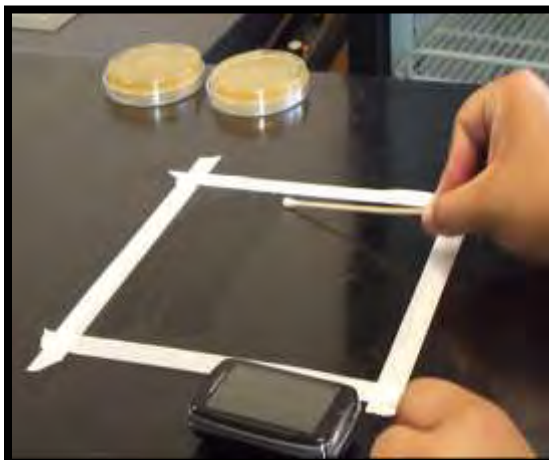


Foto 26. Muestreo después del tiempo de acción del desinfectante (benzal).

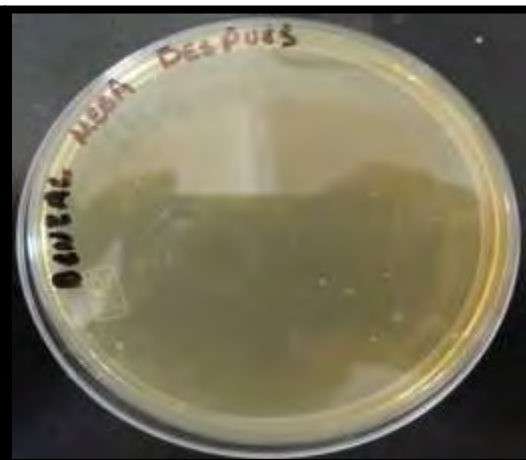


Foto 27. Cultivo después del tiempo de acción del desinfectante. Observándose una disminución en la carga bacteriana.



Foto 28. Muestreo de Estufa bacteriológica antes del uso del desinfectante (fenol al 5%).

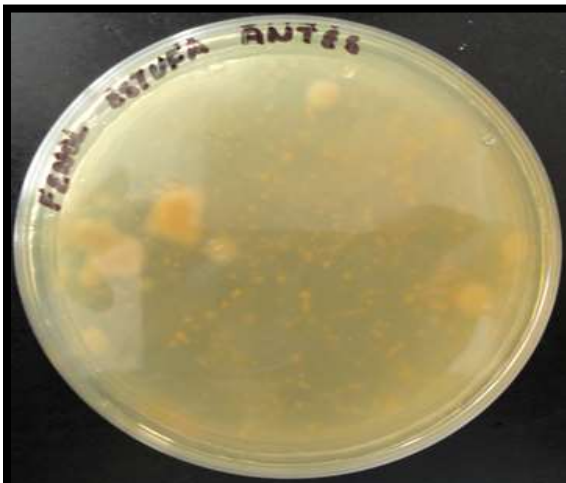


Foto 29. Cultivo antes del tiempo de acción del desinfectante. Observándose carga bacteriana.



Foto 30. Tiempo de acción del desinfectante en la superficie (3 min).



Foto 31. Muestreo de Estufa bacteriológica después del uso del desinfectante (Fenol al 5%).

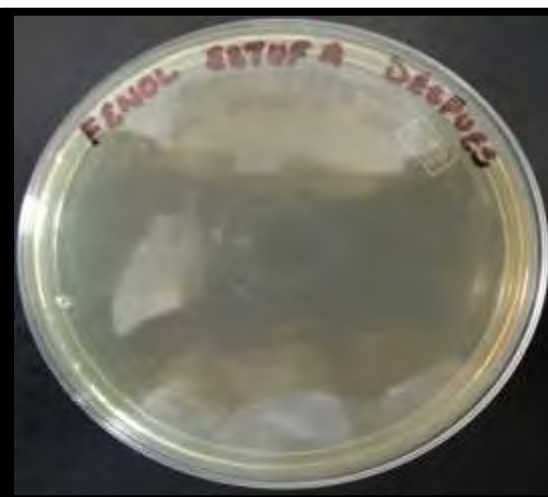


Foto 32. Cultivo después del tiempo de acción del desinfectante. No se observa carga bacteriana.



Foto 33. Muestreo de manos antes del uso del desinfectante.



Foto 34. Cultivo antes del tiempo de acción del desinfectante. Observándose carga bacteriana.



Figura 35. Aplicación del desinfectante (Gel antibacterial).



Foto 36. Muestreo de manos después del uso del desinfectante (Gel antibacterial).



Foto 37. Cultivo después del tiempo de acción del desinfectante. Se observa escasa carga bacteriana.



TEMA 4

MEDIOS DE CULTIVO

Comúnmente se requiere el crecimiento bacteriano para la identificación y caracterización colonial. El cultivo es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias del sitio de infección o donde se encuentre contaminando con el objetivo de la recuperación por métodos de recolección de la muestra y el crecimiento en un medio ambiente artificial. Por lo que un cultivo tiene como propósito:

- Facilitar el crecimiento y aislamiento de todas las bacterias y así determinar cuáles de las bacterias que se desarrollan la causa de la infección y/o contaminantes.
- Obtener desarrollo suficiente de las bacterias relevantes para permitir su identificación y caracterización.

Las bacterias tienen numerosas necesidades nutricionales, de atmosfera, agua, diversos iones, nitrógeno, fuentes de carbono, sales, fosforo. En los laboratorios de microbiología estos nutrientes son incorporados dentro de medio cultivo (líquido o sólido) en el cual se desarrollan las bacterias; ya que algunas bacterias tienen diferentes necesidades nutricionales, algunas pueden ser mas complejas (bacterias exigentes) y otras no fastidiosas (bacterias no exigentes).

El desarrollo de un microorganismo en un medio de cultivo también depende de otros factores como son:

- Existencia de oxígeno requerido.
- Grado de humedad apropiado.
- Valores de pH adecuados.
- Temperatura de incubación.
- Condiciones de esterilidad del medio y protección de posibles contaminantes.

Los medios de cultivo se pueden clasificar de distintas maneras, atendiendo a algunas de sus características.

- Según la composición: definidos e indefinidos.
- Según su estado físico: líquidos, sólidos, y semisólidos.
- Según su aplicación: Medios básicos, medios enriquecidos, medios de enriquecimiento, medios selectivos y medios diferenciales.
- Según su uso: promoción de crecimiento, transporte, conservación y/o mantenimiento.



Tabla 3. Ejemplos de medios de cultivo según la clasificación de acuerdo a su aplicación y uso.

TIPO DE MEDIO DE CULTIVO	EJEMPLO
BASICO	Agar nutritivo, caldo triptosa, agar soya tripticaseina.
ENRIQUECIDO	Agar sangre, Agar chocolate, Agar suero.
DE ENRIQUECIMIENTO	Caldo selenito de sodio, Caldo tetrionato.
SELECTIVO	Medio Lowenstein-Jensen, Agar Sales Manitol.
DIFERENCIAL	Agar Salmonella-Shigella, Agar cetrimida.
DE TRANSPORTE	Medio de Stuart y medio de Carry- Blair.
DE MANTENIMIENTO	Agar nutritivo, Medio de Robertson y Medio de Dorset.

Método de preparación de medio de cultivo en caja con esterilización en autoclave.

1. Tomando en cuenta el número y tamaño de cajas requeridas, realizar los cálculos de preparación de acuerdo a lo indicado en el marbete del frasco del medio de cultivo. Pesar los gramos del polvo correspondientes con ayuda de una balanza de precisión o granataria.
2. Hidratar el polvo pesado en la mitad del volumen de agua destilada necesaria. Esto en un matraz. Homogenizar el polvo y agregar el resto del agua destilada. Esperar 5-10 minutos.
3. Clarificar el medio: Colocar en ebullición durante un minuto, homogenizando constantemente para que se disuelva bien el polvo y evitar que se derrame. Colocar un tapón de algodón y capuchón de papel.
4. Seguir las especificaciones de esterilización en autoclave según sea el caso:
121°C, 15 lb de presión, 15 min.
121°C, 15 lb de presión, 10 min.
5. Transcurrido el tiempo de esterilización sacar el matraz de la autoclave y colocarlo en un baño maria a 45°C para bajar la temperatura del medio. Desinfectar el área de trabajo (mesa) y mantener un área estéril con ayuda de un mechero encendido (o en una campana de flujo laminar).
6. Servir el medio en cajas Petri estériles según el tamaño que se requiere:

Cajas de 100x15mm agregar 25 ml del medio.

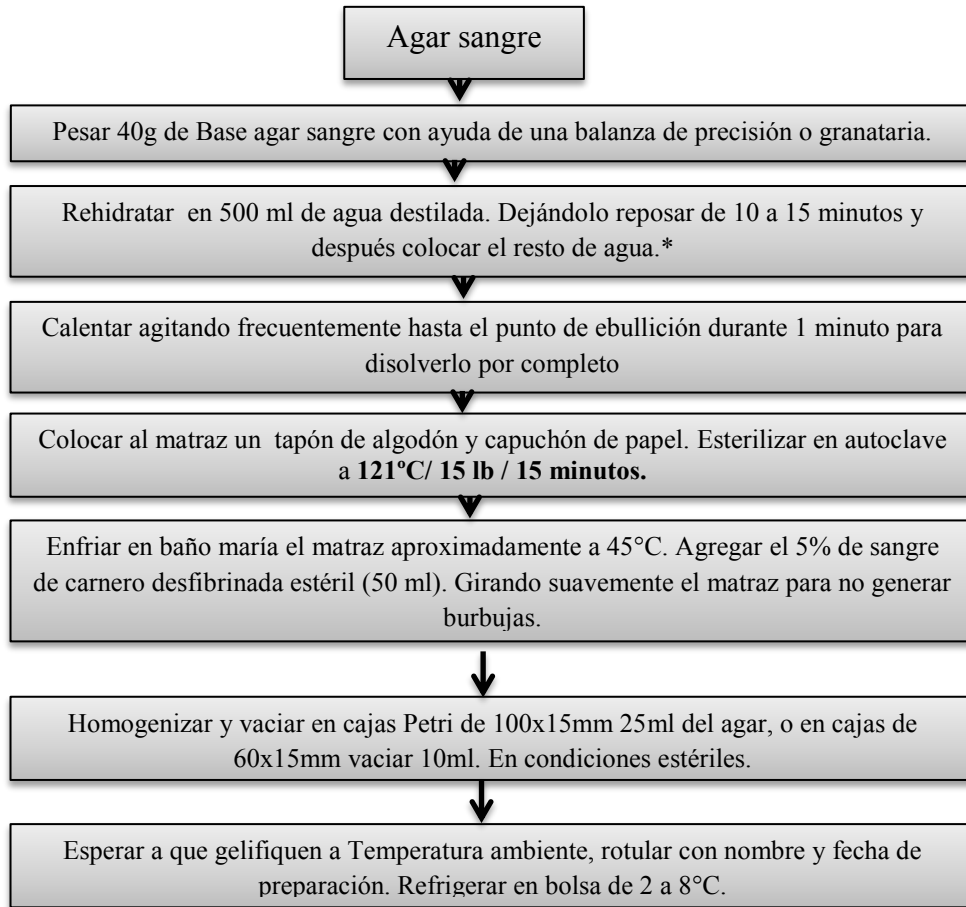
Cajas de 60x15mm agregar 15ml del medio.

Dejar que gelificar a temperatura ambiente.

7. Marcar con las siglas del Agar de manera individual las cajas en la parte de la base. Guardarlas en bolsas, rotular con la fecha de elaboración y conservar a una temperatura de 2 a 8°C.
8. Tomar una caja del medio de cultivo preparado. Incubar a 37°C por 24hrs para control de esterilidad.



Procedimiento de preparación de medio de cultivo sólido enriquecido (Agar Sangre)



*NOTA: debes de restar el volumen de sangre al volumen total de agua destilada y el porcentaje de sangre dependerá del laboratorio.

Cálculos para saber la cantidad de sangre a agregaren la preparación de acuerdo a las instrucciones del marbete del frasco de medio de cultivo:

Ejemplo: Se desea preparar 30 cajas de Agar Sangre con 25 ml cada caja

40g de base agar sangre para 1 litro de agua destilada y se agrega el 5% de sangre.

$$30\text{cajas} \times 25\text{ml de agar sangre} = 750 \text{ ml de agar sangre .}$$

1000ml agua → 40g de base agar sangre

750ml de agua → X

X = 30 g de base agar sangre

$$750\text{ml de agua} \times 0.05 \text{ de sangre} = 37.5 \text{ ml de sangre}$$

$$750\text{ml de agua} - 37.5 \text{ ml de sangre} = 712.5 \text{ ml de agua}$$

Por lo tanto para preparar 30cajas de agar Sangre requiero 750ml de este agar. Y para prepararlo necesito 712.5ml de agua destila y 30 g de base agar sangre; agregando 37.5 ml de sangre desfibrinada estéril.



Método de preparación de medio de cultivo en caja por método de ebullición.

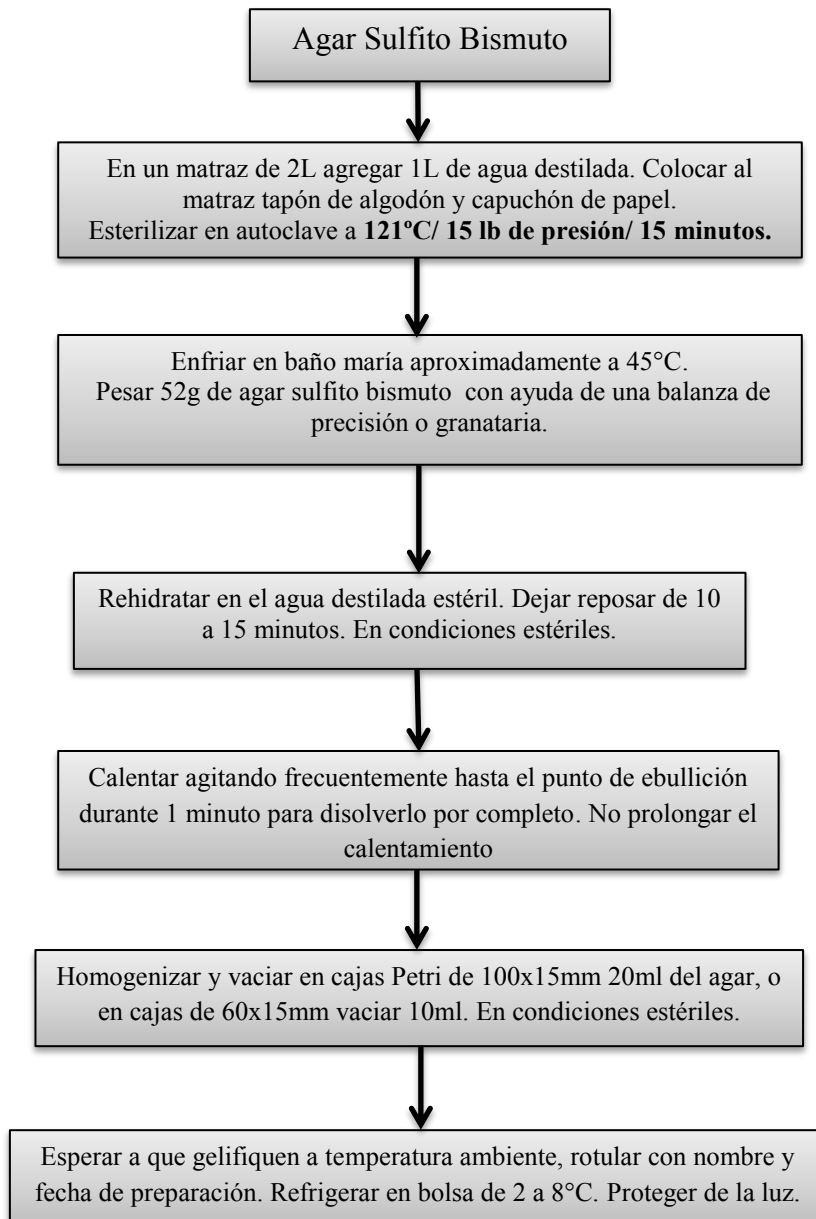
1. Tomando en cuenta el número y tamaño de cajas requeridas, realizar los cálculos de preparación de acuerdo a lo indicado en el marbete del frasco del medio de cultivo.
2. En un matraz verter solo la cantidad de agua destilada requerida y colocarle tapón de algodón y capuchón de papel.
3. Esterilizaren autoclave a 121°C, 15 lb. de presión, 15 minutos. Transcurrido el tiempo de esterilización. Bajar la temperatura del matraz con agua a 45°C en baño maría.
4. Pesar los gramos del polvo correspondientes con ayuda de una balanza de precisión o granataria. Hidratar el polvo pesado en el volumen de agua destilada esterilizada en el paso 1. Esperar 5-10 minutos. Homogenizar el polvo.
5. Clarificar el medio. Colocar en ebullición durante un minuto, moviendo constantemente para que se disuelva bien el polvo y evitar que se derrame. Evitar sobrecalentamiento.
6. Bajar la temperatura del medio a 45°C en baño maría. Desinfectar el área de trabajo (mesa) y mantener una área estéril con ayuda de un mechero encendido (o haciéndolo o en una campana de flujo).
7. Servir el medio en cajas Petri estériles según el tamaño que se requiere:
Cajas de 100x15mm agregar 25 ml del medio.
Cajas de 60x15mm agregar 15ml del medio.

Homogenizar el medio en toda la caja y dejar que gelifique a temperatura ambiente.

8. Marcar con las siglas del Agar de manera individual las cajas en la parte de la base. Guardarlas en bolsas, rotular con la fecha de elaboración y conservar a una temperatura de 2 a 8 °C.
9. Tomar una caja del medio de cultivo preparado. Meterlo a incubación a 37°C por 24hrs para control de esterilidad.



Procedimiento de preparación de medio de cultivo sólido por método de ebullición. (Agar Sulfito Bismuto)



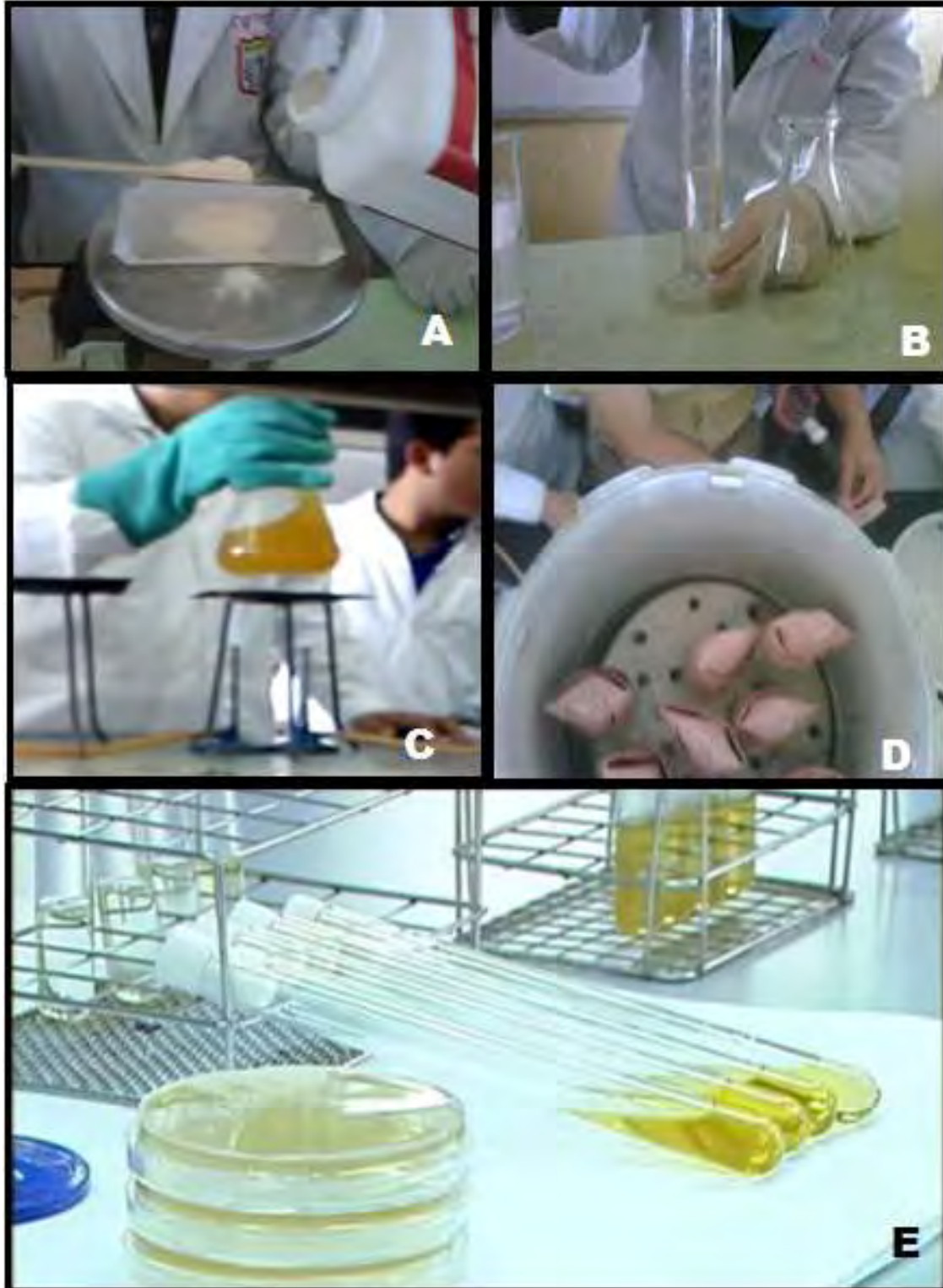


Foto 38. Serie fotográfica. Preparación de los medios de cultivo [A) pesado, B) disolución, C) clarificación, D) esterilización y E) presentación para gelificar y/o envasado].

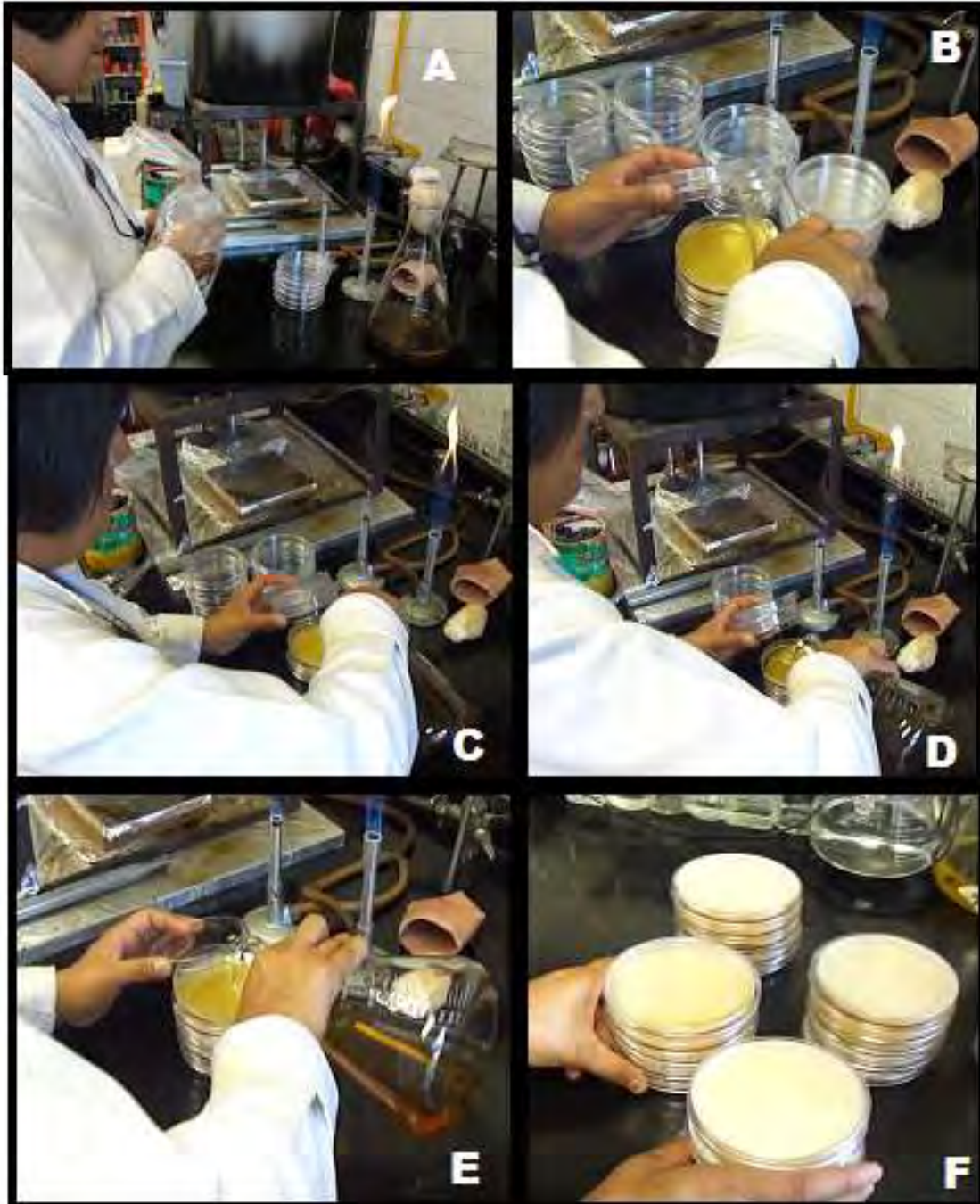


Foto 39. Serie fotográfica de vaciado de medios de cultivo en placa (caja Petri de 100x15mm) [A] preparación del área estéril y Cajas Petri estériles, B), C), D) y E) Llenado de los paquetes de cajas Petri, F) Gelificación del medio de cultivo a temperatura ambiente.



Método de preparación de pruebas bioquímicas en tubo.

1. Tomando en cuenta el número de tubos y el medio de cultivo, realizar los cálculos de preparación de acuerdo a lo indicado en el marbete del frasco del medio de cultivo. Pesar los gramos del polvo correspondientes con ayuda de una balanza de precisión o granataria.
2. Hidratar el polvo en la mitad del volumen de agua destilada necesaria. En un matraz. Homogenizar el polvo y agregar el resto del agua destilada. Esperar 5-10 minutos.
3. **Medios líquidos:** agitar hasta que se disuelva perfectamente el medio.
Medios sólidos y semisólidos: Clarificar el medio. Colocar en ebullición durante un minuto, moviendo constantemente para que se disuelva bien el polvo y evitar que se derrame. Evitar sobrecalentamiento.
4. Colocar en tubos de 13x100mm el volumen requerido según el medio:

Tabla 4. Ejemplo de medios servidos en tubo.

Líquidos (2ml)	Semisólido (2.5ml)	Sólido (3.5 ml)
*Arginina	*OF	KIA
*Urea de Stuart	SIM	TSI
Nitratos	MIO	LIA
Carbohidratos*		Citratos de Simmons
Malonatos		**Urea de Christensen
MR-VP (3ml)		Fenilalanina
		Bilis esculina

** Esta bioquímica se esteriliza por filtración por lo que se recomienda ver en el marbete del frasco el modo de preparación.

5. Colocar el tapón de baquelita y cerrar parcialmente los tubos, colocar en una gradilla adecuada para el tamaño de tubo o en un bote de aluminio. Seguir las especificaciones de esterilización en autoclave según sea el caso:

121°C, 15 lb de presión, 15 minutos
*121°C, 15 lb de presión, 10 minutos

6. Transcurrido el tiempo de esterilización sacar de la autoclave y tapar los tubos perfectamente bien.
7. **Medios líquidos y Medios semisólidos:** dejar que se enfríen o gelifiquen a temperatura ambiente en posición vertical.
Medios sólidos: dejar que gelifiquen a temperatura ambiente en una posición inclinada generando la formación de un pico de flauta prolongado, o la formación un pico de flauta y fondo amplio.
8. Una vez gelificados rotular el tubo con las siglas del Agar (o Bioquímica) de manera individual. Guardarla en botes de aluminio o en gradillas. En un lugar fresco y protegido de la luz.



9. Tomar un tubo preparado. Incubar a 37°C por 24hrs. Para control de esterilidad.



Foto 40. Medios sólidos servidos en tubo



Foto 41. Medios semisólidos



Foto 42. Medios líquidos



TEMA 5

TÉCNICAS DE SEMBRADO

La finalidad que se persigue en el primo aislamiento es la obtención de colonias aisladas para su posterior estudio. Un segundo cultivo persigue la finalidad de obtener una biomasa o cultivo más abundante. Vamos a exponer con brevedad las técnicas de sembrado habituales:

1. Siembra de medios de cultivo sólidos.

PASOS A TOMAR EN CUENTA ANTES DE SEMBRAR UNA CAJA DE CULTIVO

- 1.- Antes de sembrar es necesario revisar que el medio no esté contaminado.
- 2.- Revisar que el medio de cultivo no esté húmedo
- 3.- Si el medio de cultivo se encuentra en refrigeración se debe atemperar antes de su sembrado.
- 4.- Tomar la placa de la forma más cómoda para su manipulación durante el sembrado.

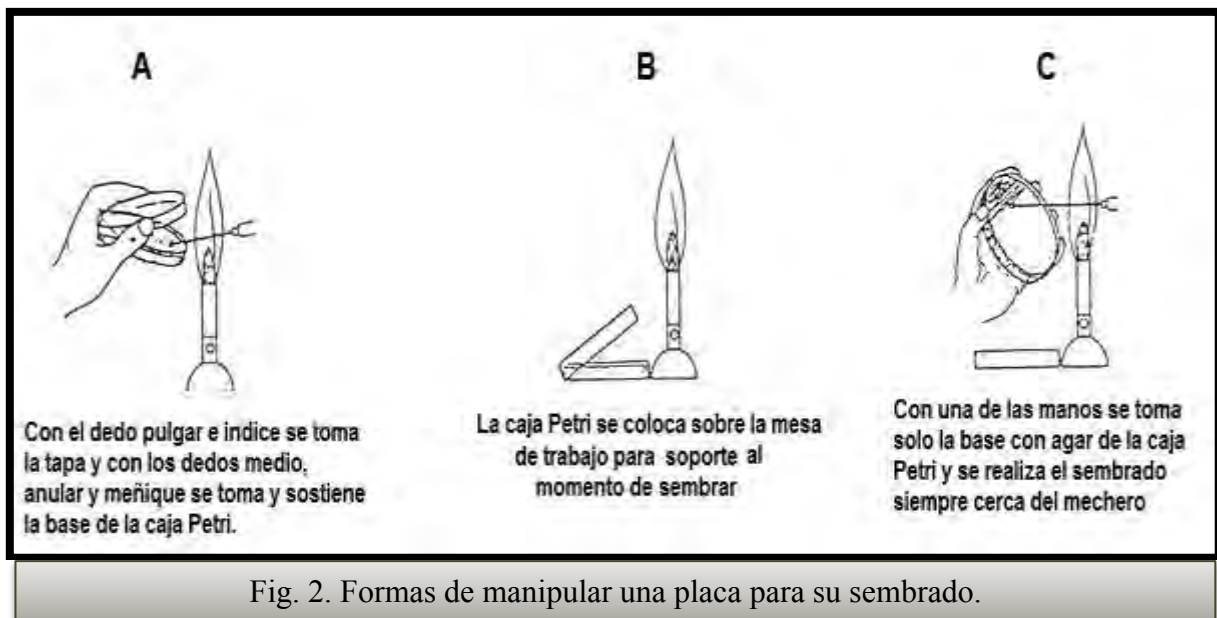


Fig. 2. Formas de manipular una placa para su sembrado.



Técnica de sembrado por dilución (Técnica Americana)

Esta técnica se para obtener cultivos puros y colonias aisladas de muestras que contienen flora polimicrobiana; es también útil para estudiar la morfología macroscópica y propiedades hemolíticas de colonias bacterianas aisladas. A continuación se expone con brevedad la técnica:

Fig. 3. Colocación de la impronta a partir de una muestra líquida para realizar un sembrado por dilución.

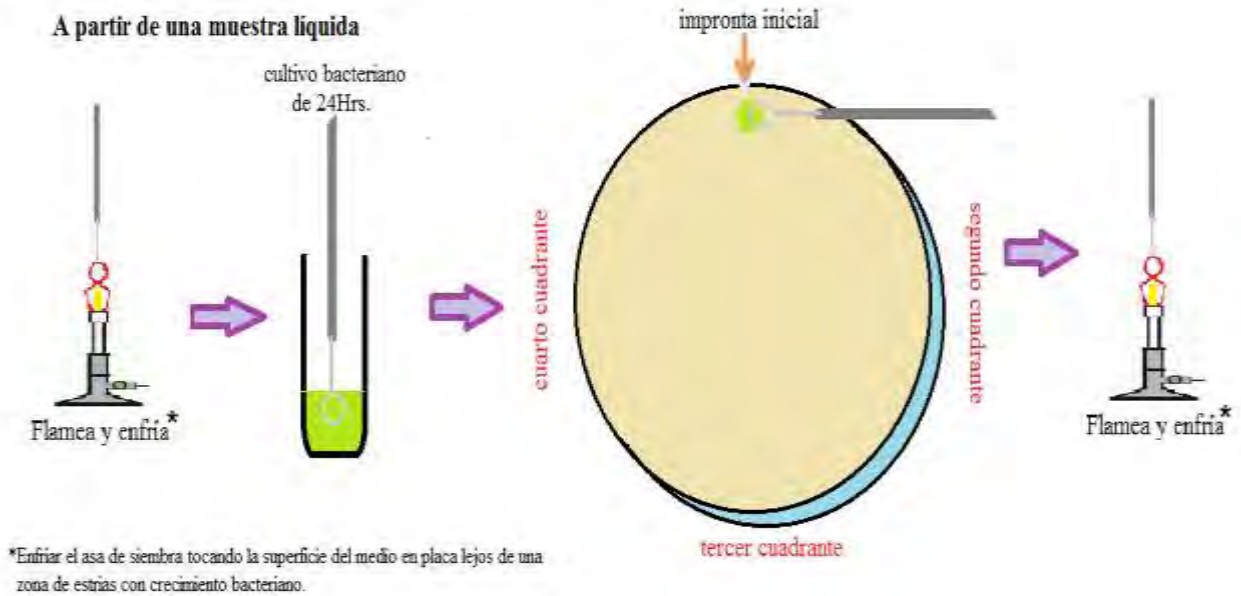


Fig. 4. Colocación de la impronta a partir de un cultivo en placa para realizar un sembrado por dilución.

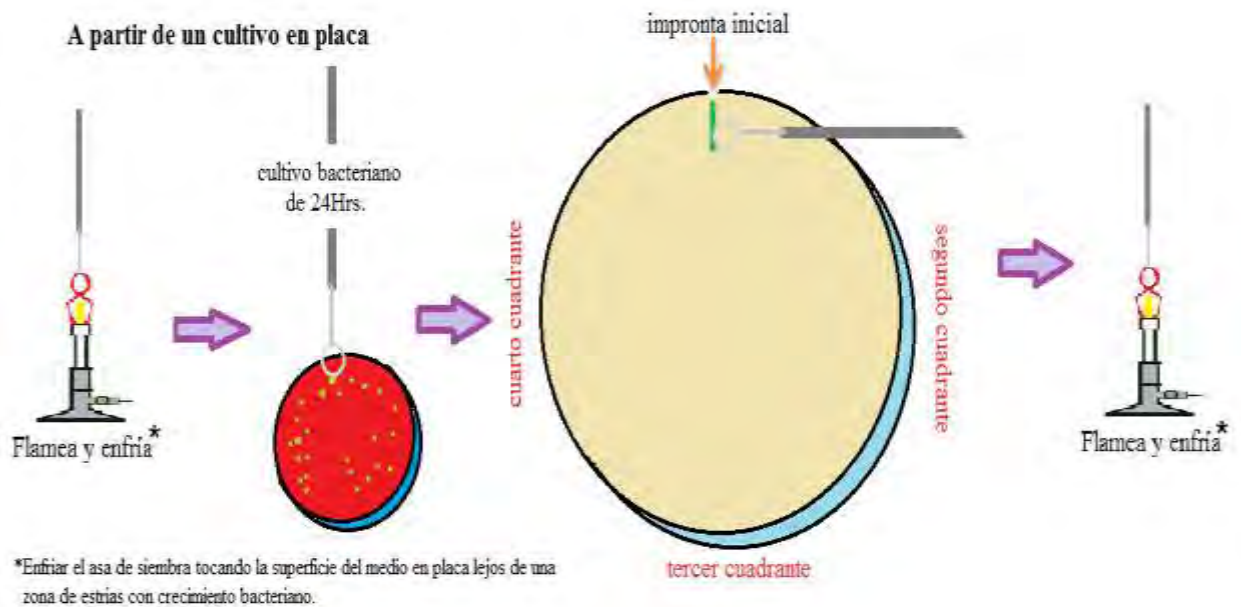
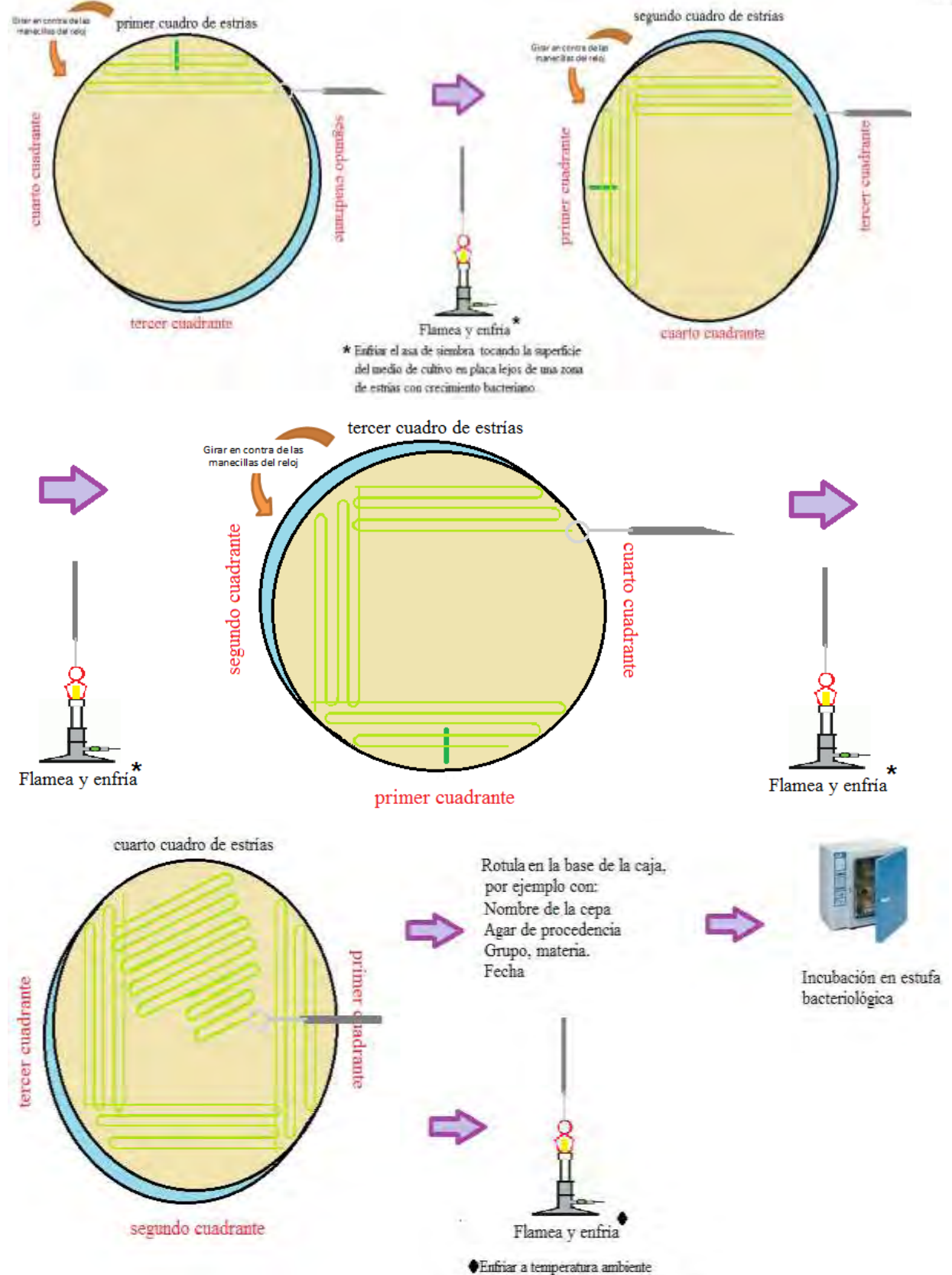




Fig. 5. Sembrado por dilución después de colocar la impronta.





Técnica de extensión en superficie o sembrado masivo.

Consiste en distribuir la muestra de manera uniforme por la superficie del medio de cultivo contenido en la placa. Es el método idóneo para el recuento de colonias y para la realización de antibiograma por el método de difusión. La metodología general a seguir sería la siguiente:

Fig. 6. Colocación de la impronta con hisopo a partir de un cultivo en placa para realizar un sembrado masivo.

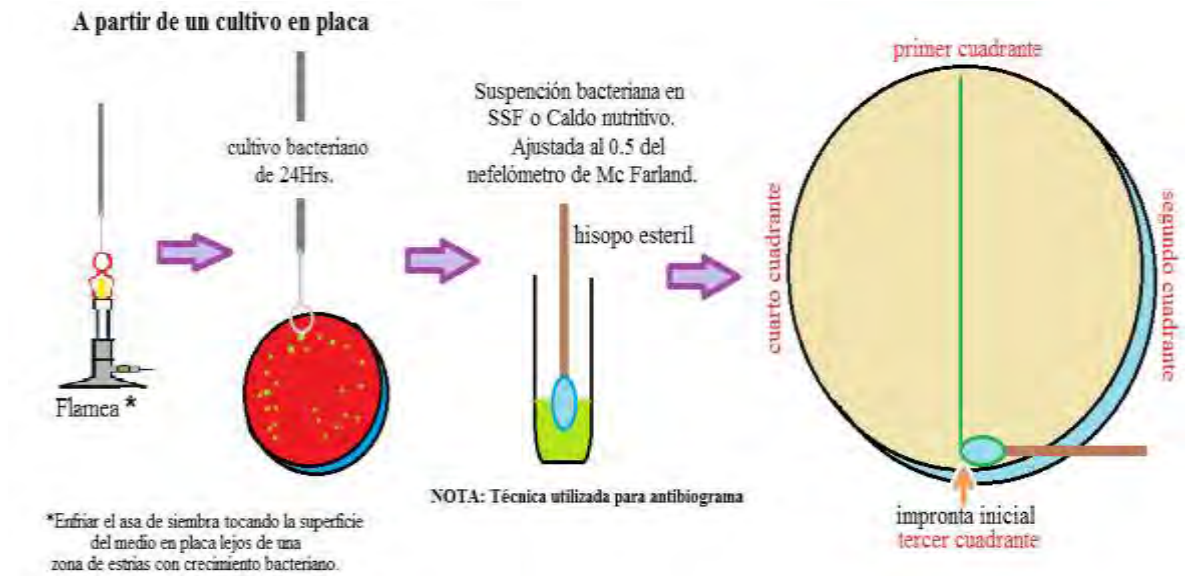
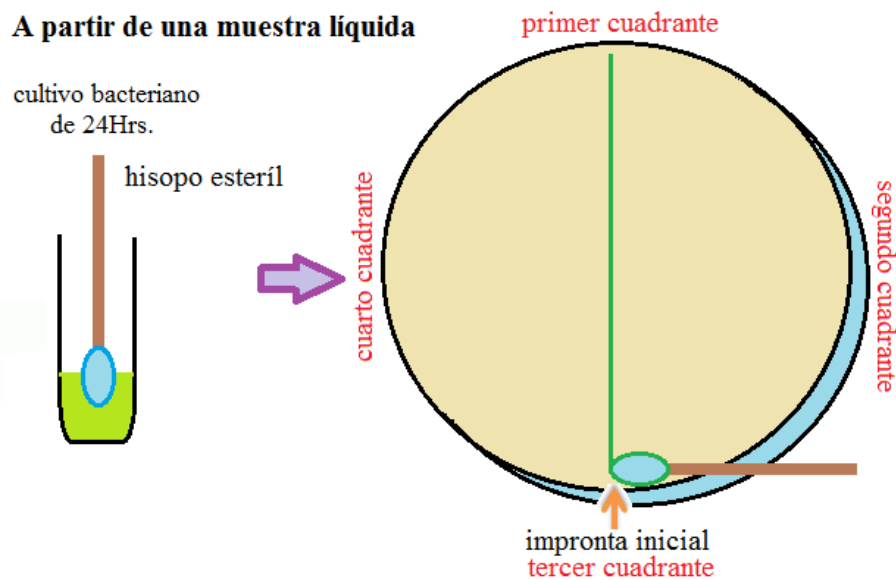


Fig. 7. Colocación de la impronta con hisopo estéril a partir de una muestra líquida para realizar un masivo.



Si se utiliza un hisopo o un asa calibrada de plástico no se esteriliza en la flama del mechero y se utilizaran para hacer el sembrado en los cuatro cuadrantes.



Fig. 8. Sembrado masivo después de colocar la impronta.

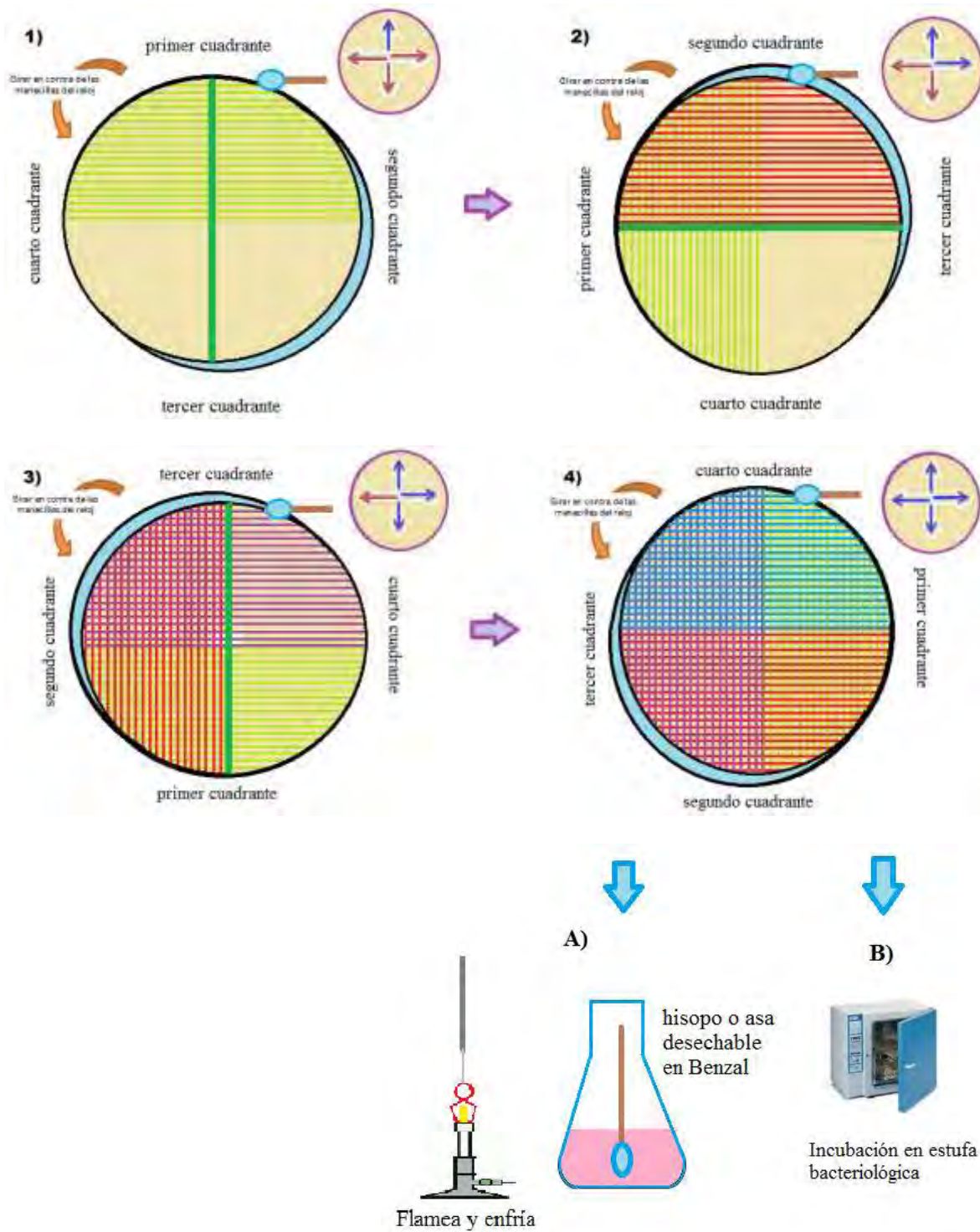
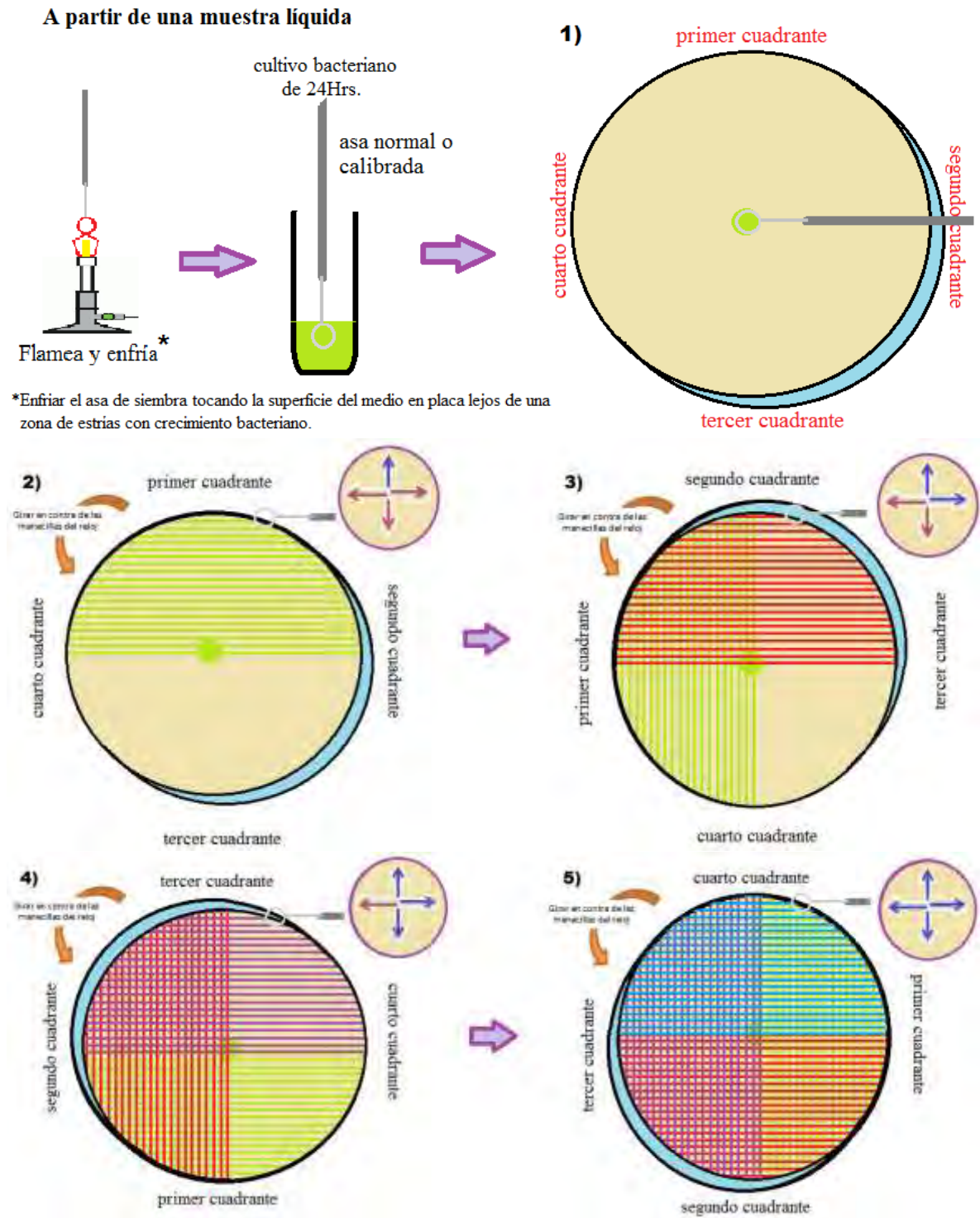




Fig. 9. Colocación de la impronta con asa calibrada a partir de una muestra líquida y forma de realizar el sembrado masivo.



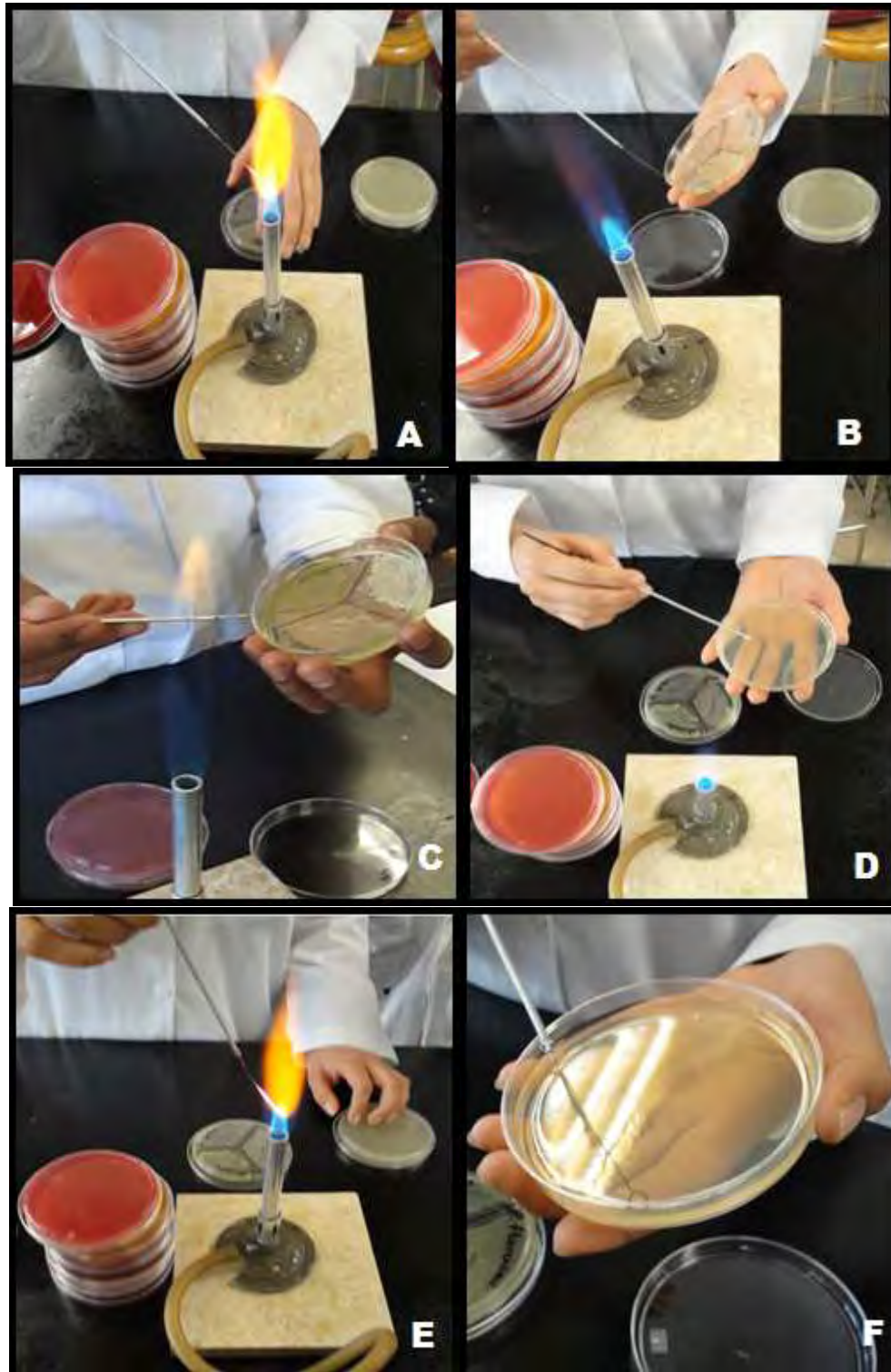
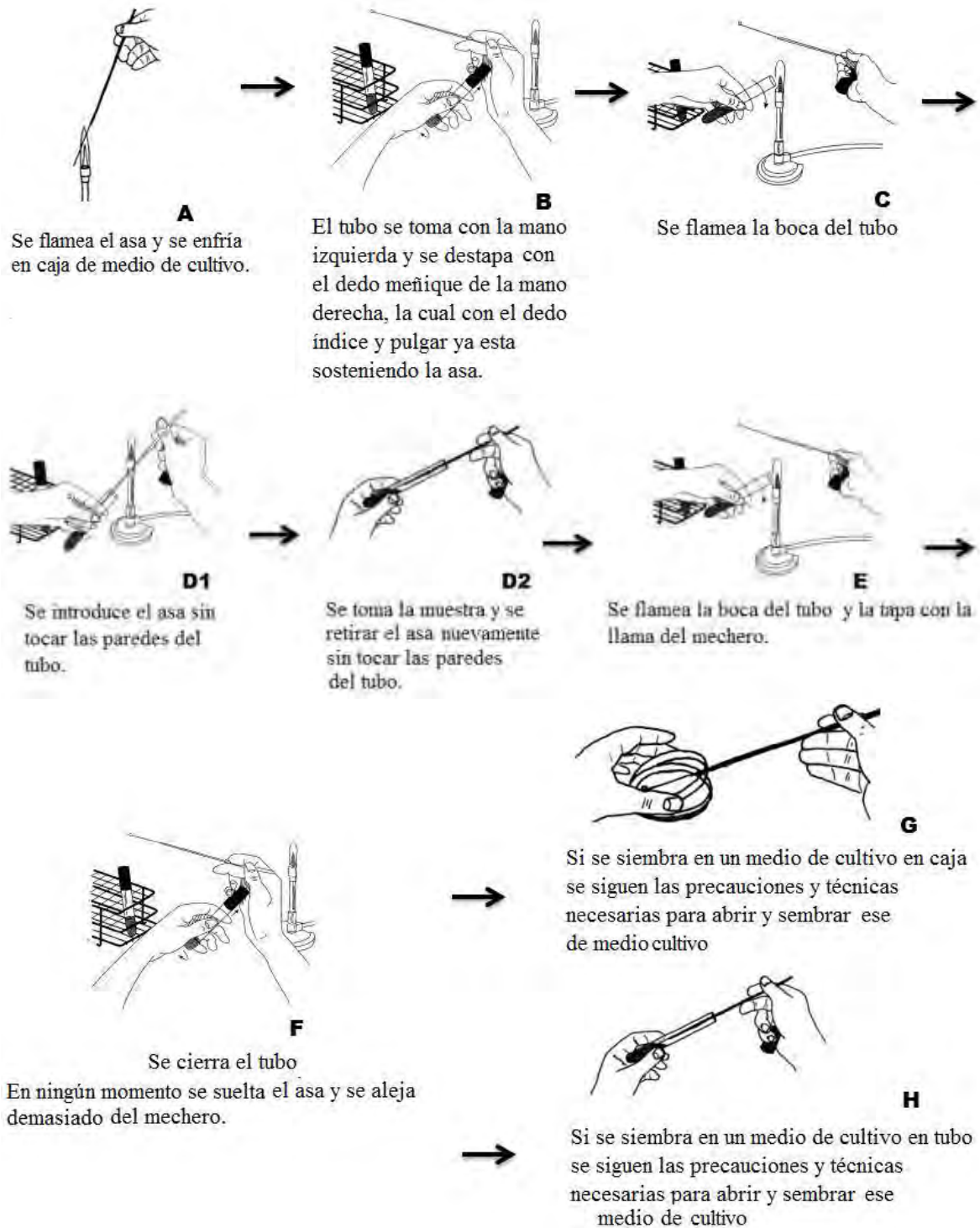


Foto 43. Serie fotográfica colocación de la impronta de bacteria para realizar estriado del medio de cultivo en placa. **A.** Esterilización del asa bacteriológica. **B.** Enfriamiento del asa para toma de inóculo. **C.** Toma de inóculo. **D.** Colocación de la impronta. **E.** Esterilización del asa bacteriológica. **F.** Comienzo del estriado después de enfriar el asa.



Fig. 10. Forma de manipular un cultivo en tubo.



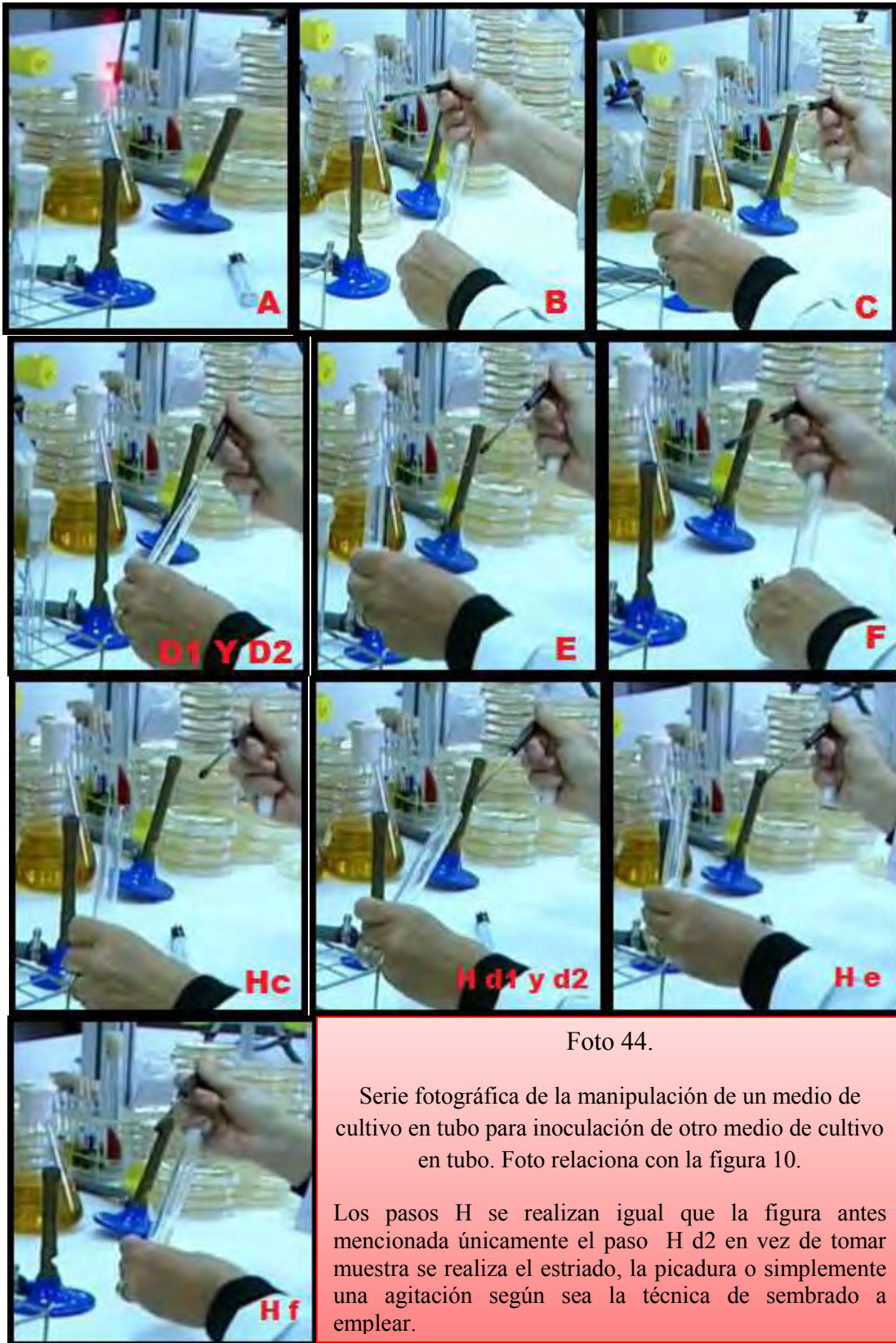


Foto 44.

Serie fotográfica de la manipulación de un medio de cultivo en tubo para inoculación de otro medio de cultivo en tubo. Foto relaciona con la figura 10.

Los pasos H se realizan igual que la figura antes mencionada únicamente el paso H d2 en vez de tomar muestra se realiza el estriado, la picadura o simplemente una agitación según sea la técnica de sembrado a emplear.



Foto 45. Rotulación de los medios de cultivo en placa o en tubo. En placa debe de ser en la base y en el tubo debe de ser en la boca del tubo.

Inoculación de un medio de cultivo líquido.

Con asa de siembra: se toma directamente con el asa estéril normal una colonia bacteriana. Se introduce el asa en el tubo y se dispersa el inóculo bacteriano agitando el asa o golpeando suavemente las paredes del tubo. (Esto se realiza cerca del mechero). Para inocular de un medio líquido a otro medio líquido podemos usar asas calibradas o normales.

Con pipeta: tomar un volumen adecuado o deseado de una suspensión bacteriana o una muestra líquida. Depositarlo en el medio líquido, tapar el tubo y agitar suavemente. Las pipetas pueden ser Pasteur o graduadas.

Inoculación de medios de cultivo sólido, semisólido y líquido en tubo.

La inoculación en medios de cultivos en tubo se practica para la transferencia de cultivos puros y estudio bioquímico. El medio puede ser dispuesto en medio sólido, semisólido, líquido, en forma vertical o con ligera inclinación (pico de flauta).

Tubo de agar sólido (pico de flauta): se inocula en su superficie ya sea con pipeta, asa en círculo o recta según como se pida. Algunas pruebas bioquímicas secundarias requieren que el tubo se inocule con picadura y estriado; por lo que se utiliza el asa recta introduciéndola hasta el fondo (así como entra sale por el mismo lugar) y al sacar el asa al final se realiza el estriado en el pico de flauta sin tomar nuevamente muestra.

Tubos de agar semisólido: cuando se estudia la motilidad de las bacterias, se emplea necesariamente el asa de siembra recta, introduciéndola hasta el fondo con un movimiento recto vertical (picadura).



Tubos con medio líquido: si se inocula con asa, se introduce la misma hasta aproximadamente $\frac{1}{4}$ de la profundidad del medio y se rota para depositar la muestra; también se puede inclinar ligeramente el tubo y frotar el asa suavemente contra la pared y el medio, por debajo del menisco. Si se inocula con pipeta o jeringa, basta dejar caer una cantidad adecuada de la muestra y homogeneizar.

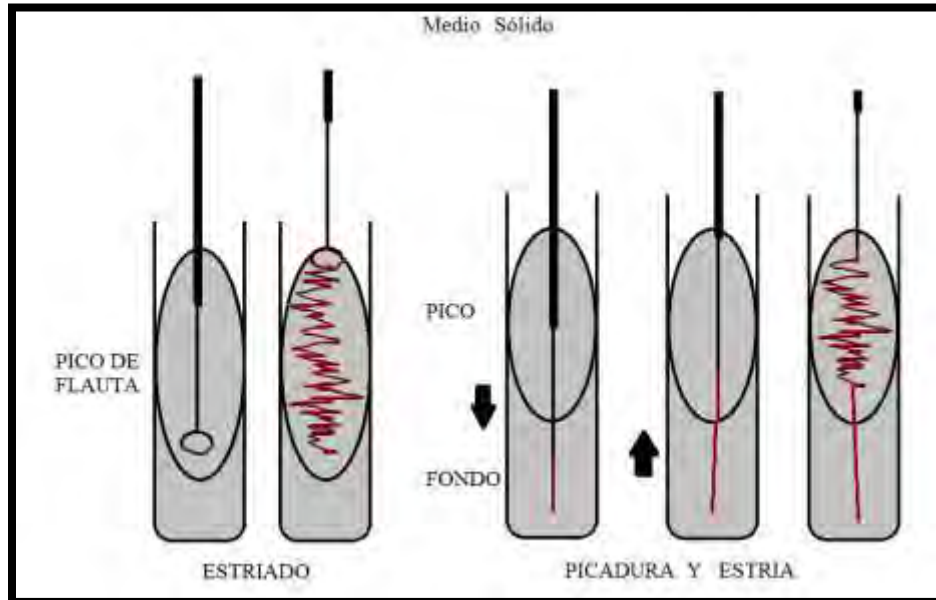


Fig. 11. Formas de inoculación de medios de cultivo sólido en tubo.

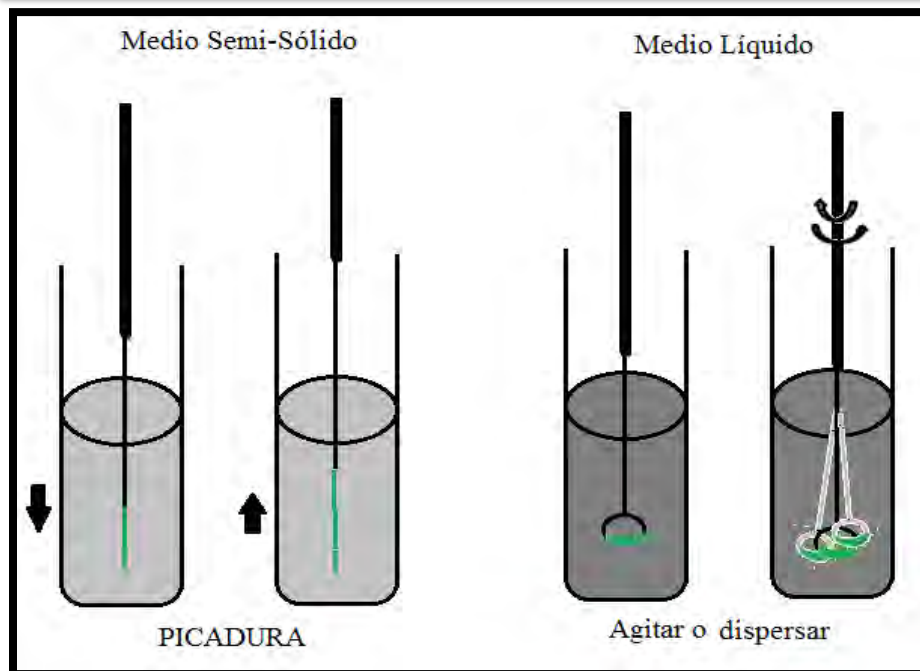


Fig. 12. Formas de inoculación de medios de cultivo semisólido y líquido en tubo.



Foto 47. Inoculación por picadura.



Foto 48. Inoculación por estría en agar inclinado.

Existen otras técnicas de estriación, con ligeras modificaciones, que persiguen fines concretos: estriación de varias placas en cadena para muestras con flora mixta difícil de separar (aislamiento por agotamiento), descarga central con estriaciones laterales para muestras con escaso contenido microbiano, estriación libre, vaciado en placa y por diluciones en tubo para recuento de unidades formadoras de colonias.

Después del sembrado o la inoculación, los medios deben de incubarse a temperatura óptima lo más pronto posible, para la mayoría de los patógenos humanos esta próxima a la corporal (37°C). Solo en ocasiones se incuban a temperaturas más elevadas con el fin de seleccionar algún patógeno (42°C) o a temperaturas más bajas para lograr el aislamiento de los que no toleran la temperatura corporal (25°C). Así como una atmósfera con oxígeno o dióxido de carbono según sea el requerimiento del microorganismo.

Los cultivos se examinan habitualmente después de 18-24 horas de incubación, algunas bacterias necesitan una incubación adicional para desarrollarse bien y han de mantenerse hasta 48 ó 72 horas.

El estudio macroscópico de colonias bacterianas (morfología colonial) debe ser observado con el microscopio estereoscópico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. El más usado en el laboratorio de microbiología básico es el microscopio estereoscópico. El diseño de este instrumento es también llamado lupa binocular, pues se utiliza para ofrecer una imagen estereoscópica (3D) de la muestra.



Cada colonia procede de una sola bacteria generalmente (UFC) y es el resultado de la agrupación masiva de su descendencia. Las colonias presentan unas características muy variadas en cuanto a su tamaño, morfología, aspecto, consistencia, textura y color, que constituyen un interesante elemento para su identificación taxonómica.



Fig. 13. Partes que componen al microscopio estereoscópico.

BORDE	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE
REDONDEADO	PUNTIFORME	PLANA	LISA O RUGOSA
ONDULADO	CIRCULAR	CONVEXA	MATE O BRILLANTE
LOBULADO	FILAMENTOSA	PLANO-CONVEXA	INVASIVA O SUPERFICIAL
ESPICULADO	IRREGULAR	ACUMINADA	COLOR
FILAMENTOSO	RIZOIDE	UMBLICADA	AMARILLA BLANCA
RIZOIDE	FUSIFORME	PAPILADA	GRIS ROJA
			NEGRA ROSA
			Consistencia
			SECA CREMOSA MUCOIDE

Fig. 14. Estudio macroscópico de las colonias bacterianas.



Foto 48.
Escherichia coli
Lactosa (+).
Colonias grandes, rosa
intenso con halo de
precipitación.

AGAR DE MAC CONKEY



Foto 49.
Salmonella typhimurium
Lactosa (-).
Colonias medianas,
incolores
transparentes.

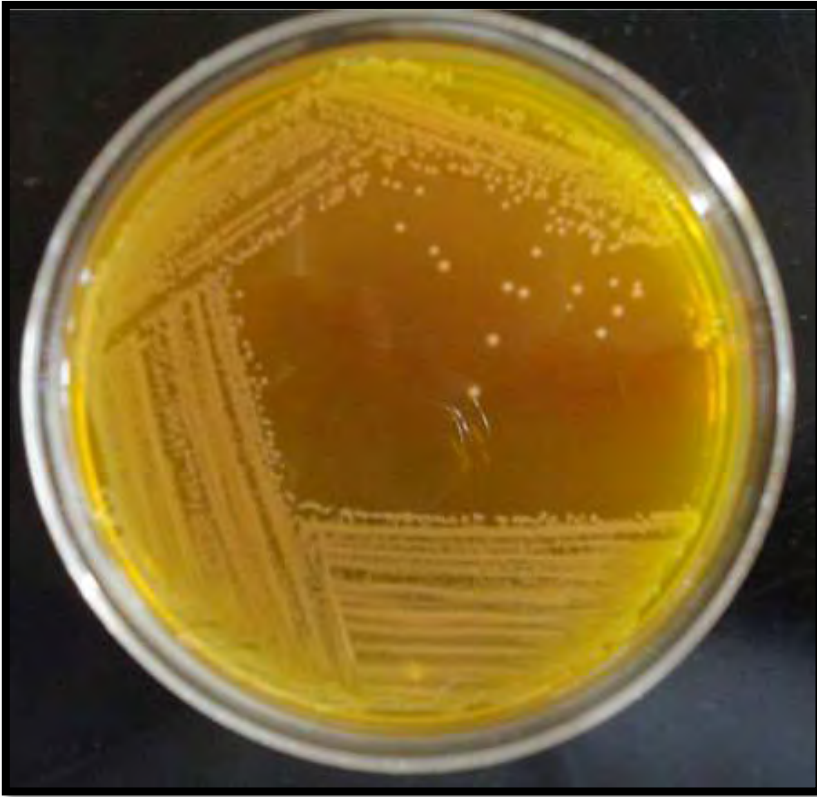


Foto 50.
Escherichia coli
Lactosa (+).
Crecimiento inhibido o
colonias amarillas a
verdes.

AGAR VERDE BRILLANTE

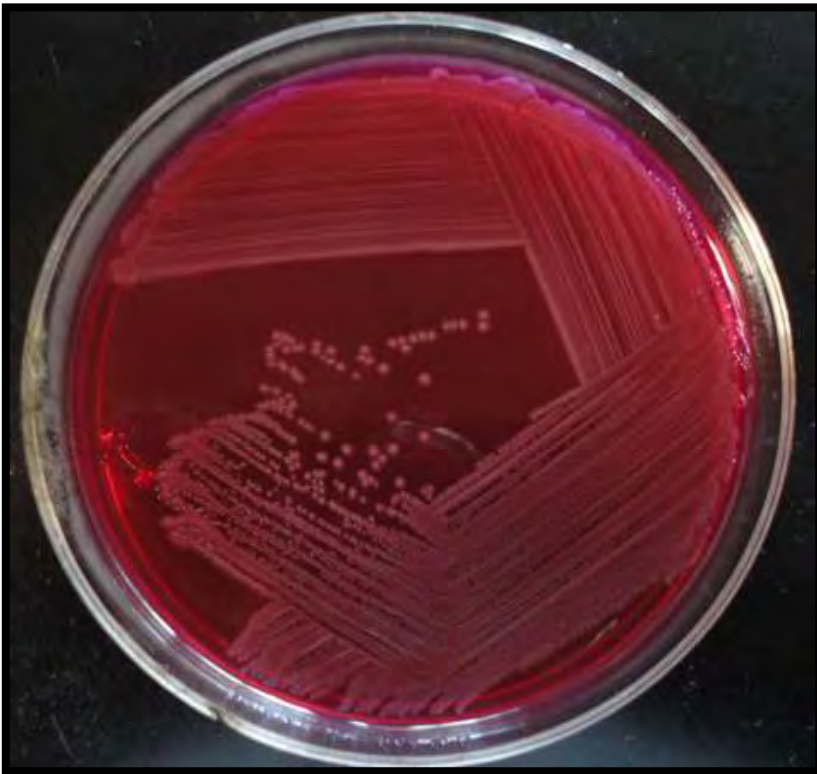


Foto 51.
Salmonella typhimurium
Lactosa (-).
Crecimiento bueno,
colonias rosa a rojas,
translúcidas con halo
rojo brillante.

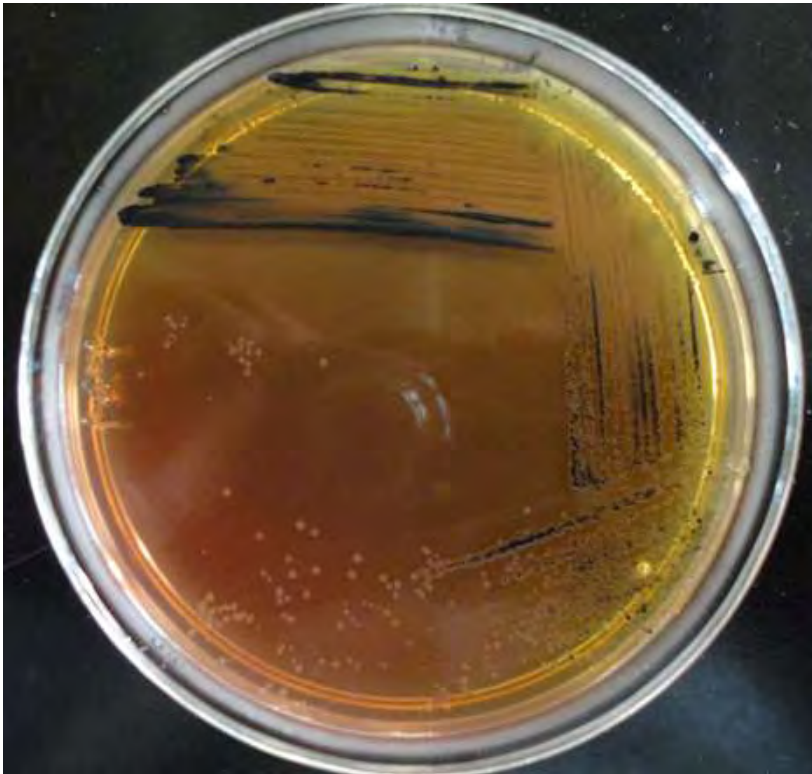


Foto 52.

Salmonella typhimurium
Lactosa (-).
Colonias medianas,
incoloras transparentes
con centro negro.

AGAR SALMONELLA Y SHIGELLA

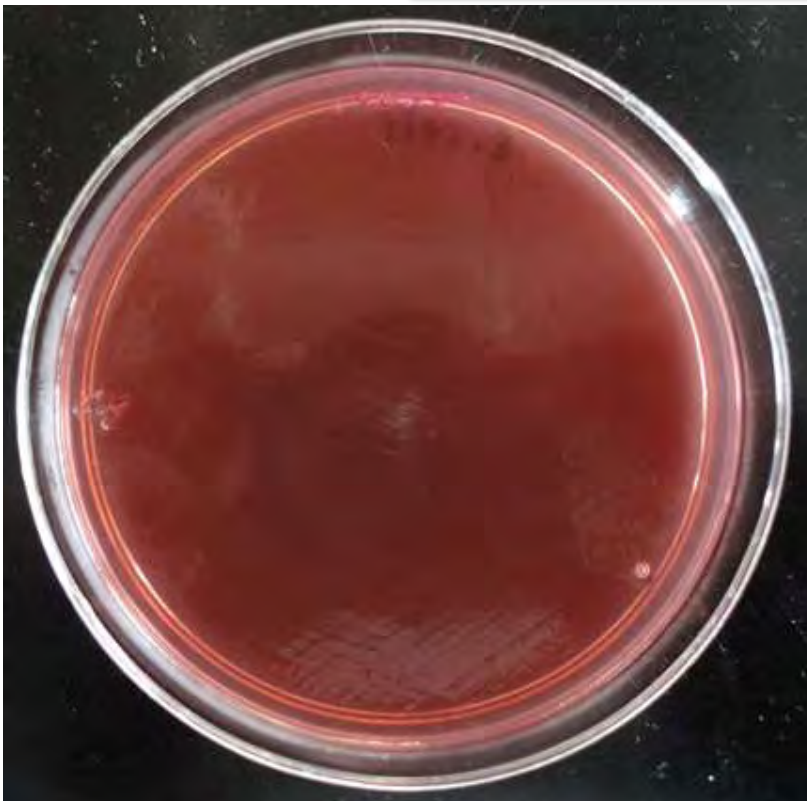


Foto 53.

Escherichia coli
Lactosa (+).
Marcada inhibición o
colonias rosa intenso
con halo de
precipitación.

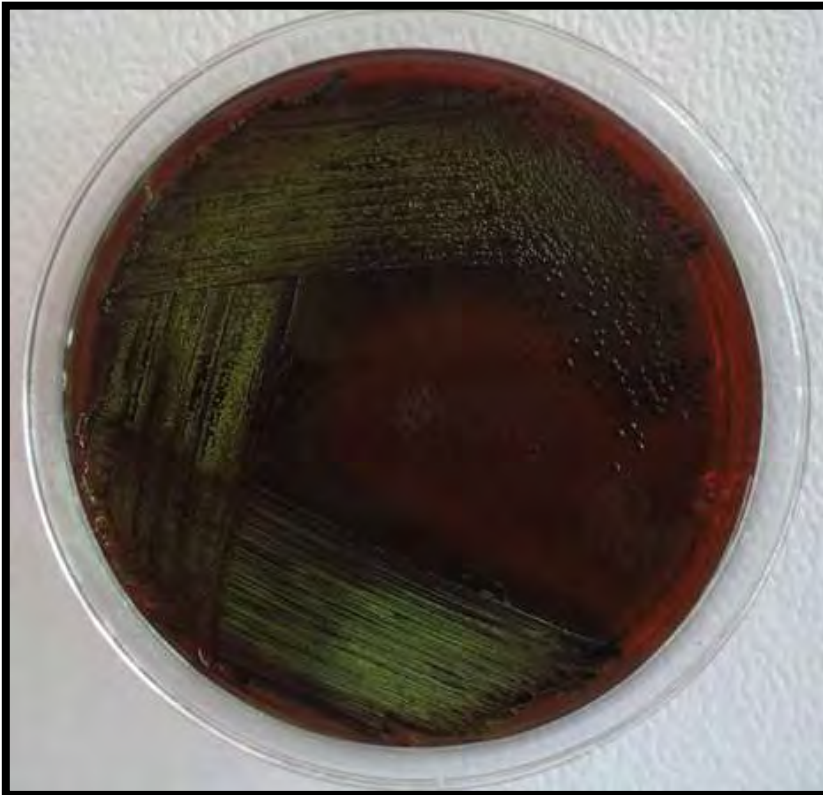


Foto 54.

Escherichia coli
Lactosa (+).
Colonias azules a moradas, con brillo metálico azul verdoso.

AGAR EOSINA Y AZUL DE METILENO

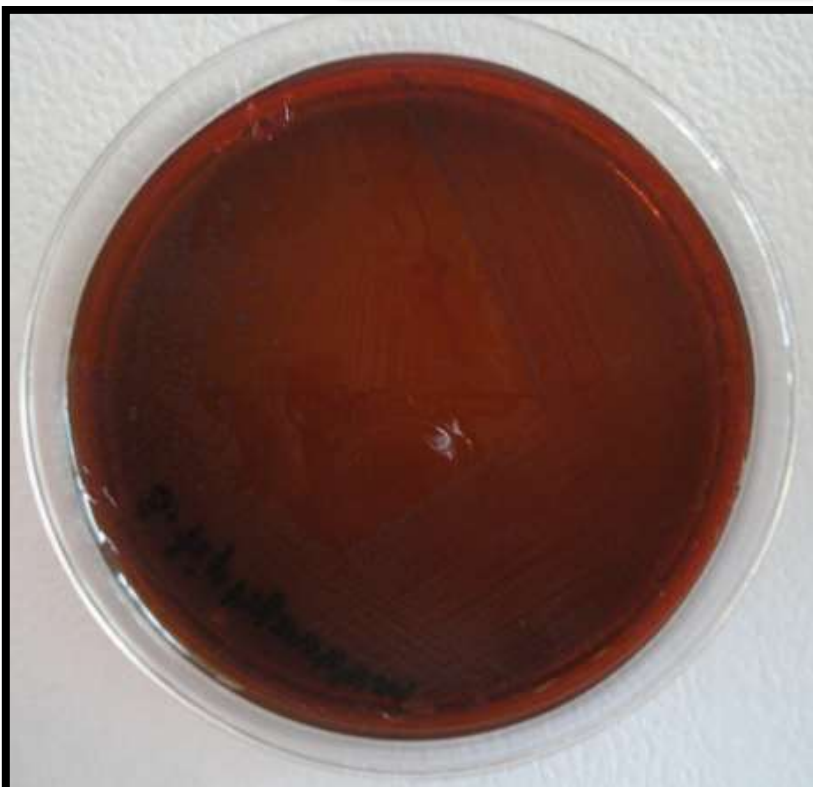


Foto 55.

Salmonella typhimurium
Lactosa (-).
Colonias incoloras,
transparentes.



Foto 56.
Staphylococcus aureus
Manitol (+)
Colonias con pigmento
amarillo característico
y halo de color
amarillo.

AGAR DE SAL Y MANITOL

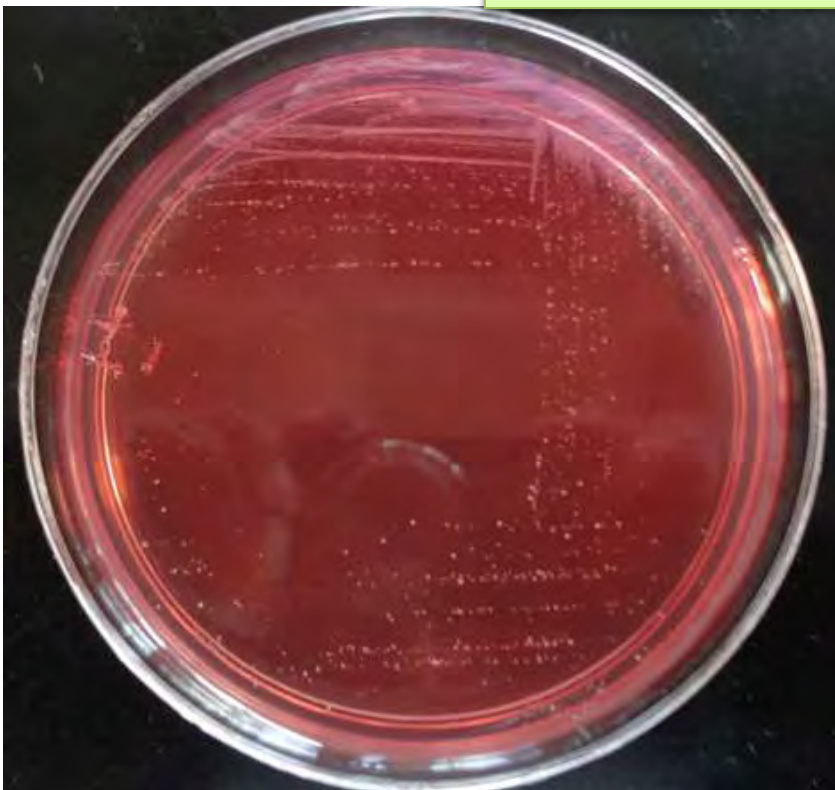


Foto 57.
*Staphylococcus
epidermidis*
Manitol (-)
Colonias blancas, con
halo rosa-rojo.

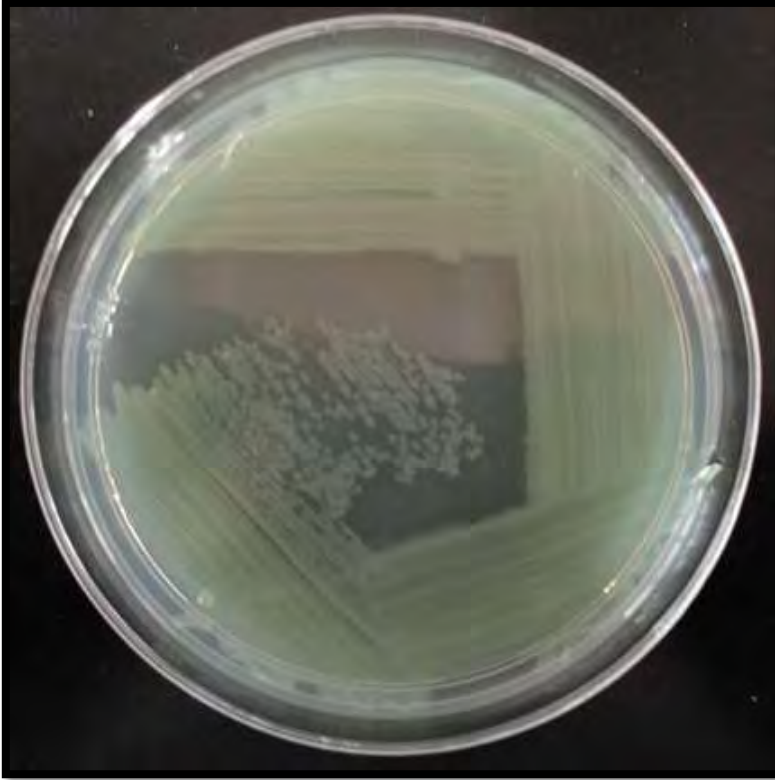


Foto 58.
Pseudomonas aeruginosa.
Crecimiento con pigmento
verde alrededor de las
colonias

AGAR CETRIMIDA

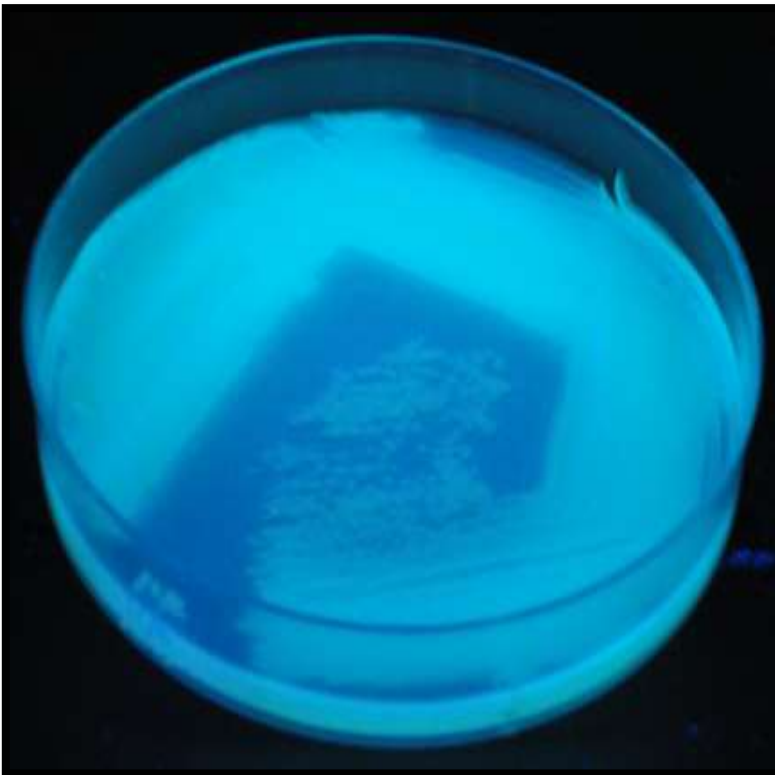


Foto 59.
Pseudomonas aeruginosa
Fluorescencia bajo luz
UV (254 nm)

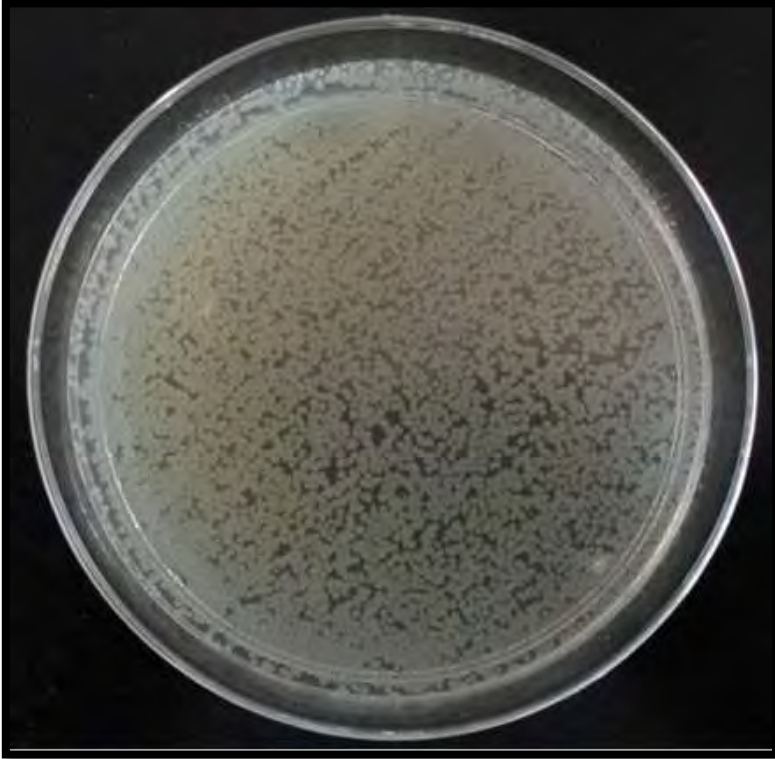


Foto 60.
Crecimiento masivo de
Escherichia coli en Agar
de Nutritivo.



Foto 61.
Tipos de hemolisis en
Agar Sangre:
Beta o Completa. Alfa o
Parcial. Gamma o nula.



TEMA 6

TINCIONES

En general todas las bacterias vivas son prácticamente incoloras o imperceptibles, pero si se tiñen se produce un gran contraste con respecto al medio que las rodea. Además, algunos de estos colorantes pueden también teñir estructuras internas o externas de la bacteria, lo que nos sirve para observar su morfología, flagelos, esporas, o conocer características tintoriales orientándonos hacia un grupo taxonómico u otro en la clasificación bacteriana.

Las técnicas de coloración, como primer paso, constituyen una práctica diaria en el laboratorio de microbiología, por lo que se deberá considerar que son muchos los factores que pueden alterar los resultados obtenidos en toda técnica de tinción.

Para teñir los microorganismos se disponen de un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos con carácter de proporcionar color: los colorantes, dichos compuestos son mas o menos complejos en cuanto a su estructura molecular y, de acuerdo con esto, se clasifican en diversos grupos:

- Colorantes según su origen: naturales y artificiales.
- Colorantes según su comportamiento químico: ácidos, básicos y neutros.

Existen también diferentes tipos de tinciones bacterianas como son:

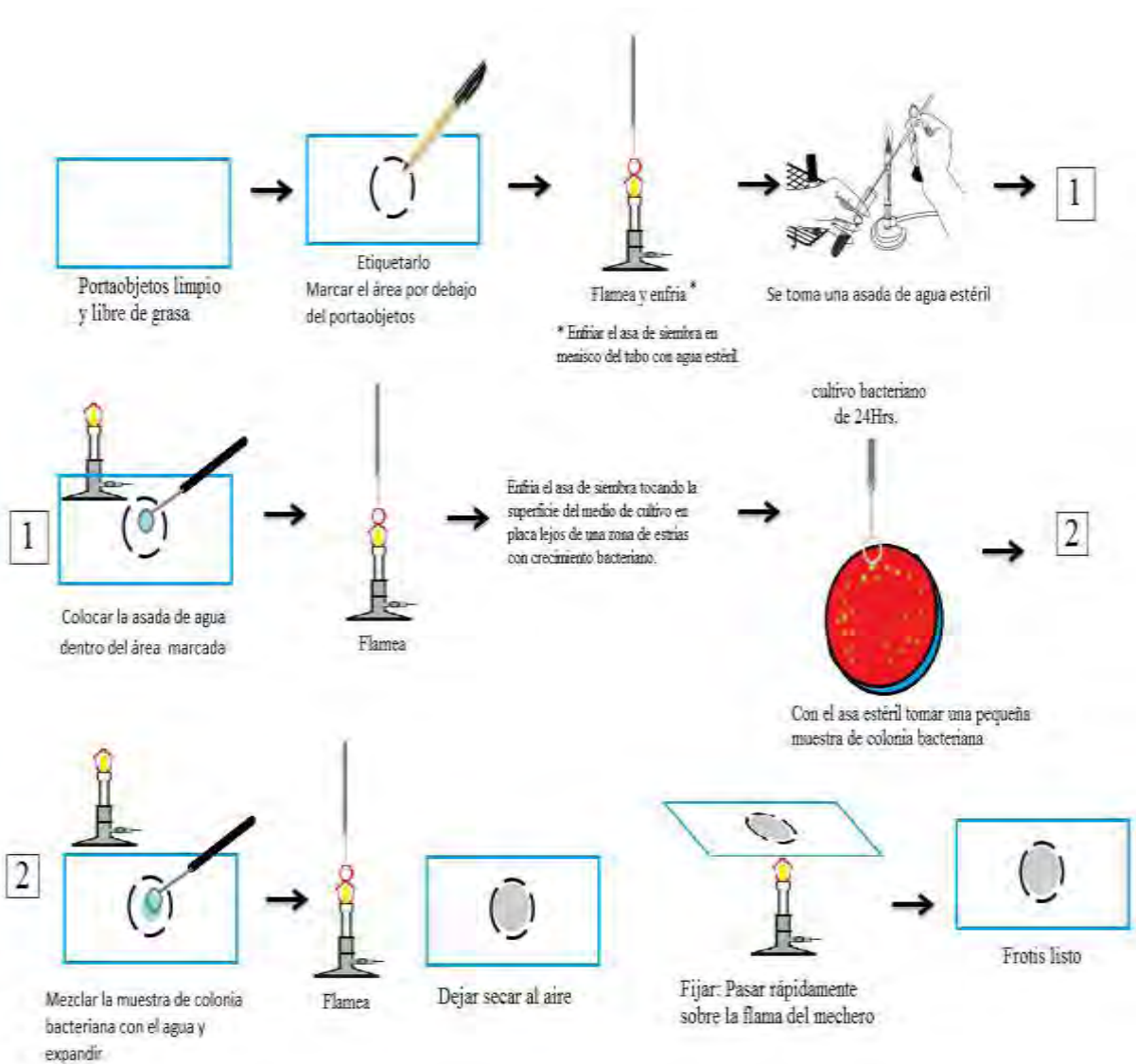
1. Tinciones simples: las cuales necesitan una fijación previa, solo se une un solo colorante, y permite la visualización de la morfología bacteriana.
2. Tinción negativa: es un tipo de tinción simple pero con ciertas diferencias, ya que nos permite observar características estructurales de las bacterias además de su morfología. No necesita fijación previa. Se utiliza un solo colorante. Nos permite visualizar sobre un fondo oscuro la forma de la bacteria además de alguna otra característica estructural, como es la presencia de cápsula.
3. Tinciones diferenciales. Estas tinciones requieren de una fijación previa generalmente por calor. Se utilizan dos colorantes, siendo el último el colorante de contraste. Nos permite visualizar su morfología y otras características, como pueden ser el diferenciar la pared bacteriana, su resistencia a la decoloración ácida, etc.



Así pues, los principales factores que pueden afectar a una tinción son:

- Pureza, concentración y pH del colorante.
- Conservación y su elaboración del colorante.
- Técnica empleada.
- Temperatura.
- Cantidad de muestra.
- Realización correcta del frotis.
- Soluciones mordientes.
- Tiempos de tinción.
- Viabilidad del cultivo.

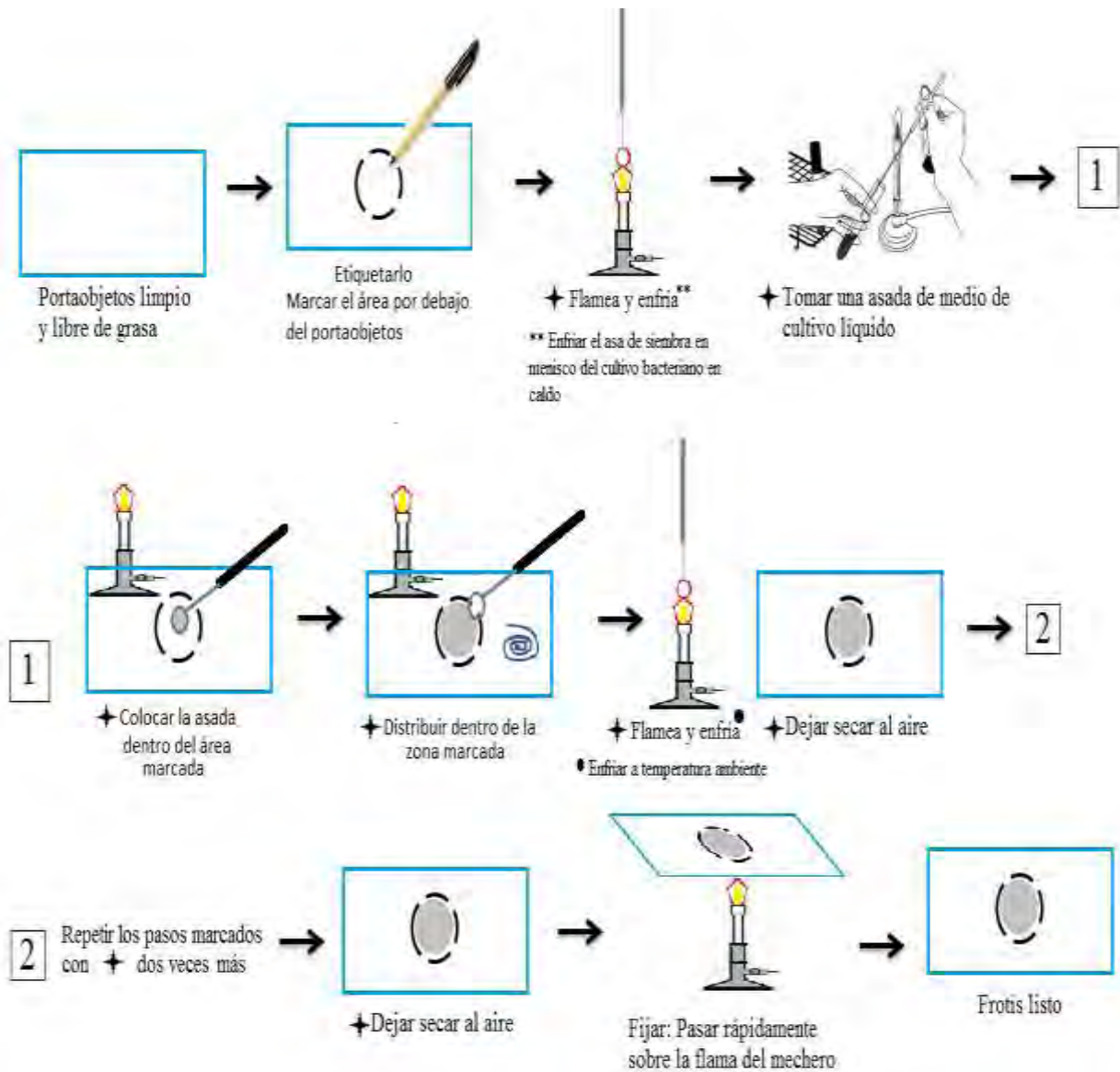
Fig. 15. Preparación de un frotis bacteriano a partir de una muestra de un medio sólido.



NOTA: con la práctica podrás realizar hasta 5 frotis en un solo portaobjetos.



Fig. 16. Preparación de un frotis bacteriano a partir de una muestra líquida.



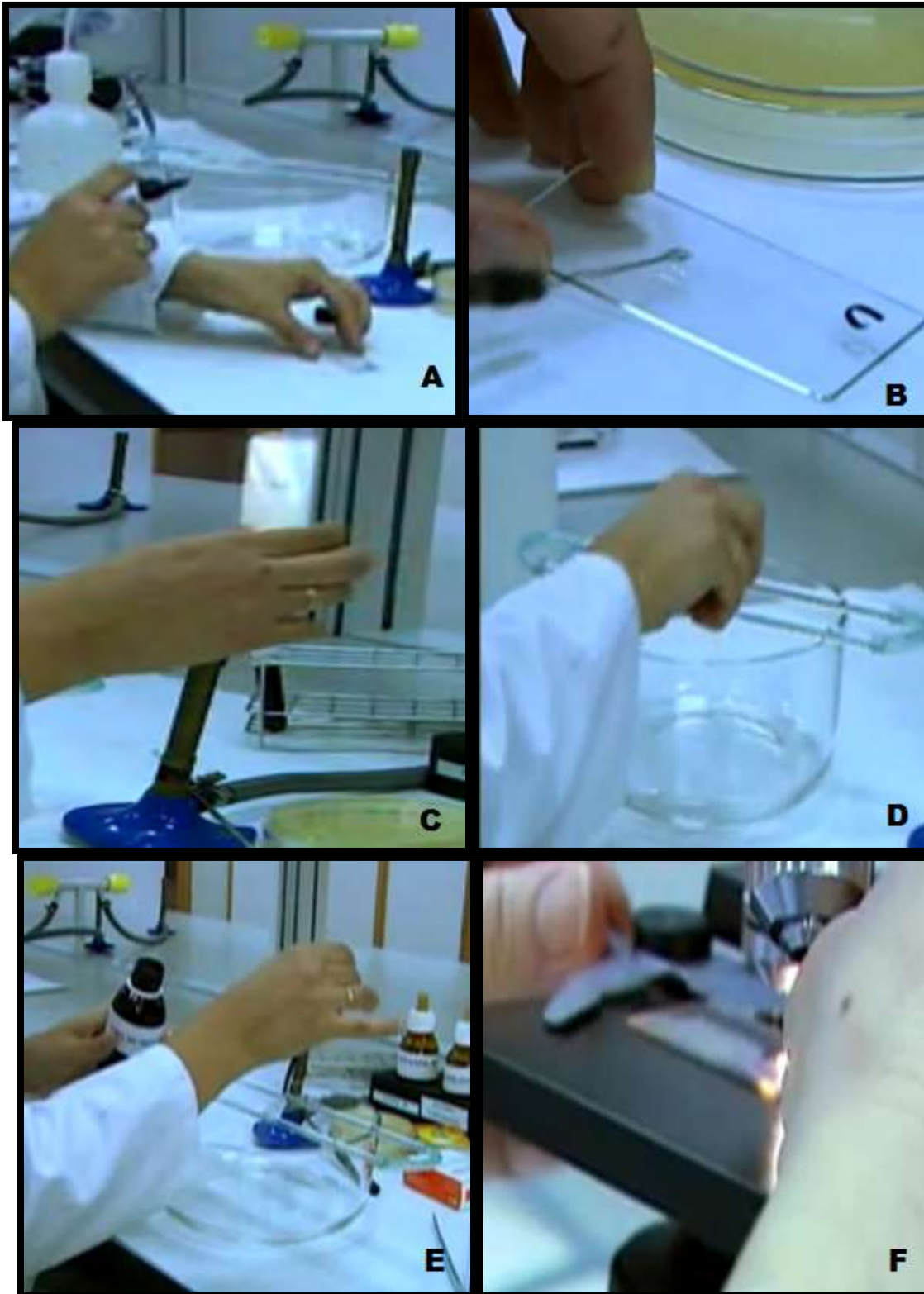
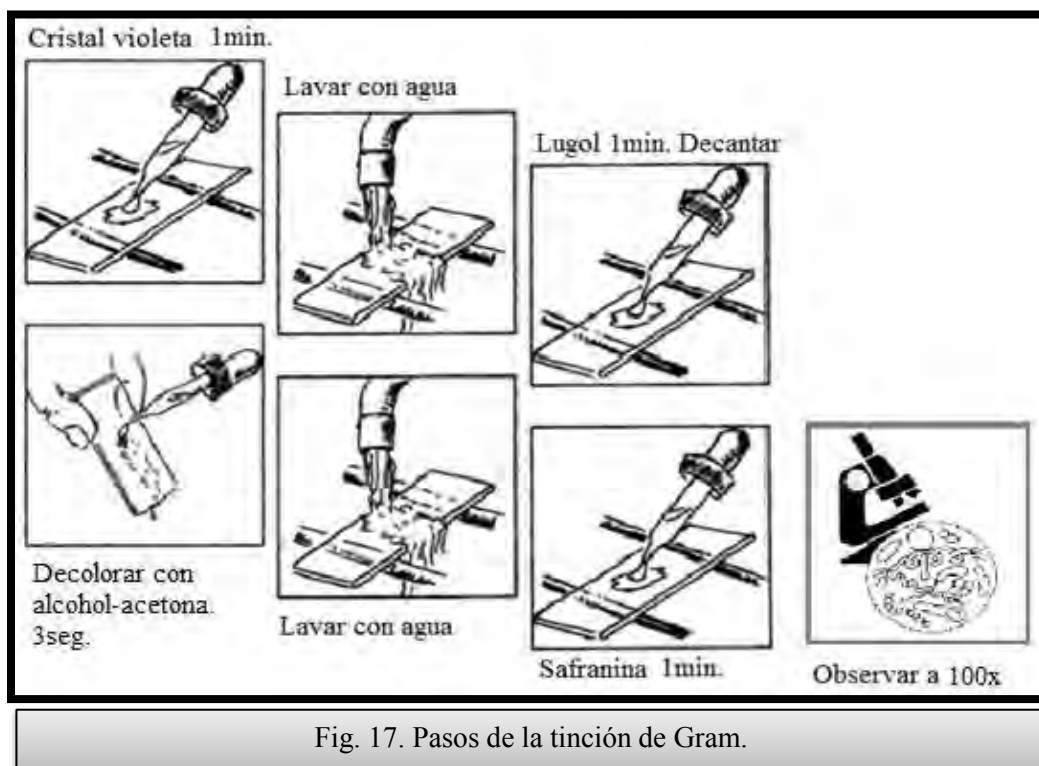


Foto 62. Serie fotográfica donde se observa los diferentes pasos de una tinción: **A.** rotulo del portaobjetos, **B.** elaboración de un frotis, **C.** fijación, **D.** tinción y **E.** montaje en el microscopio óptico.



Método para realizar la tinción de Gram

1. Realizar un frotis a partir de una colonia bacteriana obtenida de un cultivo de 18 a 24 horas, la cual este aislada y pura (ver figura 15).
2. Fijar la preparación pasándola rápidamente sobre la flama de l mechero.
3. Agregar 2 gotas de cristal violeta cubriendo toda la zona de muestra, dejar en reposo durante 1 minuto.
4. Lavar levemente al chorro de agua, escurrir.
5. Agregar 2 gotas de lugol cubriendo toda la zona de muestra, dejar en reposo durante 1 minuto.
6. Transcurrido el tiempo decantar el lugol.
7. Decolorar con 2gotas de alcohol – acetona (3 segundos) y lavar inmediatamente al chorro de agua.
8. Agregar 2 gotas de safranina cubriendo toda la zona de muestra, dejar en reposo durante 1 minuto.
9. Lavar levemente al chorro de agua, escurrir y dejar secar al aire.
10. Observar al microscopio. Enfocar en objetivo de 10x, pasar a 40x y observar en el objetivo de 100x adicionándole 1 gota de aceite de inmersión (Ver Anexo 7).



Interpretación:

- Células bacterianas de color rojo-rosado Gram (-)
- Células bacterianas color violeta-azul Gram (+)

Fundamento de la tinción de Gram consultar el tema 7 de esta guía.

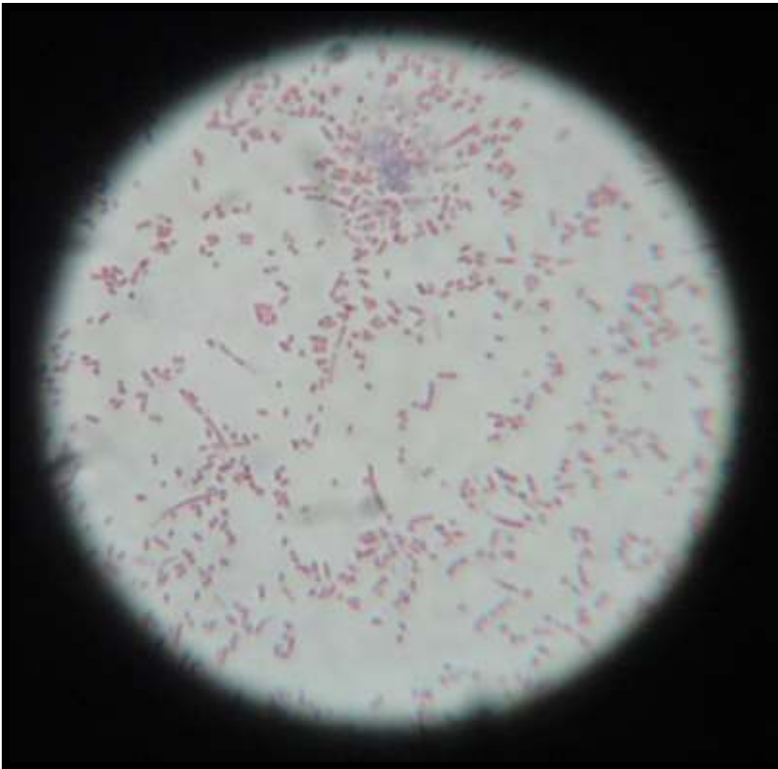


Foto 63. Cocobacilos Gram (-) en pares y sin agrupación (Tinción de Gram 100x).

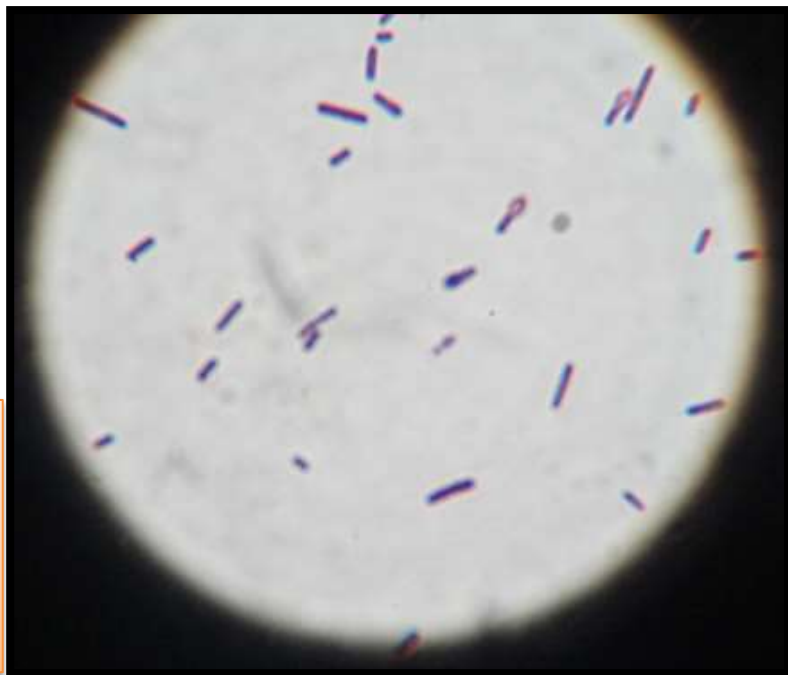


Foto 64. Bacilos largos Gram (+) sin agrupación; con esporas deformantes terminales. (Tinción de Gram 100x).



Técnica para realizar la tinción de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Método de Ziehl-Neelsen.

1. Realizar un frotis de una colonia bacteriana obtenida de un cultivo de 72 a 120 horas por su lento crecimiento, la cual este aislada y pura.(ver figura 15)
2. Color un fragmento de papel filtro encima de los frotis cubriendo el extendido.
3. Disponer dos varillas de vidrio en forma paralela a una distancia aproximadamente 5 centímetros entre una y otra sobre un soporte dentro de la tarja/pileta de decoloración.
4. Colocar sobre el soporte los frotis fijados manteniendo el orden y una separación de al menos 1 cm entre ellas.
5. Cubrir totalmente la superficie del extendido con fucsina.
6. Con la llama de una antorcha calentar suavemente por debajo de los extendidos, hasta observar el desprendimiento de vapores blancos manteniéndolos durante 5 minutos. No calentar con mechero, no dejar secar el preparado agregar más fucsina y no dejar que hierva el colorante.
7. Con una pinza, levantar cuidadosamente el fragmento del papel filtro del portaobjetos y desecharlo en un frasco con fenol 5%.
8. Tomar con las pinzas el portaobjetos y enjuagar con abundante agua a baja presión*, girar para lavar la parte de abajo. Inclinar la laminilla para eliminar el exceso de agua.
9. Decolorar con solución alcohol-ácido (ver Anexo 5) cubriendo en su totalidad el extendido, dejando actuar aproximadamente 30 segundos.
10. Enjuagar con abundante agua a baja presión*. Inclinar la laminilla para eliminar el exceso de agua.
11. Cubrir totalmente la superficie del extendido con azul de metileno. Dejando actuar durante un minuto.
12. Enjuagar con abundante agua a baja presión. Inclinar el frotis sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de agua y dejar secar a temperatura ambiente.
13. Observar al microscopio. Enfocar en objetivo de 10x, pasar a 40x y observar en el objetivo de 100x adicionándole 1 gota de aceite de inmersión (Ver Anexo 7).

*NOTA: Recolectar los desechos de enjuagado en un frasco con Benzal o fenol 5% para su posterior inactivación.

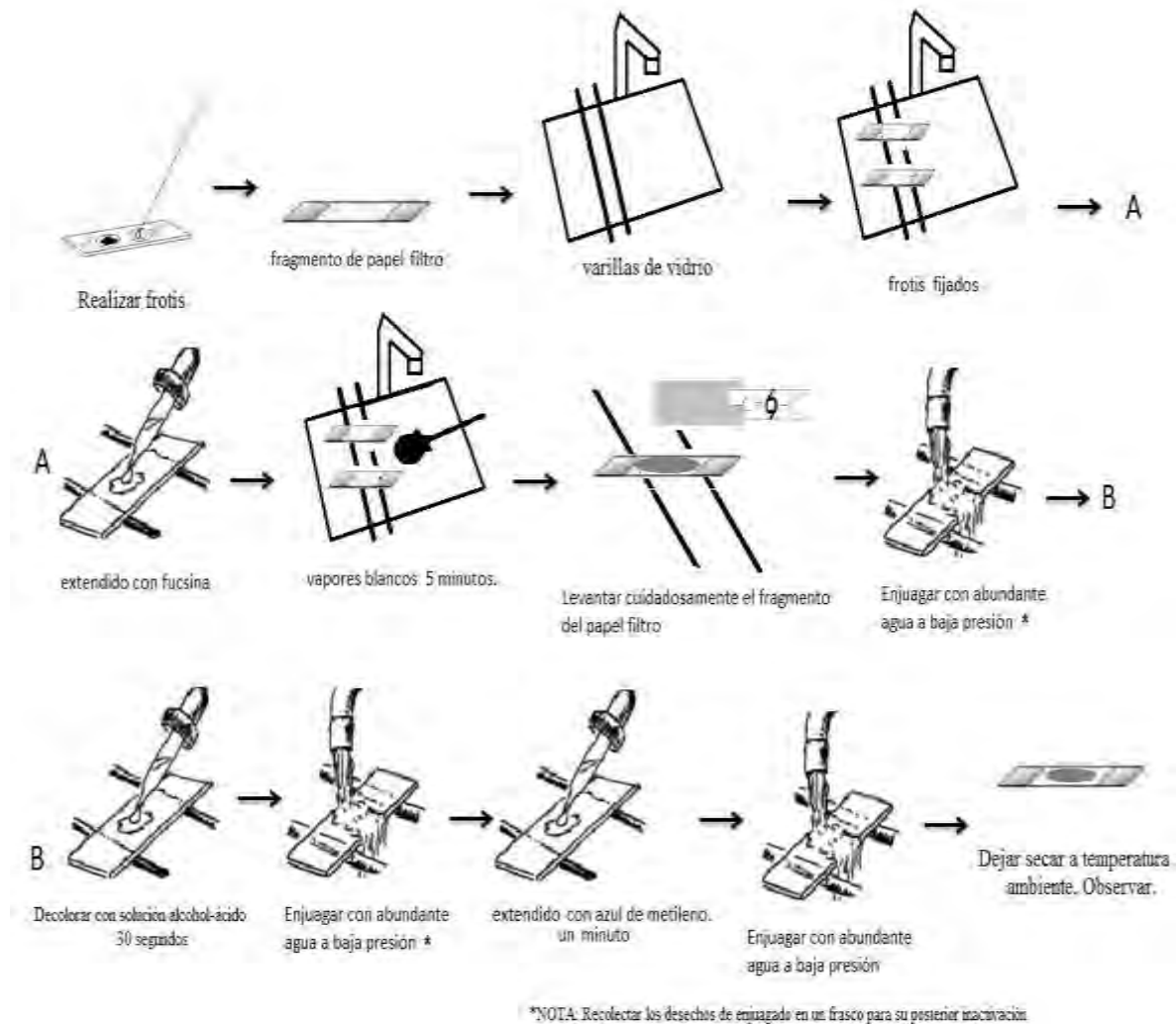


Fig. 18. Pasos de la Técnica para realizar la tinción de BAAR.

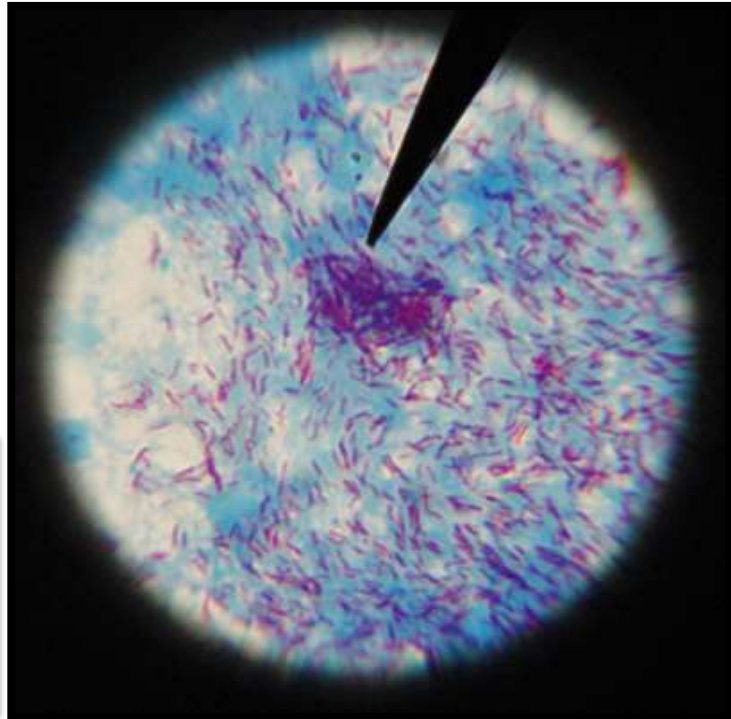
Interpretación:

- Bacilos teñidos de color azul sobre un fondo del mismo color: Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (-).
- Bacilos teñidos de color rojo sobre un fondo verde: Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (+).

Los bacilos alcohol-ácido resistente se denomina así porque su pared celular contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Se requiere calor o un decolorante para permitir que el colorante primario penetre.



Foto 65. Bacilos teñidos de color rojo sobre un fondo azul: Bacilo ácido-alcohol resistentes. (Tinción de Ziehl-Neelsen.100x).



Técnica para la tinción de esporas (Método de Schaeffer-Fulton)

1. Realizar un frotis a partir de un cultivo de Cooked Meat (ver Anexo 4) previamente preparado.
2. Sumergir los frotis en verde de malaquita (ver Anexo 5) colocado en un contendor para su calentamiento.
3. Calentar hasta observar el desprendimiento de vapores blancos. Manteniéndolos durante 5 minutos. No calentar con mechero, no dejar secar el preparado agregar más verde de malaquita, y no dejar que hierva el colorante.
4. Con una pinza retirar el frotis del baño de verde de malaquita. Enjuagar con abundante agua a baja presión, y girar para lavar la parte de abajo. Inclinar la laminilla para eliminar el exceso de agua.
5. Cubrir totalmente la superficie del extendido con safranina. Dejando actuar durante un minuto.
6. Enjuagar con abundante agua a baja presión. Inclinar el frotis sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de agua y dejar secar a temperatura ambiente.
7. Observar al microscopio. Enfocar en objetivo de 10x, pasar a 40x y observar en el objetivo de 100x adicionándole 1 gota de aceite de inmersión (Ver Anexo 7).

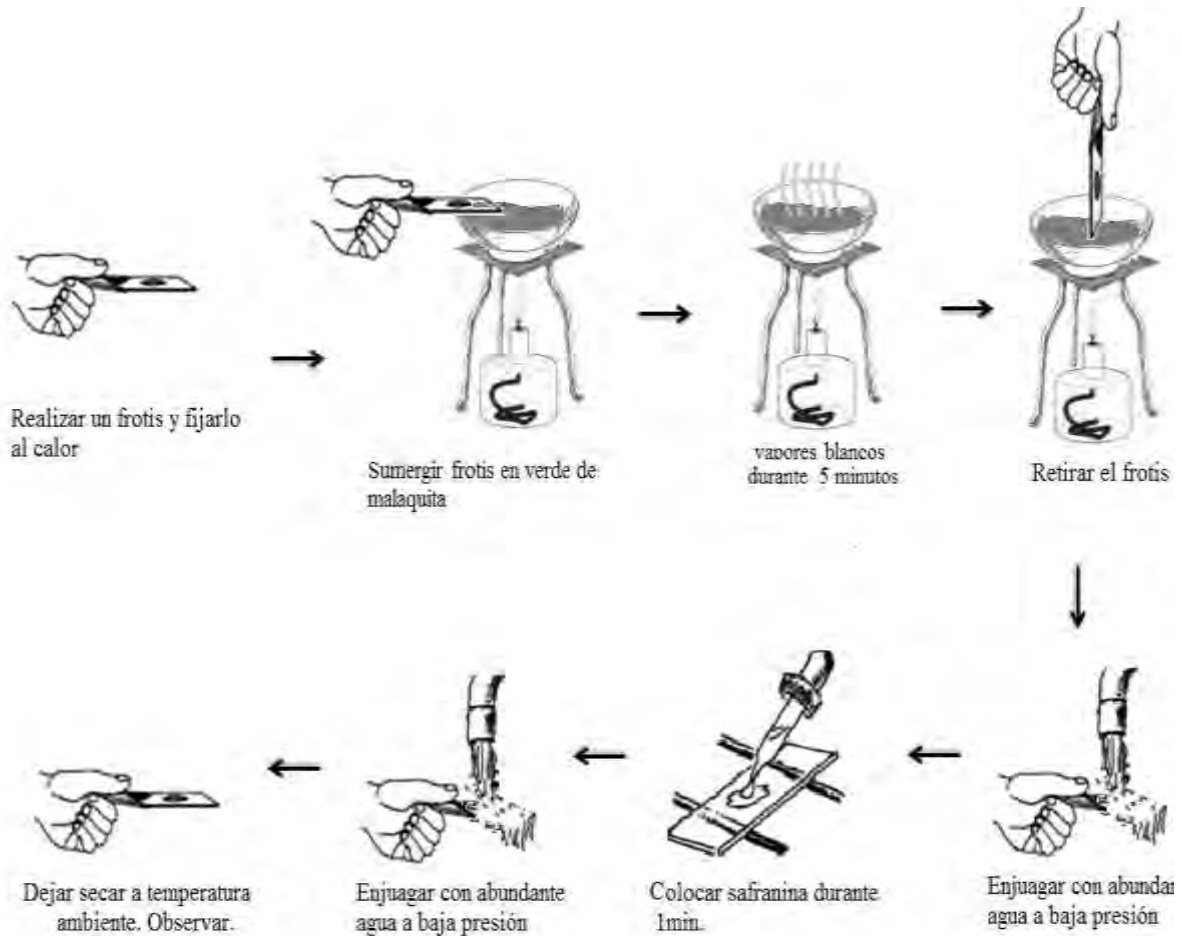


Fig. 19. Pasos de la Técnica para la tinción de esporas.

Interpretación:

- Las esporas se observan de color verde de forma redonda u ovalada, mientras que el fondo se observa de color rojo.
- Es importante también describir si la célula bacteriana sufre o no una deformación a causa de esporulación. Tomando en cuenta estos aspectos se tienen la siguiente forma de describirlas:

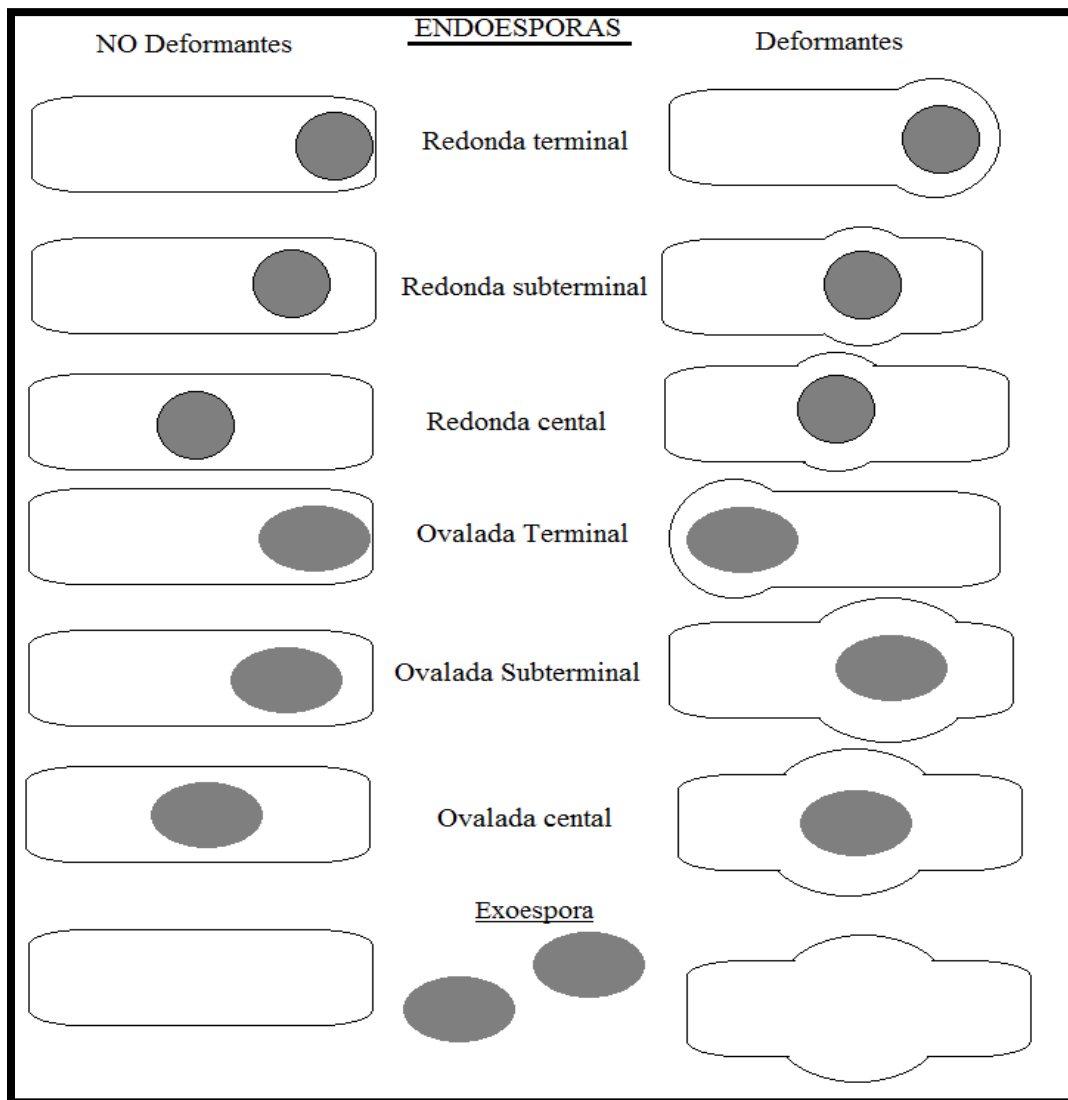


Fig. 20. Forma de describir la forma y posición de la espora, así como el efecto que causa esporulación en la célula bacteriana.



Foto 66. Tinción de Esporas A.

Dentro de las zonas circulares se observan bacilos con esporas terminales y subterminales ovaladas y redondas deformantes.

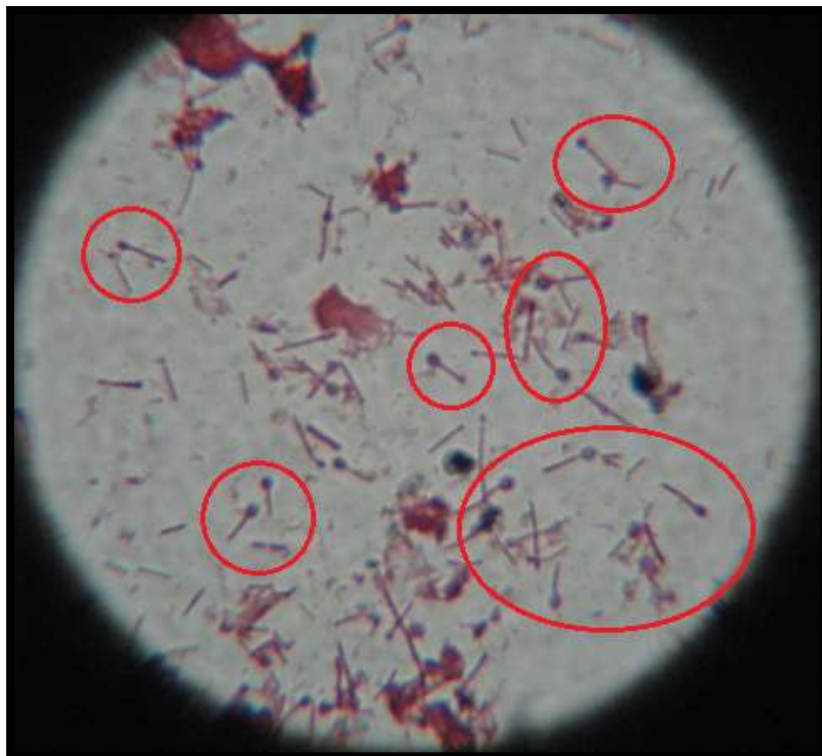


Foto 67. Tinción de Esporas B.

Dentro de las zonas circulares se observan bacilos con esporas terminales redondas deformantes.



Técnica para la tinción de cápsula (tinción negativa)

1. Seleccionar un portaobjetos limpio y libre de grasa.
2. Añadir una gota de tinta china (negra ó azul) en el centro del portaobjetos.
3. Si esta un medio líquido: tomar una gota del crecimiento, depositándola a un costado de la gota de tinta china. Mezclar ambas gotas y extender.
Si es un medio de cultivo sólido: con el asa estéril tomar una pequeña muestra de una colonia. Mezclar en la tinta china y extender.
4. Colocar un cubre objetos en la zona central del portaobjetos.
5. Retirar el exceso de colorante con papel filtro con cuidado de no frotar. Tirar el papel en un contenedor para residuos contaminados.
6. Observar al microscopio en objetivo de 40x.

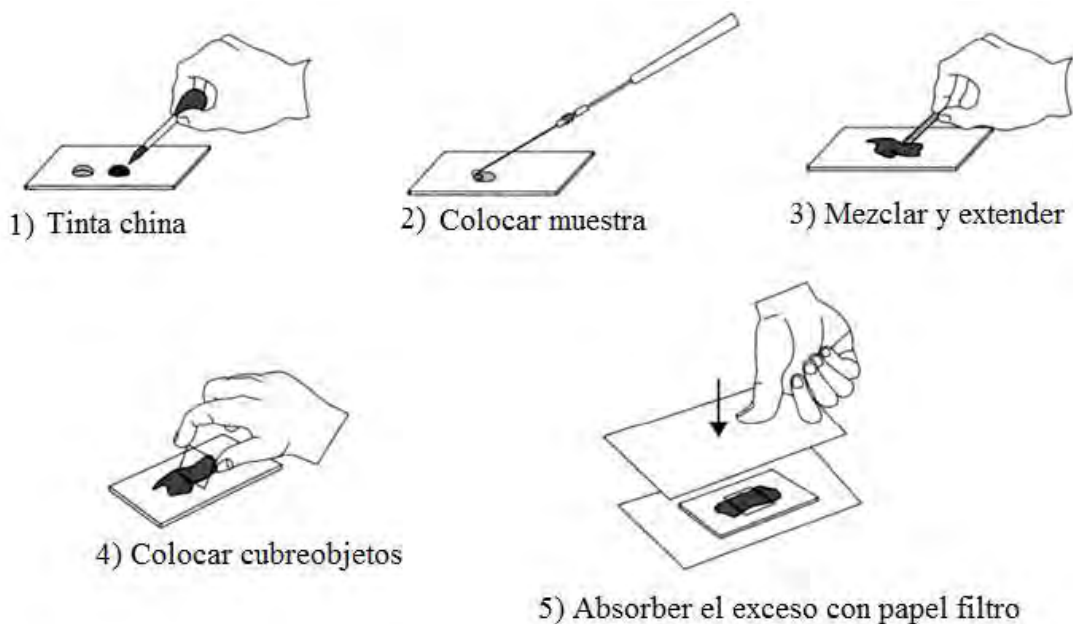


Fig. 21. Pasos de la Técnica para la tinción de cápsula.

Interpretación:

Presencia de Cápsula: La cápsula se muestra como un halo alrededor de la célula bacteriana la cual a adoptado una coloración grisácea que destaca del fondo negro intenso de la preparación.

Ausencia de Cápsula: La célula bacteriana adopta una coloración grisácea más intensa la cual destaca del fondo negro intenso de la preparación. No se observa un halo alrededor de está.



40x

100x

Foto 68. Capsula de *Cryptococcus neoformans* (Tinción negativa).



TEMA 7

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS

La identificación de un aislamiento bacteriano requiere el análisis de la información obtenida por las pruebas de laboratorio. Que describen los perfiles característicos de las bacterias. Las pruebas y el orden en el que se utilizan para la identificación del microorganismo a menudo se denominan esquemas de identificación. Los esquemas de identificación pueden clasificarse en dos categorías: los que se basan en las características genotípicas (genoma bacteriano) de las bacterias y los basados en características fenotípicas (características físicas o metabólicas).

El enfoque fenotípico es el punto de vista clásico para la identificación bacteriana y la mayoría de las estrategias de identificación aun se basan en el fenotipo bacteriano. Y las principales características fenotípicas utilizadas en el diagnóstico son las pruebas que establecen la morfología colonial y las pruebas usadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de bacterias (por medio de la cual puede hacerse una identificación del género o especie). La cuales se lleva a cabo mediante reacciones químicas o mediante el subcultivo del aislamiento primario en una serie de medios diferenciales, cuyos resultados pueden interpretarse después de uno o dos días de incubación.

Existen dos series de pruebas bioquímicas que nos ayudan a identificar a las bacterias: las primarias y las secundarias. La serie de pruebas bioquímicas primarias permiten determinar el género al que pertenece la bacteria aislada; esto no aplica para las Enterobacterias ya que solo nos confirman que pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*. La serie de pruebas bioquímicas secundaria permiten determinar la especie a la que pertenece la bacteria aislada. (Bailón Lira, Cruz González Meléndez y Cervantes Sandoval, 2003).

Las Pruebas Bioquímicas Primarias son:

- Tinción de Gram.
- Catalasa.
- Oxidasa.
- Motilidad.
- OF (Oxidación - Fermentación).



TINCIÓN DE GRAM

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram, quien la desarrolló en 1884. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, gram-positivas y gram-negativas.

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de ácidos lipoteicoico; sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano.

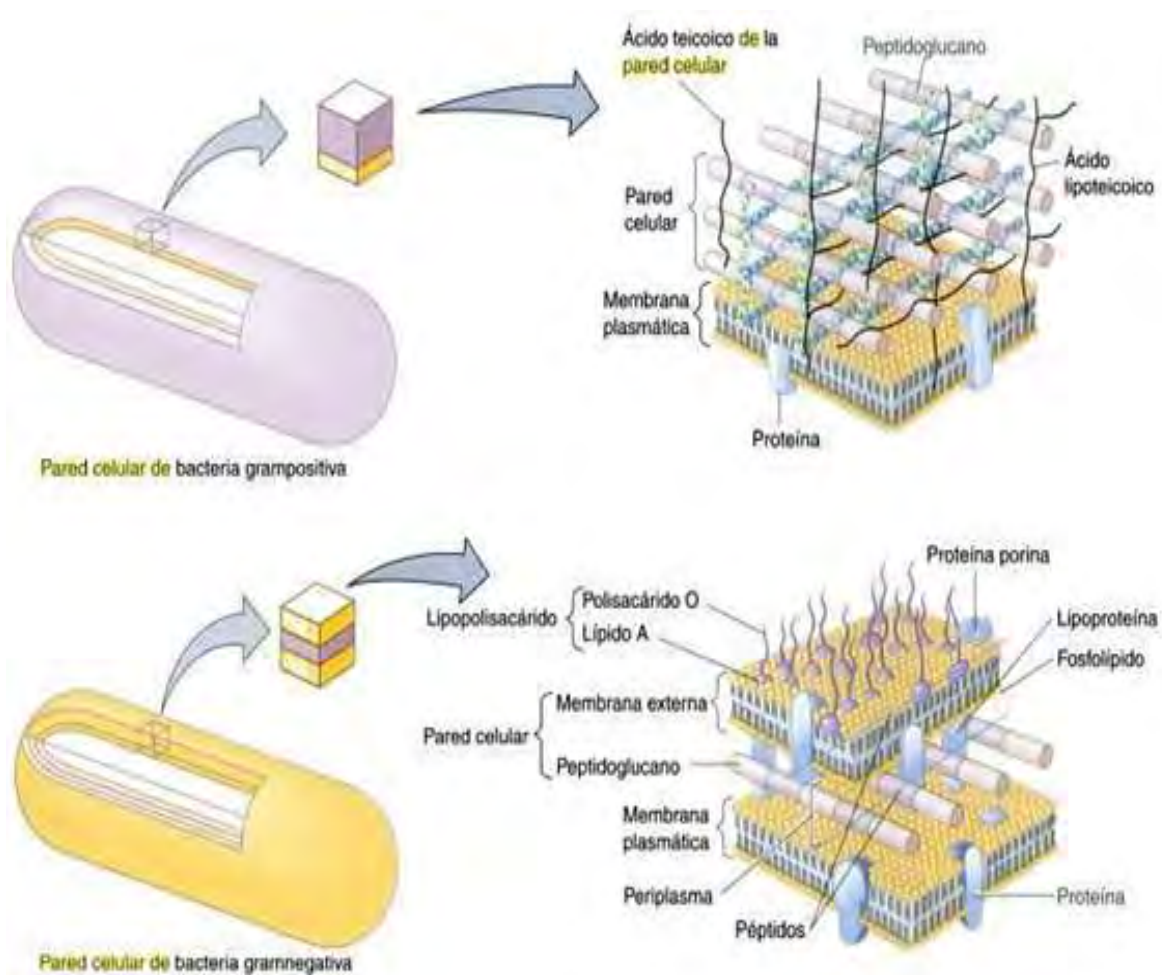


Fig. 22. Esquema de la pared celular de bacterias Gram (+) y Gram (-) (TORTORA, Gerard J., 2007.)



Fundamento:

La célula bacteriana se tiñe con el colorante primario que es el cristal violeta; en este paso todas las células bacterianas ya sean gram-positivas y gram-negativas se tiñen de morado o violeta. Se realizan lavados con agua para eliminar los restos de colorante no fijado. Después añadimos un mordiente que es el lugol (formado por I_2 [yodo] en equilibrio con KI [yoduro de potasio]) el cual permite que el colorante se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana, el cual está presente para solubilizar el yodo. El I_2 entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta. Decantamos el exceso de lugol.

Posteriormente se agrega la mezcla de alcohol-acetona la cual sirve para la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I_2 /cristal violeta. Los organismos gram-positivos no se decoloran por tener más peptidoglicano evitando así la salida del complejo I_2 /cristal violeta, mientras que los gram-negativos sí lo hacen por contener menos péptidoglicano dejando salir el complejos I_2 /cristal violeta. La función del alcohol-acetona es eliminar el colorante de las bacterias por lo que el tiempo de contacto con la célula teñida debe de ser mínimo y lavarse el exceso.

Para poner de manifiesto las células gram-negativas se utiliza un colorante de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina. Después de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen moradas (Guedea Fernández, 2012).

Técnica:

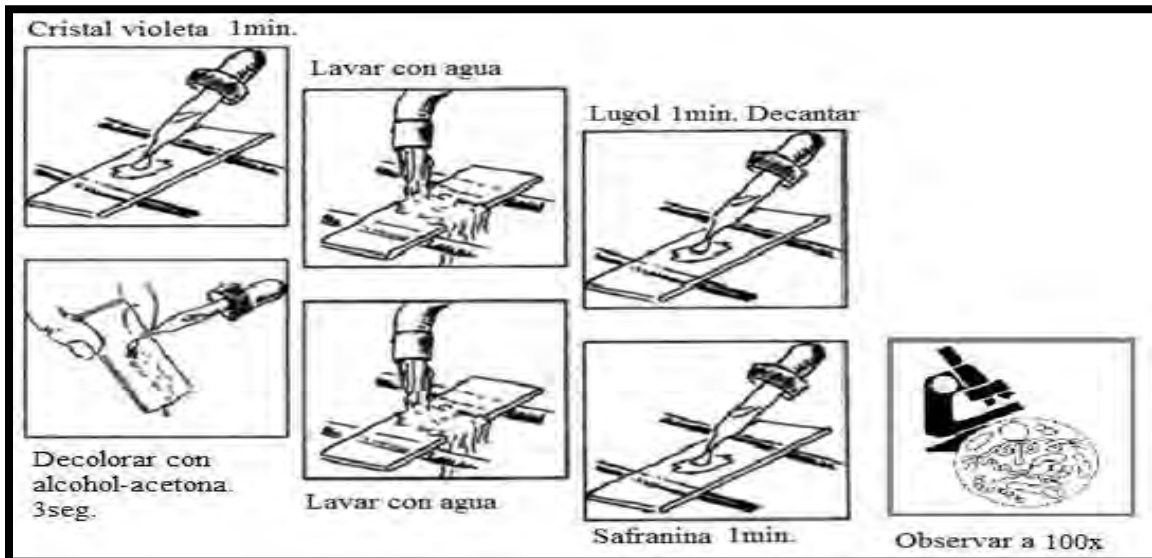


Fig. 17. Pasos de la tinción de Gram.



Interpretación:

Una vez realizada la Tinción de Gram nos permite describir 3 características microscópicas:

- 1) Si se trata de una bacteria gram-positiva o gram-negativa.
 - 2) Identificar la forma de la célula bacteriana.
 - 3) Agrupación de las células bacterianas.
- Gram:
 - Gram (+): célula bacteriana teñida de color morado.
 - Gram (-): célula bacteriana teñida de color rojo.
 - Forma y agrupación

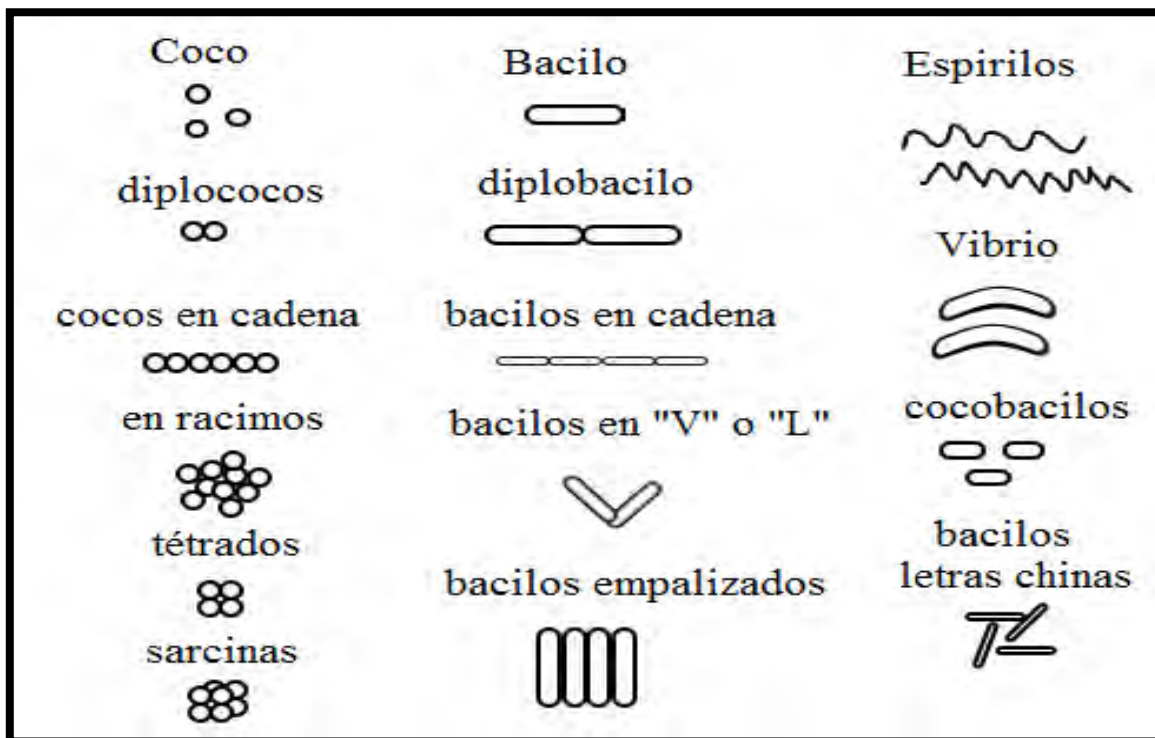


Fig. 23. Forma y agrupación bacteriana.



Foto 69.
Bacilos Gram (-) sin
agrupación.

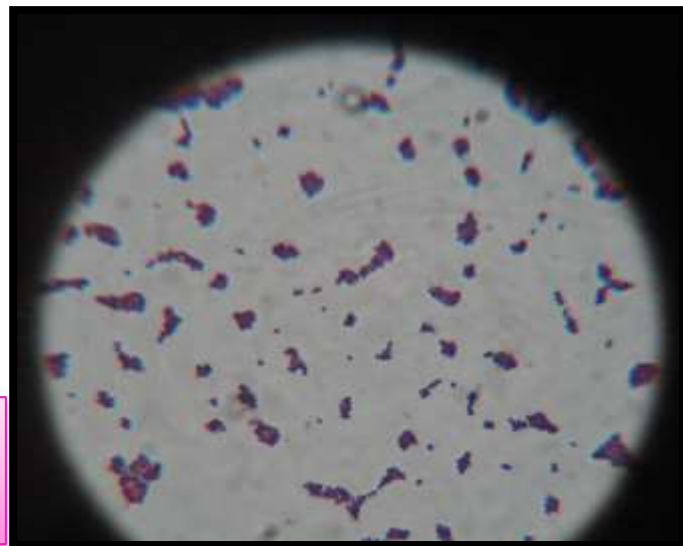


Foto 70. Cocos Gram (+)
en racimos.

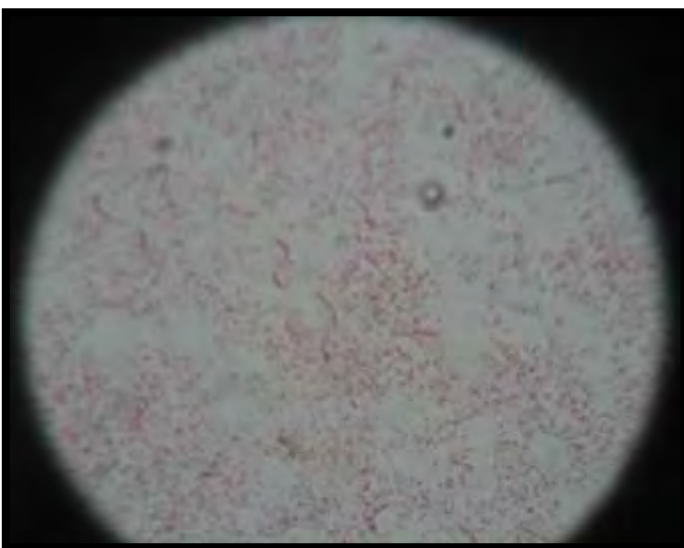


Foto 71. Bacilos Gram (-)
curvos (forma de coma).



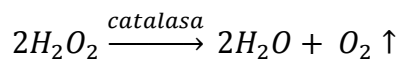
Prueba de Catalasa

La enzima catalasa químicamente son hemoproteínas de estructura similar a la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula se encuentran en estado oxidado (Fe^{3+}) en lugar de reducido (Fe^{2+}). Esta presente en la mayoría de las bacterias aerobias y fermentadoras facultativas (aerotolerantes) que contiene citocromo.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un producto final oxidativo de la degradación aerobia de los azúcares. La catalasa elimina en forma catalítica los intermediarios de la reducción del oxígeno. El H_2O_2 , si se acumula, es tóxico para la bacteria y produce su muerte. Por lo que la enzima catalasa es esencial en la defensa biológica contra la toxicidad del oxígeno (Mac Faddin, 2003).

Fundamento:

Si la bacteria produce la enzima catalasa al ponerla en contacto con el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), este se descompone por la acción de la enzima en agua y oxígeno.



Técnica:

1. En placa:
 - a) En un portaobjetos limpio y desengrasado se coloca una gota de H_2O_2 al 30%.
 - b) Con ayuda de un asa estéril de plástico o un palillo de madera estéril, tomar un inóculo pequeño de la colonia bacteriana de un cultivo de 24 hrs.
 - c) Mezclar el inóculo en la gota de H_2O_2 y observar la reacción (burbujeo).

2. En tubo:
 - a) Con ayuda de un palillo de madera estéril, tomar un inóculo pesado de la colonia bacteriana de un cultivo de 24 hrs.
 - b) Tocar con el palillo las paredes de un tubo limpio, dejando el inóculo de bacteria sobre ella.
 - c) Agregar un mililitro de H_2O_2 al 30% y tapar ya sea con algodón o con su tapón de rosca.
 - d) Proceder a que el inóculo bacteriano tenga contacto con el H_2O_2 . Observar la reacción.

Nota: Esta técnica en tubo se realiza solo a bacterias que produce aerosoles.

Interpretación:

Catalasa (+): aparición de burbujas al contacto.

Catalasa (-): ausencia de burbujas al contacto. Prueba de catalasa



Foto 72.

Técnica en placa para la prueba de catalasa.

- A) Aparición de burbujas.
Catalasa (+)
- B) Ausencia de burbujas.
Catalasa (-)

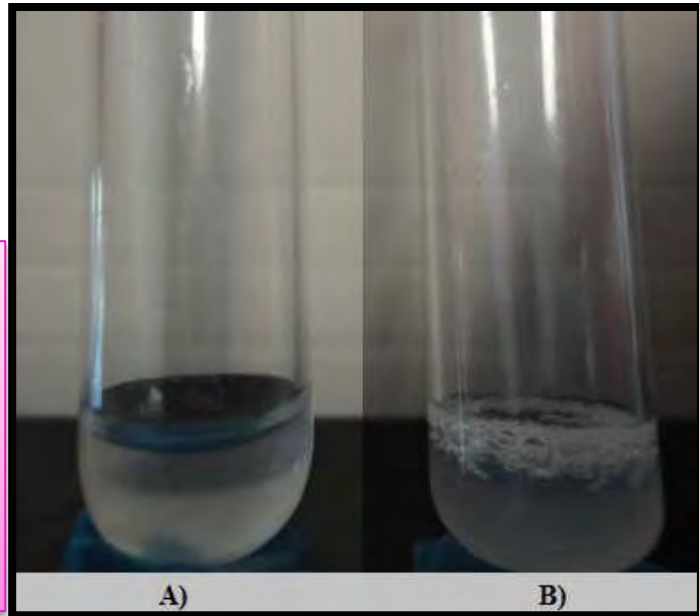


Foto 73.

Técnica en tubo para la prueba de catalasa.

- A) Ausencia de burbujas.
Catalasa (-)
- B) Aparición de burbujas.
Catalasa (+)



Prueba de oxidasa

Esta prueba se basa en la producción de una enzima oxidasa intercelular. Esta reacción de oxidasa se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones. El oxígeno es el aceptor final de hidrógeno y produce agua o peróxido de hidrógeno a partir del hidrógeno. Las oxidasas catalizan la eliminación del hidrógeno de un sustrato pero solo utilizan oxígeno como aceptor de hidrógeno. El sistema citocromo, por lo común presente solo en los microorganismos aerobios, permite a estos utilizar el oxígeno como aceptor final de hidrógeno para reducir el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno, este último eslabón en la cadena de la respiración aerobia. (Mac Faddin, 2003).

Los citocromos son proteínas (hemoproteínas) de color oscuro que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas. Durante la respiración, las moléculas de citocromo aceptan y liberan alternativamente electrones, que pasan a otro citocromo en una cadena de reacciones químicas llamada transferencia de electrones, que funciona con liberación de energía.

Fundamento:

Si la bacteria produce la enzima oxidasa o citocromo oxidasa, está oxidada el citocromo (citocromo *c*), el cual a su vez reacciona con el reactivo N,N,N,N-tetrametil-*p*-fenilendiamina, que es una amina aromática oxidándose y dando como resultado una quinona colorida.

Técnica:

1. En un portaobjetos limpio colocar con ayuda de unas pinzas estériles un disco impregnado del reactivo o una tira disco o comercial para oxidasa (TAXO N BBL).
2. Con ayuda de un palillo de madera estéril, tocar la colonia bacteriana de un cultivo de 24hrs. De modo que este tome un pequeño inóculo con ella. Si la colonia está en un medio de cultivo con sangre evitar rasgar y llevarse parte del agar para no interferir con la reacción, ya que los eritrocitos tienen citocromos. Así como medios de cultivo que en su fórmula contenga colorantes.
3. Poner en contacto el inóculo bacteriano y el disco impregnado con el reactivo. Hacer la lectura antes de los 20s después del contacto.



Interpretación:

Oxidasa (+): zona de contacto coloreada de azul o morado.

Oxidasa (-): zona de contacto no coloreada o amarillenta.

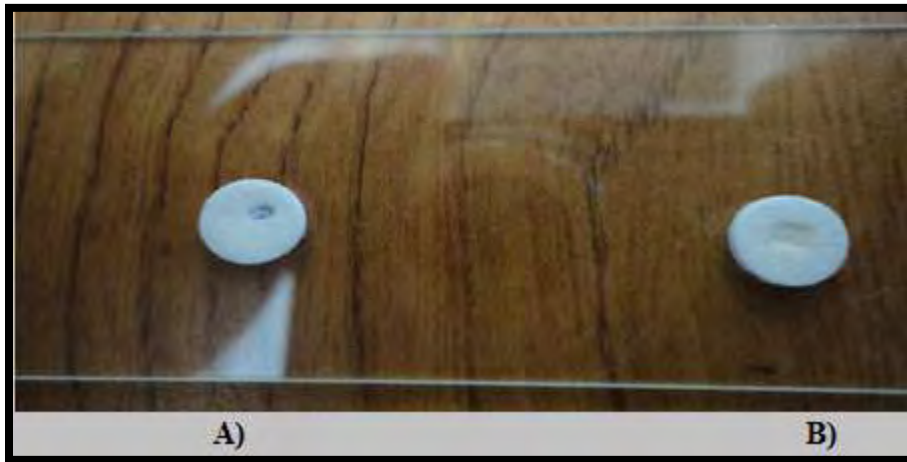


Foto 74.
Técnica en sensidisco para la prueba de oxidasa.
A) Oxidasa (+) B) Oxidasa (-)



Foto 75. Presentaciones del reactivo de lectura para la prueba de oxidasa.



Prueba de motilidad

Las bacterias son móviles debido a los flagelos. Los flagelos aparecen en los bacilos. Estas bacterias móviles pueden contener un único flagelo o varios flagelos y su ubicación varía según las especies bacterianas y las condiciones de cultivo. En ocasiones, las bacterias motiles producen variantes inmóviles que parecen estables y en raras oportunidades o condiciones como la temperatura revierten a las formas móviles. Los microorganismos inmóviles carecen de flagelos (esto principalmente para las bacterias en forma de cocos).

La movilidad, es decir, el movimiento de traslación de un punto a otro en forma rápida y de zigzag permite a las bacterias responder a estímulos: químicos, cuando las bacterias son atraídas a determinados compuestos como la glucosa, la galactosa o por el contrario son repelidas de algunos compuestos como los antibióticos, luminosas en las bacterias fotosintéticas.

La movilidad debe distinguirse del movimiento pasivo de las bacterias en una sola dirección como consecuencia de las corrientes en la preparación, o del movimiento Browniano que es la constante vibración de las bacterias en un punto fijo comportamiento que se presenta por estar suspendidas en medio líquido y por su pequeño tamaño (Piña López, 2011).

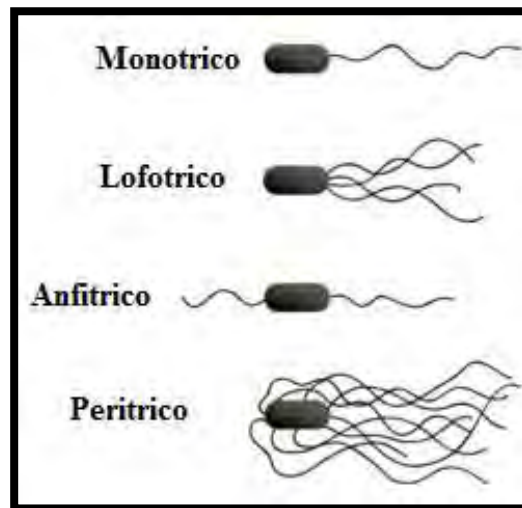


Fig. 24. Las diferentes disposiciones de los flagelos bacterianos:



Técnica:

Gota suspendida

1. En un cubreobjetos colocar 4 bolitas de plastilina distribuidas de forma que queden en cada esquina.
2. Colocar una gota de agua o SSF estéril.
3. Con el asa tomar un inóculo de bacteria y colocarla sobre la gota de agua o SSF estéril. Homogenizar pero no extender la gota; de modo que la gota quede en pendiente o suspendida.
4. Observar al microscopio a 40x. tener cuidado al enfocar para no romper el cubreobjetos. Es incorrecto realizarlo a 100x pero si hay problemas para la observación se puede realizar.

Interpretación

Motilidad (+): desplazamiento de la célula bacteriana en zigzag hacia una sola dirección.

Motilidad (-): no hay desplazamiento o se observa movimiento browniano.

Si la prueba se llevo a cabo en ciertas condiciones de temperatura reportar: motilidad a 37°C o 25°C según sea la temperatura.



Foto 76. Preparación de la técnica de motilidad por gota suspendida.

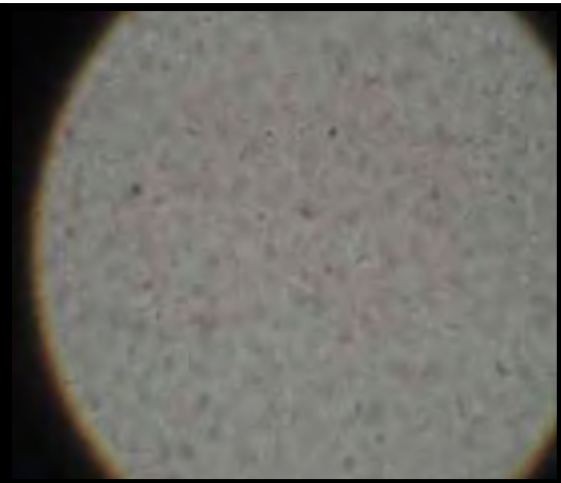


Foto 77. Motilidad positiva (100x)
Ver video en disco.



Prueba de Oxidación-Fermentación

Esta prueba tiene como principio determinar el proceso metabólico oxidativo o fermentativo, por el cual una bacteria utiliza un hidrato de carbono. Algunas bacterias pueden metabolizar un hidrato de carbono solo en condiciones aerobia (en presencia de oxígeno atmosférico) o anaerobias (en ausencia de oxígeno atmosférico) mientras que otras lo realizan de ambos modos. Las bacterias que pueden crecer, realizan su metabolismo y reproducen en condiciones aerobias y anaerobias se denominan Fermentadoras Facultativas (OF).

La principal diferencia entre el metabolismo fermentativo y el metabolismo oxidativo de un hidrato de carbono es el requerimiento de oxígeno atmosférico y la fosforilación inicial. La fermentación es un proceso anaerobio que requiere la fosforilación inicial de la glucosa antes de la degradación a una mezcla de ácidos relativamente fuertes; mientras que la oxidación es un proceso aerobio estricto que involucra la oxidación directamente de una molécula no fosforada de glucosa dando una mezcla de ácidos mas débiles que los de la fermentación.

En esta prueba también se puede determinar motilidad y producción de gas (CO_2 e H_2), ya que el estado semisólido del medio de cultivo de esta prueba permite el desplazamiento de la bacteria y por su metabolismo podemos diferenciar se puede observar la aparición de burbujas de los gases antes mencionados.

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Agar	2.0
Azul de bromotimol	0.08
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	0.3
Triptosa	2.0
Glucosa	10
pH	6.8 ± 0.2

Técnica:

1. Se inocula un par de tubos con medio basal OF de Hugh y Leifson por cada microorganismo a probar.
2. Se marca un tubo como “abierto” y el otro como “cerrado”.
3. Tomar un inóculo liviano de un cultivo de 18 a 24hrs. puro, con el asa recta.
4. Sembrar ambos tubos por picadura hasta el fondo de este.
5. Al tubo marcado como “cerrado” agregar 1-2ml de aceite mineral estéril para excluir el oxígeno.
6. Incubar a 37°C durante 18 - 24hrs.
7. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación.



Interpretación:

De acuerdo al cambio de color del indicador de pH Azul de bromotimol.

Proceso metabólico	Tubo abierto	Tubo cerrado
Oxidativo (O)	Color amarillo	Color verde
Fermentativo (F)	Color verde	Color amarillo
Fermentador facultativo (F_f , F_{af} u OF)	Color amarillo	Color amarillo
No fermentador	Color verde	Color verde

Con gas (G): si hay una separación del medio del fondo o el medio se ve roto.

En este medio también se puede determinar la motilidad, si la turbidez del crecimiento se observa únicamente en la línea de inoculación, se trata de una cepa inmóvil y si está presente en todo el medio es una cepa móvil.

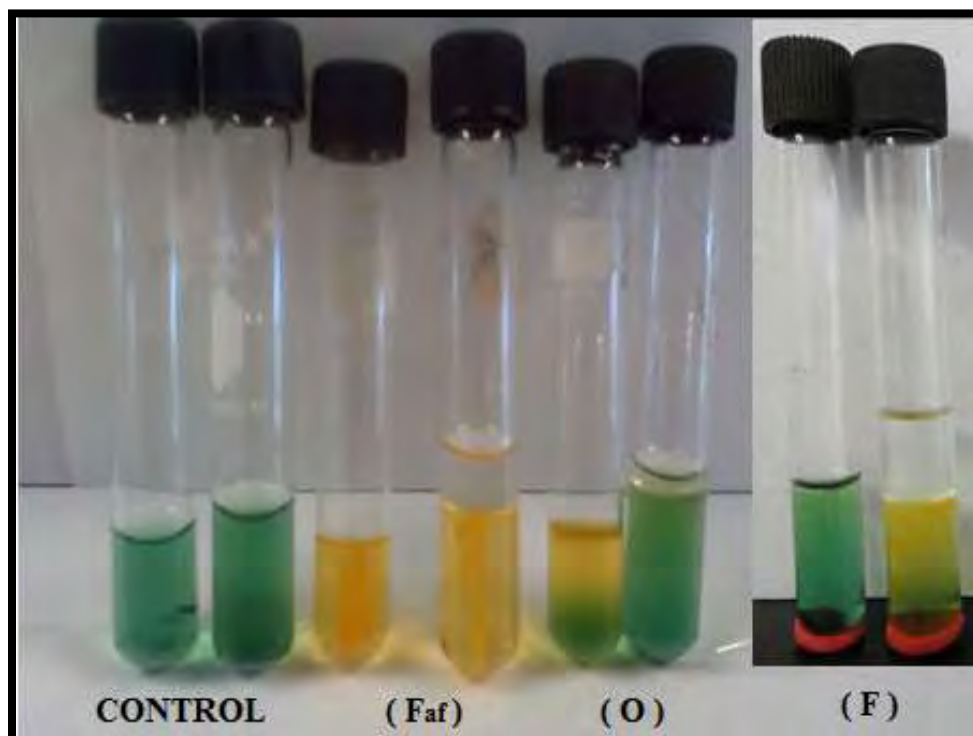


Foto. 78. Prueba de Oxidación - Fermentación



TEMA 8

PRUEBAS BIOQUÍMICAS SECUNDARIAS

Los microorganismos tienen la capacidad de crecer utilizando varias fuentes de energía, algunos lo hacen utilizando la luz y otros sustratos orgánicos u inorgánicos como carbohidratos, aminoácidos, lípidos e incluso hidrocarburos; en otras palabras requieren de una fuente de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y algunos oligoelementos que funcionan como coenzimas.

Sin embargo, solo algunos de esos sustratos pueden difundir a través de la membrana celular con facilidad e ingresar a alguna de las vías catabólicas ya conocidas, muchas bacterias liberan al medio enzimas necesarias para la hidrólisis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; convirtiendo estos polímeros en pequeñas moléculas.

Además de la difusión facilitada; otros sustratos requieren la translocación de grupo para su ingreso a la célula bacteriana una vez realizado este importante paso la obtención de energía dependerá básicamente de enzimas especializadas.

Desde el punto de vista de la bioquímica, los procesos metabólicos dependen de la oxidación de un compuesto orgánico (en el caso de los microorganismos quimiorganotrofos) obteniéndose así compuestos altamente reducidos, dichos compuestos son usados en las lanzadoras de protones durante la respiración aerobia de los microorganismos. De esta manera es posible obtener una gran cantidad de ATP y agua o peróxido de hidrógeno; el cual puede regenerarse a agua y oxígeno mediante catalasas presentes.

Cuando los microorganismos se desarrollan en condiciones anaerobias donde no hay oxígeno disponible no hay síntesis de ATP; la única forma de regenerar el ATP y transferir los potenciales reductores producidos durante las fases primarias del metabolismo (glucólisis y ciclo de Krebs) es en dos procesos: Reparación anaerobia y Fermentación. En caso de la respiración anaerobia se utilizan compuestos inorgánicos como aceptores de electrones y en la fermentación los mismos componentes orgánicos funcionan como donadores y aceptores de electrones.

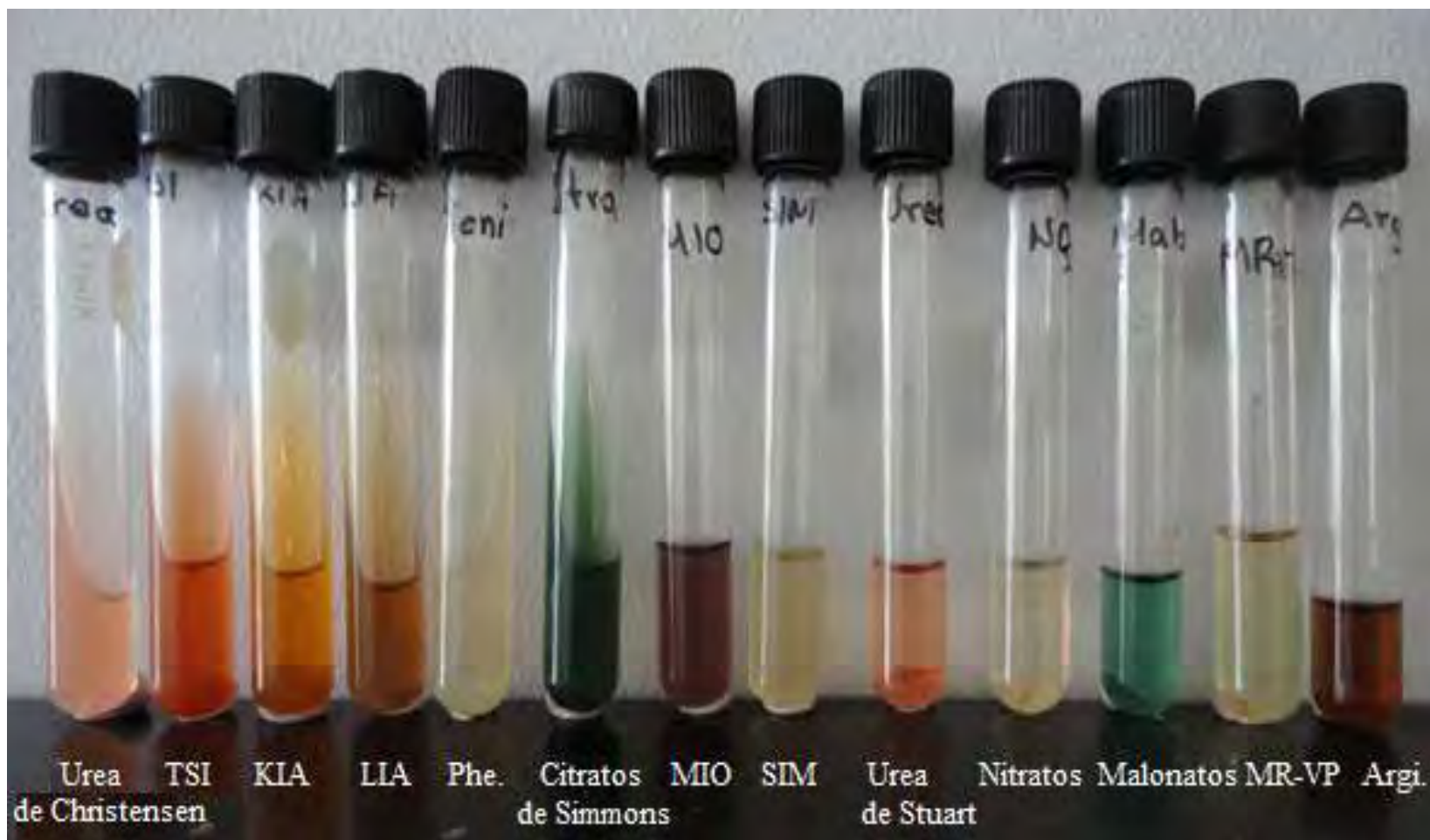


Foto. 79. Pruebas Bioquímicas Secundarias.





Prueba de Citratos de Simmons

Fundamento:

La energía puede ser proporcionada a algunas bacterias en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico por la utilización del citrato como única fuente de carbono. El metabolismo del citrato involucra una condensación de acetilo con coenzima A y oxalacetato para ingresar en el ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato puede ser por la vía del ácido tricarboxílico o por la fermentación del citrato. Estas bacterias pueden contar con un mecanismo de transporte o permeasa que permiten que el citrato penetre al interior de la célula. El desdoblamiento del citrato involucra un sistema enzimático sin la participación de la coenzima A, la citratasa (citrato oxalacetatoliasa) o la citrato desmolasa. La citratasa requiere un catión divalente para su actividad, magnesio o manganeso. El oxalacetato y el acetato son intermediarios en el metabolismo del citrato.

El medio para la fermentación del citrato también contiene sales de amonio. Un microorganismo que puede utilizar el citrato como su única fuente de carbono también utiliza las sales de amonio como su única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio son degradadas a amoníaco (NH_3), lo cual aumenta la alcalinidad del medio y a la conversión de NH_3^{2+} a hidróxido de amonio (NH_4OH).

Sin tener en cuenta los productos finales producidos, el primer paso metabólico en la fermentación del citrato produce piruvato. La degradación del piruvato depende entonces del pH del medio.

pH alcalino: productos finales acetato y formato.

pH ácido: productos finales acetilmetilcarbinol (acetoína) y lactato

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Agar	15.0	Citrato de sodio	2.0
Fosfato dihidrogenado de amonio	1.0	Cloruro de sodio	5.0
Azul de bromotímol	0.08	Sulfato de magnesio	0.2
Fosfato dipotásico	1.0	pH	6.9 ± 0.2



Técnica:

1. Se inocula un medio de citrato de Simmons estéril en forma inclinada (pico de flauta) de consistencia solida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inculo liviano de un cultivo de 24hrs. puro, con el asa redonda.
3. Sembrar el tubo por estría única en la superficie del pico de flauta.
4. Incubar a 37°C durante 24hrs.
5. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación.

Interpretación:

Citrato (+): crecimiento y el medio de color azul intenso en pico de flauta.

Citrato (-): no se observa crecimiento y medio de color verde.

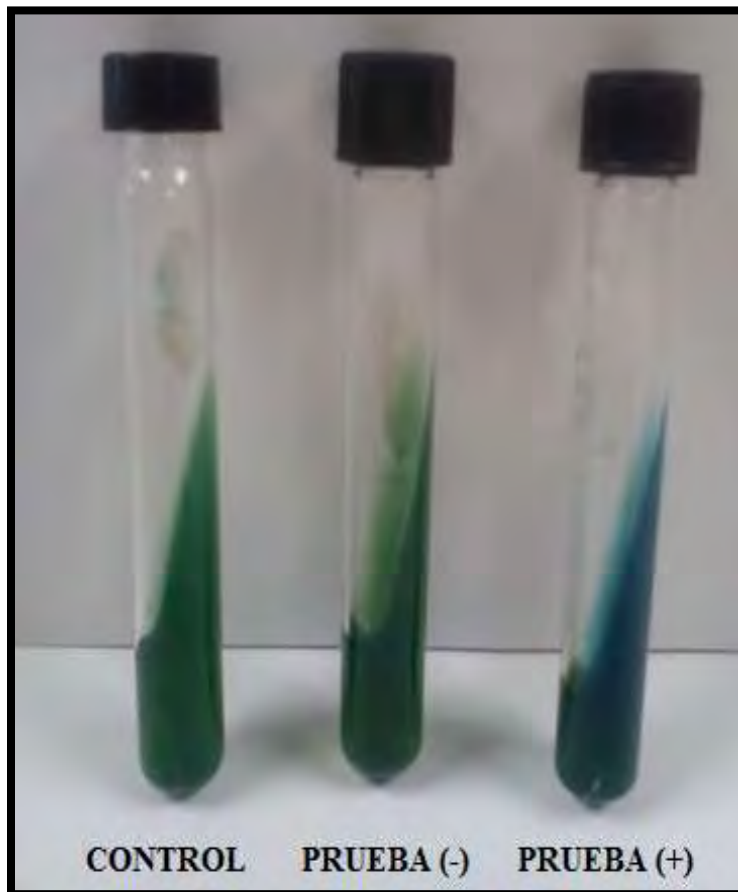


Foto 80. Prueba de Citratos de Simmons



Prueba de Malonatos de Ewing modificado

Fundamento:

El malonato (ácido malónico) es un inhibidor enzimático, que interfiere con la oxidación del ácido succínico a ácido fumárico mediante la inhibición del enzima succínico deshidrogenasa. El ácido malónico inactiva la enzima por un proceso denominado inhibición competitiva. La succínico deshidrogenasa transfiere hidrogeno a un aceptor apropiado en la conversión de ácido succínico a ácido fumárico, pero esta reacción puede ser inhibida por una compuesto similar desde el punto de vista estructural al sustrato natural. El ácido malónico presenta una estructura similar al ácido succínico y compite por los sitios en la enzima; uniéndose provocando que la enzima no pueda combinarse con su sustrato normal, el ácido succínico, y se bloquea la oxidación de este ácido.

En consecuencia, a la acumulación de ácido succínico a causa de la inhibición de la enzima interrumpe el ciclo de Krebs y el ciclo del ácido glioxílico, lo que detiene la posterior producción de intermediarios requeridos para la biosíntesis de los nuevos componentes del metabolismo, provocando que el microorganismo no pueda crecer y reproducirse; o al menos que pueda utilizar el malonato de sodio como una fuente de carbono. Si esta reacción es esencial para la actividad metabólica de una bacteria, entonces el inhibidor malonato exhibe actividad antibacteriana.

Tanto la glucosa como el malonato sirven como fuente de carbono, sin embargo, la alcalinización espontánea causada por el crecimiento bacteriano es amortiguada por la fermentación de la glucosa y por los fosfatos incorporados al medio. Si un microorganismo utiliza malonato de sodio como su fuente de carbono en el mismo momento utiliza el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, la alcalinidad aumenta debido a la formación de hidróxido de sodio y bicarbonato de sodio.

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Azul de bromotimol	0.025	Fofatodipotásico	0.6
Cloruro de sodio	2.0	Fosfato monopotásico	0.4
Dextrosa	0.25	Malonato de sodio	3.0
Extracto de levadura	1.0	Sulfato de amonio	2.0
		pH	6.7 ± 0.2



Técnica:

1. Se inocula un medio de Malonato de Ewing de consistencia líquida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inóculo liviano de un cultivo de 18 a 24hrs. puro, con el asa redonda.
3. Sembrar el tubo por agitación.
4. Incubar a 37°C durante 24hrs.
5. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación.

Interpretación:

Malotano (+): color azul pálido a color azul Prusia oscuro en todo el medio. (Reacción alcalina)

Malonato (-): sin cambio de color (verde).

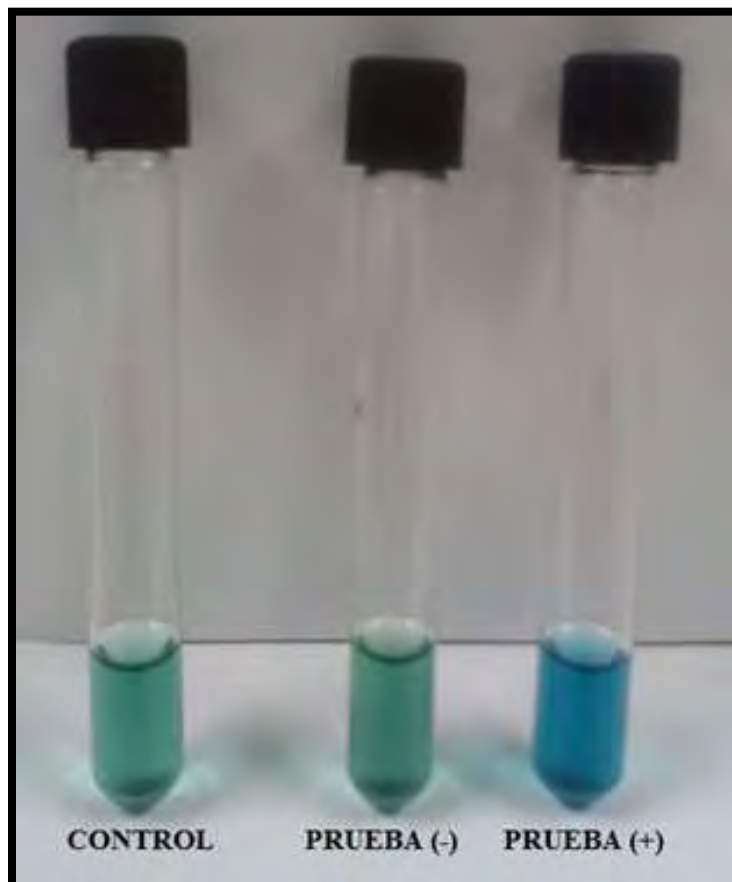


Foto 81. Prueba de Malonatos de Ewing modificado



Prueba de Urea

Fundamento:

La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de compuestos orgánicos, las enzimas bacterianas se clasifican como constitutivas o adaptativas (se produce solo cuando su sustrato específico está presente). La enzima ureasa es una enzima considerada constitutiva, es decir, se sintetiza sin tomar en consideración la presencia o la ausencia de su sustrato, la urea. La ureasa también se clasifica como una amidasa, ya que cataliza la hidrólisis de las aminas (rompe puentes de nitrógeno y el carbono por hidrólisis).

La urea es hidrolizada por la enzima ureasa, en 2 moléculas de amonio y dióxido de carbono. Este último proporciona reacción alcalina al medio.

Caldo urea (Urea de Stuart): Debido a la composición del medio de cultivo, se detecta la hidrólisis de la urea por las bacterias con actividad rápida. Debido a la presencia de pocos nutrientes los microorganismos por su actividad rápida utiliza el extracto de levadura como fuente de nitrógeno y carbono.

Agar urea de Christensen: Debido a la composición del medio de cultivo, se detecta la hidrólisis de la urea por las bacterias con actividad leve y tardía. Debido a la presencia de glucosa y peptona favorece el crecimiento de bacterias exigentes.

Ingredientes del medio:

Caldo urea (urea de Stuart)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de levadura	0.10	Fosfato disódico	9.50
Rojo de fenol	0.01	Urea	20.0
Fosfato monopotásico	9.10	pH	6.8 ± 0.2

Agar urea de Christensen

Formula en gramos por litro de agua destilada

Cloruro de sodio	5.0	Peptona de gelatina	1.0
Dextrosa	1.0	Rojo de fenol	0.012
Fosfato monopotásico	2.0	Urea	20.0
		pH	6.8 ± 0.2

Técnica:

Caldo urea de Stuart

1. Se inocula un medio de Caldo urea de Stuart de consistencia líquida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inóculo liviano de un cultivo de 24hrs. puro, con el asa redonda.



3. Sembrar el tubo por difusión.
4. Incubar a 37°C durante 18 a 24hrs.
5. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación.

Agar urea de Christensen

1. Se inocula un medio de urea de Christensen en forma inclinada (pico de flauta) de consistencia solida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inculo liviano de un cultivo de 24hrs. puro, con el asa redonda.
3. Sembrar el tubo por estría única en la superficie del pico de flauta.
4. Incubar a 37°C durante 24hrs.
5. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación.

Interpretación:

Caldo urea (urea de Stuart)

- Urea (+): color rosa mexicano intenso en todo el caldo
- Urea (-): sin cambio de color (amarillo-naranja)

Agar urea de Christensen

- Urea (+): color rosa mexicano intenso en el pico de flauta. El color puede penetrar en el interior del agar; la extensión del color indica la velocidad de la hidrolisis de la urea.
- Urea (-): sin cambio de color (color canela a amarillo pálido).



CONTROL PRUEBA (-) PRUEBAS (+)

Foto 82. Caldo urea de Stuart



CONTROL PRUEBA (-) PRUEBAS (+)

Foto 83. Agar urea de Christensen



Prueba de SIM (Sulfhídrico, Indol, Motilidad)

Fundamento:

Prueba de indol:

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principalmente: indol, escatol (metilindol) e indolacético. Diversas enzimas intercelulares que intervienen en este proceso reciben el nombre de “triptofanasa”. El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico, del cual puede formarse indol por desaminación, y escatol por descarboxilación del ácido indolacético.

La degradación del triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. El ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por el medio del ciclo glucolítico, o entrar en el ciclo de Krebs para liberar CO_2 , H_2O y una gran producción de energía. El NH_3 puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos empleando la energía que se encuentra para la reacción anabólica.

Prueba de ácido sulfhídrico:

La proteólisis de las proteínas de aminoácidos individuales; algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que lo contienen, produciendo el gas ácido sulfhídrico (H_2S). La peptona, la cisteína y el tiosulfato, todos son fuentes de azufre, pero diferentes especies utilizan distintos compuestos o aminoácidos que contienen azufre para producir H_2S . La enzima responsable de esta actividad es la cisteinasa.

Primera etapa:

La bacteria producirá las enzimas que reacciona con el tiosulfato por medio de una reacción de reducción que produce sulfito y un sulfato. Este es un proceso de respiración anaerobia donde el átomo de azufre sirve como aceptor de electrones para la oxidación de los sustratos orgánicos. El tiosulfato reemplaza al sulfato como aceptor de electrones y es una fuente de azufre para el microorganismo. El H_2S es un gas incoloro, y por lo tanto hace falta un segundo indicador para detectar visiblemente su producción.

Segunda etapa

El gas incoloro H_2S reacciona con las sales de hierro presentes en el medio, produciendo una reacción que se manifiesta con un precipitado negro insoluble en el medio, sulfuro ferroso.



Prueba de Motilidad

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran entre los bacilos; sin embargo las formas de cocos son inmóviles.

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con su especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con movilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles. Los organismos no móviles carecen de flagelos.

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Agar	3.5	Tiosulfato de sodio	2.0
Peptona de carne	6.1	Sulfato de hierro y amonio	0.2
Peptona de caseína	20.0	pH	7.3 ± 0.2

Técnica:

1. Se inocula un medio SIM en forma vertical de consistencia semisólido por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inóculo liviano de un cultivo de 24hrs. puro, con el asa recta.
3. Sembrar el tubo por picadura hasta el fondo de este.
4. Incubar a 37°C durante 24hrs.
5. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación en el siguiente orden:
 - a. Prueba de motilidad
 - b. Prueba de ácido sulfhídrico
 - c. Prueba de indol
6. Para la prueba de indol se deben de agregar 3 gotas de reactivo de Ehrlich o reactivo de Kovac's (Ver Anexo 6). Interpretar.

Interpretación

Prueba de motilidad

Motilidad (+): los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbidez. Otro fenómeno puede ser la formación de una sombrilla en la superficie del agar al inicio de la línea de siembra a causa de un movimiento rotatorio de un extremo a otro.

Motilidad (-): Crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra.

Prueba de ácido sulfhídrico

H₂S (+): precipitado negro en el medio.

H₂S (-): no hay precipitado negro en el medio.



Prueba de Indol

Indol (+): Anillo rojo en la superficie del medio (formación de una quinona).

Indol (-): No se produce color. O aparición de un color naranja indica desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser el precursor de la formación de indol.



Foto 84. SIM: Prueba de indol y motilidad.

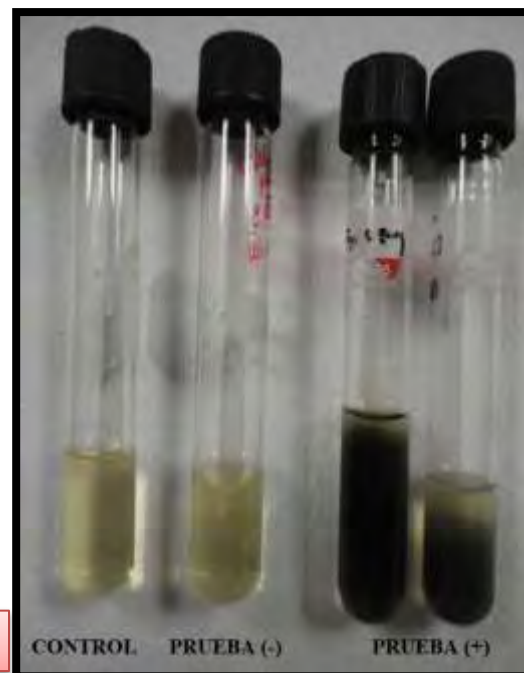


Foto 85. SIM: Prueba de H₂S.



Prueba de MR-VP (Rojo de Metilo – Voges Proskauer)

Fundamento:

Prueba de Rojo de metilo

Las bacterias que siguen la vía de fermentación de ácidos mixtos fermentan azúcares a través del piruvato hasta ácido láctico, acético, succínico y fórmico. Además, producen CO₂, H₂ y etanol. Las bacterias producen suficientes cantidades de estos ácidos estables para mantener un pH menor a 4.4 y vencer el sistema amortiguador de fosfato; manteniendo una alta concentración de iones de hidrogeno hasta alcanzar cierta concentración y entonces cesa toda actividad.

Prueba de Voges-Proskauer

La glucosa es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en el glicolisis. A partir del ácido pirúvico una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína (precursor de la producción de 2,3-butanediol) es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias. La formación de acetoína y butilenglicol es una vía alterna del metabolismo del ácido pirúvico. Por lo que estos microorganismos metabolizan los productos iniciales de la fermentación por descarboxilación, produciendo acetilmetilcarbinol (acetoína) neutro, lo que da un elevado pH terminal que disminuye la acidez del medio, elevando el pH hacia la neutralidad (pH 6 o más).

Las bacterias que utilizan esta vía solo producen pequeñas cantidades de ácidos mixtos que son insuficientes para disminuir el pH del medio, lo bastante como para no ser detectado por el indicador Rojo de Metilo y producir un cambio de color.

Para hacer evidente la utilización de la glucosa por esta vía. Se agrega como primer reactivo a una alícuota alfa-naftol por que este actúa como intensificador del color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción sin pérdida de su especificidad. El segundo reactivo es el hidróxido de potasio (KOH) al 40% que cuando se agrega al medio contribuye a la absorción de CO₂.

No debe excederse de un volumen exacto. El KOH reaccionara con la peptona dando un color rosado salmón. Si se agrega KOH con el agregado posterior del alfa-naftol no habrá alteración del color.

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Dextrosa	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
Peptona especial	7.0
pH	6.9 ± 0.2



Técnica:

1. Se inocula un medio MR-VP de consistencia líquida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inóculo pesado de un cultivo de 18 a 24hrs. puro, con el asa redonda.
3. Sembrar el tubo por difusión.
4. Incubar a 37°C durante 24hrs.
5. Terminadas las 24hrs, tomar una alícuota de 1.5ml aproximadamente del medio incubado en un tubo limpio.
6. Agregar 2 gotas del indicador rojo de metilo. Agitar suavemente. Realizar la lectura e interpretación para la prueba MR.
7. El tubo del medio MR-VP sobrante incubar otras 24hrs.
8. Agregar los siguientes reactivos según el orden de aparición:
 - a. 0.6ml de α -naftol al 5% en alcohol etílico absoluto.
 - b. 0.2ml de KOH al 40%.
9. Agitar el tubo suavemente. Dejar reposar 10 min. y realizar la interpretación para la prueba de VP.

Interpretación:

Prueba de Rojo de metilo

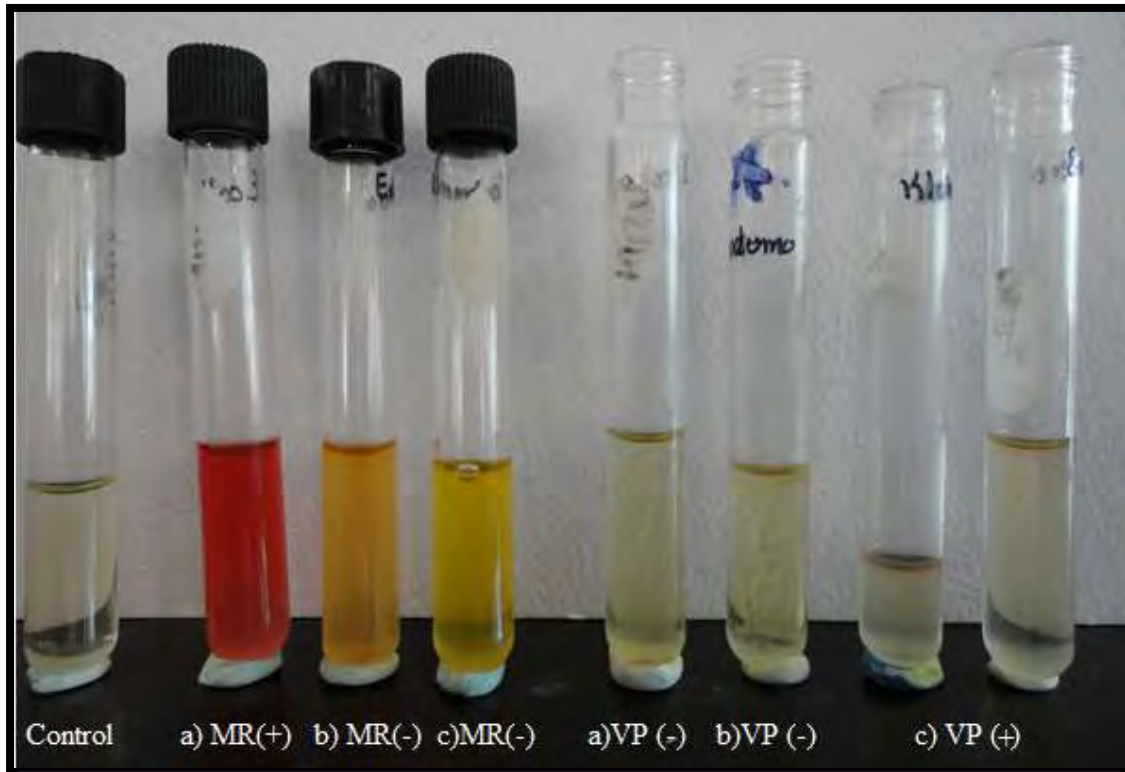
MR (+): al incorporarse el indicador de pH al medio este vira de un anaranjado a un color rojo (pH de 4.4).

MR (-): al incorporarse el indicador de pH al medio este vira de un anaranjado a un color amarillo (pH 6.6) ó naranja

Prueba de Voges Proskauer

VP (+): un anillo de color rojo en la superficie del medio (presencia de acetoína).

VP (-): un anillo de color amarillo. Puede formarse un color cobrizo pero aun así la reacción es negativa.



Control a) MR(+) b) MR(-) c)MR(-) a)VP (-) b)VP (-) c) VP (+)

Foto 86. Prueba de Rojo de Metilo y Voges Proskauer

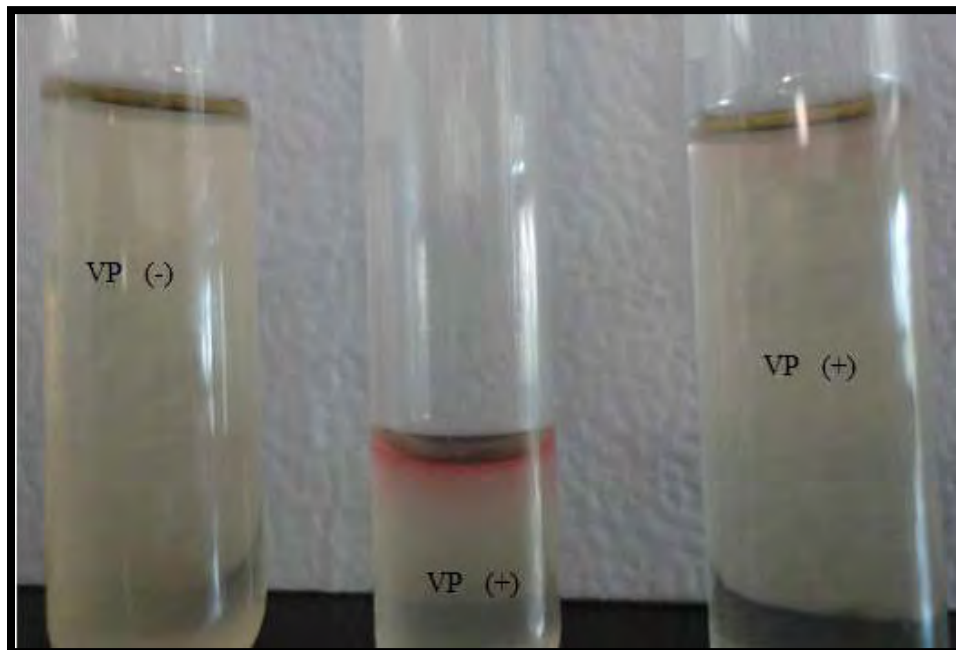


Foto 87. Prueba de Voges Proskauer



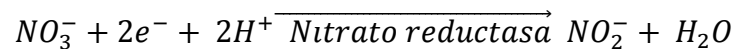
Prueba de Nitratos (NO₃)

Fundamento:

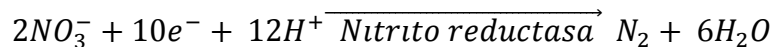
Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno gaseoso.

La reducción de nitrato en nitrito y nitrógeno gaseoso tiene lugar generalmente en condiciones de anaerobiosis, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como aceptor de hidrógeno. Esta respiración anaerobia es un proceso de oxidación en el que las sustancias inorgánicas (nitrato) producen oxígeno para actuar como aceptor de electrones a fin de proporcionar energía. En la reducción de nitratos, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculas aceptaras específicas o actúa como ultimo oxidante en los sistemas de citocromo.

Reducción de nitrato a nitritos



Reducción de nitrato a nitrógeno molecular



La reducción de nitratos en nitrito esta indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico, p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina.

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Peptona	5.0
Extracto de carne	3.0
El nitrato de potasio 1%	1.0
pH	7.0 ± 0.2



Técnica:

1. Se inocula un medio de nitratos de consistencia líquida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inóculo pesado de un cultivo de 24hrs. puro, con el asa redonda.
3. Sembrar el tubo por difusión.
4. Incubar a 37°C durante 24hrs.

Fase 1

5. Terminadas las 24hrs. Agregar 2 gotas alfa- naftilamina 0.5% y 2 gotas de ácido sulfanílico 0.8%. Agitar suavemente. Realizar la lectura e interpretación para reducción de nitrato a nitritos.

Fase 2

6. Si no presento coloración el tubo agregar una pequeña cantidad de polvo de Zinc. Agitar suavemente. Realizar la lectura e interpretación para reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso.

Interpretación:

Fase 1

$NO_3(+)$ hasta NO_2 : Coloración roja intensa del medio.

$NO_3(-)$ hasta NO_2 : No hay un cambio de color del medio permanece amarillo. Pasar a Fase 2.

Fase 2

$NO_3(+)$ hasta N_2 : No hay un cambio de color del medio permanece amarillo. Después de agregar polvo de Zinc.

$NO_3(-)$: Coloración roja intensa del medio. El Zinc es un agente reductor por lo que es el que reduce los nitratos a nitritos y no la bacteria.

Existe una variante a la cual se coloca al caldo de nitratos una campana de Durham para hacer evidente la reducción de los nitratos hasta nitrógeno gaseoso. La prueba se considera positiva con la aparición de una burbuja de este gas en la superficie de la campana.



Control

NO₂

N₂

N₂

N₂

NO₃ (-)

Foto 88. Prueba de Nitratos



Foto 89.
Prueba de Nitratos con
campana de Durham.
Reducción de NO₃ hasta
↑N₂

Prueba (+)



Prueba de KIA (Agar con Hierro de Kligler) y Prueba de TSI (Agar con Azúcar triple y Hierro)

Fundamento

El Agar con Hierro de Kligler y Agar con Azúcar Triple y Hierro son medios de cultivo diferenciales en tubo que tienen como propósitos:

- La determinación de fermentaciones de hidratos de carbono.
- La determinación de la producción de H₂S y Gas (CO₂+ H₂).

El Agar con Hierro de Kligler en sus ingredientes tiene dos hidratos de carbono: 0.1% de glucosa y 1% de lactosa. El Agar con Azúcar Triple y Hierro en sus ingredientes contiene un hidrato de carbono extra: 0.1% de glucosa, 1 % de lactosa y 1% de sacarosa. La bioquímica es básicamente igual que la del KIA; por eso se discute en detalle KIA.

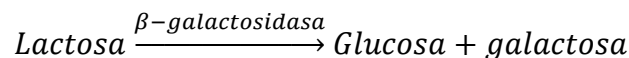
En el Agar con Hierro de Kligler, algunos microorganismos pueden fermentar ambos hidratos de carbono, otros fermentan solo la glucosa; incluso otros no pueden fermentar ni la glucosa ni la lactosa. Esta fermentación puede ocurrir con la producción de gas o sin ella (CO₂ + H₂).

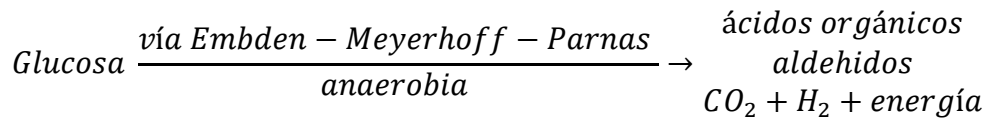
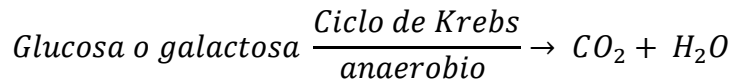
A los fines de identificación, todos los tubos de KIA y TSI deben interpretarse en lo que respecta a la fermentación de los hidratos de carbono después de 18-24hrs. de incubación.

La fermentación se lleva a cabo tanto en aerobiosis (en el pico de flauta) como en anaerobiosis (en el fondo). En el pico de flauta, el monosacárido glucosa es catabolizado inicialmente por la vía metabólica anaerobia de Embden-Meyerhof-Parnas, para producir el intermediario clásico ácido pirúvico. El ácido pirúvico es degradado luego a través del ciclo de Krebs para rendir CO₂, H₂O y energía. En el fondo existen condiciones anaerobias, de forma que la glucosa se metaboliza por la vía Embden-Meyerhof-Parnas a ATP y ácido pirúvico, que luego se convierte en los diversos productos finales estables: ácido láctico y/u otros ácidos orgánicos, aldehídos, alcoholes, CO₂, H₂ y energía.

La lactosa es un disacárido compuesto por dos unidades de monosacáridos: glucosa y galactosa. Su concentración es 10 veces más que la glucosa; si el microorganismo es capaz de metabolizar la lactosa se mantendrá en el medio un pH ácido. Pero si la bacteria no es capaz de metabolizar la lactosa y por el agotamiento de la glucosa, la bacteria consumirá las peptonas.

Ambas vías metabólicas, involucran pasos secuenciales, que están mediados por enzimas específicas.



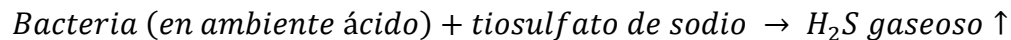


Como el hidrato de carbono (monosacárido) más sencillo de degradar es la glucosa, la bacteria comenzará a metabolizarla por la vía antes mencionada; dando como productos finales ácidos. El ácido en el medio hace virar el indicador de pH rojo de fenol, a amarillo todo el tubo. Después de haber agotado la cantidad limitada de glucosa (0.1%) una bacteria con capacidad para utilizar la lactosa y/o sacarosa, comenzará a degradarlas. Como el medio contiene 10 veces más de lactosa y/o sacarosa que glucosa, las bacterias encontrarán sustrato suficiente para continuar la formación de productos finales ácidos; por lo que luego de 24hrs. de incubación todo el medio permanecerá de color amarillo. Esta reacción se denomina ácido sobre ácido (Ac/Ac). Durante la fermentación de los hidratos de carbono se producen CO_2 , H_2 , gases que se evidenciarán con la ruptura de la columna de agar o su desplazamiento hacia la parte superior, así como la formación de burbujas. De modo que un fermentador de lactosa que produce gas dará una reacción Ac/Ac más gas.

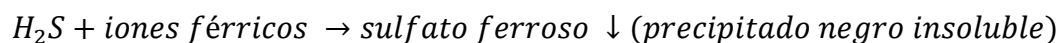
Si el microorganismo no es capaz de usar la lactosa del medio, debe producir energía en forma menos eficiente al utilizar las proteínas y aminoácidos (peptonas) del medio como fuentes nutritivas. El metabolismo proteico se produce en donde las cantidades de oxígeno son abundantes (en el pico de flauta). El catabolismo de las peptonas libera amoníaco (NH_3) que alcaliniza el pH del medio provocando el vire del indicador de rojo de fenol a un color rojo más intenso. Por lo que podremos observar una reacción alcalino sobre ácido (Alk/Ac).

Las bacterias que no fermentan la glucosa pueden formar productos alcalinos a partir de la utilización de la peptona, esto principalmente en la zona inclinada que puede llegar a difundir en todo el medio. Por lo que podremos observar una reacción alcalina sobre alcalina o sin cambio. (Alk/Alk o Alk/S/c).

El medio también contiene otros ingredientes como son citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio, que son los indicadores que ayudarán hacer evidente la producción del gas H_2S . Para que esto se lleve a cabo el ambiente o medio debe de ser ácido, por lo que se llevará a cabo solo bajo concentraciones altas de productos metabólicos ácidos.



El H_2S es un gas incoloro; por ello, es necesario un segundo indicador para visualizar la producción:





Ingredientes del medio:

Agar con Hierro de Kligler

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Agar	15.0	Lactosa	10.0
Citrato férrico de amonio	0.5	Peptona especial	20.0
Cloruro de sodio	5.0	Rojo de fenol	0.025
Dextrosa	1.0	Tiosulfato de sodio	0.5
		pH	7.4 ± 0.2

Agar con Azúcar Triple y Hierro.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Agar	13.0	Lactosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0	Peptona especial	20.0
Sacarosa	10.0	Rojo de fenol	0.025
Dextrosa	1.0	Tiosulfato de sodio	0.2
Sulfato de hierro y amonio	0.2	pH	7.3 ± 0.2

Técnica

1. Se inocula un medio de KIA o TSI estéril en forma inclinada (pico de flauta) de consistencia sólida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inóculo liviano de un cultivo de 18 a 24hrs. puro, con el asa recta.
3. Sembrar el tubo por picadura en el fondo y por estría el pico de flauta.
4. Incubar a 37°C durante 24hrs.
5. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación en el siguiente orden:
 - A) pH del pico de flauta
 - B) pH del fondo
 - C) Producción de gas (CO₂+H₂)
 - D) Producción de H₂S

Interpretación

Vire del indicador de pH rojo de fenol:

pH Alcalino (Alk., Alc. o Al): color rojo pH Ácido (Ac., Acd. o A): color amarillo

Se coloca primero el pH del pico, una diagonal (/) y después el pH del fondo:

Alk/Ac: Solo fermenta la glucosa

Ac/Ac: Fermenta tanto la glucosa y la lactosa (KIA). Fermenta glucosa y lactosa y/o sacarosa (TSI)

Alk/S/c: Utiliza solamente las peptonas, no es una bacteria fermentadora de hidratos de carbono.



Para fines prácticos se reporta después la presencia o ausencia de gas ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$):

Gas (+): ruptura de la columna de agar o su desplazamiento hacia la parte superior, así como la formación de burbujas.

Gas (-): sin las modificaciones del medio antes mencionadas.

Y para la producción de H_2S se reporta de la siguiente manera:

H_2S (+): presencia de un precipitado de color negro

H_2S (-): ausencia de un precipitado de color negro

Formas de Reportar los resultados (+) de gas (CO_2 , H_2 u O_2) y H_2S :

Ac/Ac/gas/ H_2S

Ac/Ac/gas/

Ac/Ac/ H_2S

Alc/Ác/ H_2S

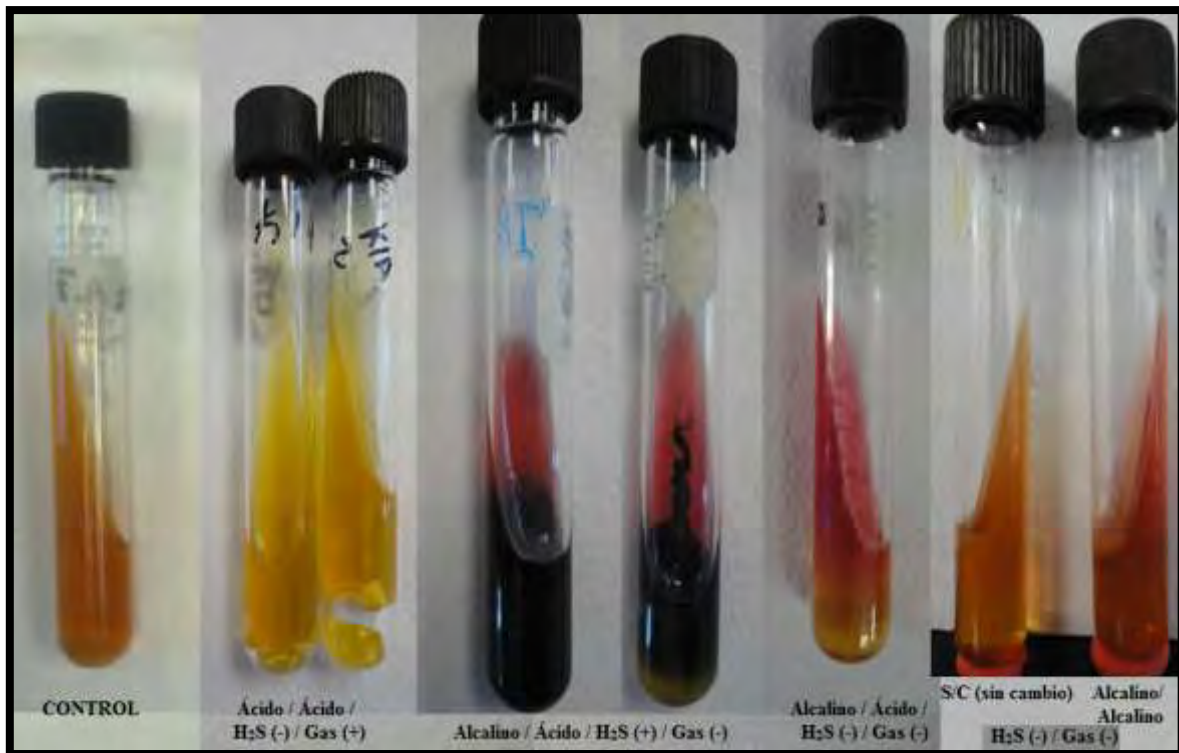


Foto 90. Prueba de KIA y algunos de sus probables resultados.



Descarboxilación de aminoácidos

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas atacan los aminoácidos en su carboxilo terminal para formar una amina o una diamina y dióxido de carbono. Estas descarboxilasas son enzimas adaptativas o inducidas. Solo se forman cuando un microorganismo es cultivado en un ambiente ácido en presencia de un sustrato específico, y los productos de descarboxilación cambian el pH a límites alcalinos. La descarboxilación es irreversible, no oxidativo y por lo que generalmente requiere una coenzima común, fosfato de piridoxal, que refuerza mas la actividad de descarboxilasa.

Los tres aminoácidos de importancia para la identificación bacteriana son lisina, ornitina y arginina.

Prueba de MIO (Motilidad Indol Ornitina)

Fundamento:

Si la bacteria tiene la capacidad de producir la enzima ornitina descaboxilasa, atacara el aminoácido L-ornitina, el cual al ser descarboxilado formara dióxido de carbono y la diaminaputrescina; la cual es estable en condiciones anaerobias. Debido a que el pH puede controlarse se agrega un indicador, el Purpura de bromocresol. Como se menciona anteriormente para que se lleve acabo la descarboxilación primero debe de haber una acidificación del medio, esto se realiza primeramente con la metabolización de la glucosa dando productos ácidos que acidifican el medio y provocando el vire del purpura de bromocresol a amarillo. Después llevándose acabo la descarboxilación del aminoácido dando la producción putrescina, la cual alcaliniza el medio y provoca el vire del indicador nuevamente a un color violeta o purpura.

La prueba de motilidad se pone de manifiesto por turbidez difusa alrededor de la línea de inoculación o por la observa de turbidez en todo el medio (ver fundamento que en la prueba de SIM).

A esta prueba se agrega aceite mineral o vaselina para generar una atmósfera libre de oxigeno (anaerobia).

El triptofano por acción de la triptofanasa forma indol y otros compuestos (escatol e indolacético), al agregar reactivo de Kovac's o Ehrlich se produce un compuesto de color rojo (ver fundamento en la prueba de SIM). La producción de indol en esta prueba también puede ser detectada, pero la penetración del reactivo de lectura es más difícil ya que es impedida por la agregación de aceite mineral o vaselina al tubo. Para fines prácticos al no ser posible su lectura se debe de correr al mismo tiempo la prueba de SIM y reportar en esta prueba (MIO) al indol como: sin lectura. Sí es posible la lectura de indol cuando se agrega aceite mineral, este debe de realizarse inclinando un poco el tubo. Debe de realizarse



primeramente la lectura de la prueba de motilidad y descarboxilación de ornitina ya que se pueden alterar los resultados.

Ingredientes del medio

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Agar	2.0	Peptona de gelatina	10.0
Dextrosa	1.0	Peptona de caseína	10.0
Extracto de levadura	3.0	Púrpura de bromocresol	0.02
L- Ornitina	5.0	pH	6.5 ± 0.2

Técnica

7. Se inocula un medio MIO en forma vertical de consistencia semisólido por cada microorganismo a probar.
8. Tomar un inóculo liviano de un cultivo de 18 a 24hrs. puro, con el asa recta.
9. Sembrar el tubo por picadura hasta el fondo de este.
10. Agregar 0.5ml de aceite mineral estéril.
11. Incubar a 37°C durante 6hrs.
12. Observar si hay un cambio de pH, el indicador cambio de purpura a amarillo. Reportar este cambio.
13. Se deja incubar nuevamente hasta el cumplimiento de 24hrs.
14. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación en el siguiente orden:
 - d. Prueba de motilidad
 - e. Prueba de descarboxilación de ornitina
 - f. Prueba de indol
15. Para la prueba de indol se deben de agregar 3 gotas de reactivo de Ehrlich o reactivo de Kovac's (Ver Anexo 6). Interpretar.

Interpretación

Prueba de motilidad

Motilidad (+): los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbidez. Otro fenómeno puede ser la formación de una sombrilla en la superficie del agar al inicio de la línea de siembra a causa de un movimiento rotatorio de un extremo a otro.

Motilidad (-): Crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra.



Prueba de descarboxilación de ornitina

Ornitina (+): primeramente debe de haber a las 6hrs un cambio del indicador de pH a amarillo. Y al cumplir las 24 hrs debe haber un regreso a purpura más intenso.

Ornitina (-): no existe el regreso de pH ácido a alcalino, es decir, el tubo permanece de color amarillo.

Prueba de indol

Indol (+): Anillo rojo en la superficie del medio (formación de una quinona).

Indol (-): No se produce color. O aparición de un color naranja indica desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser el precursor de la formación de indol.

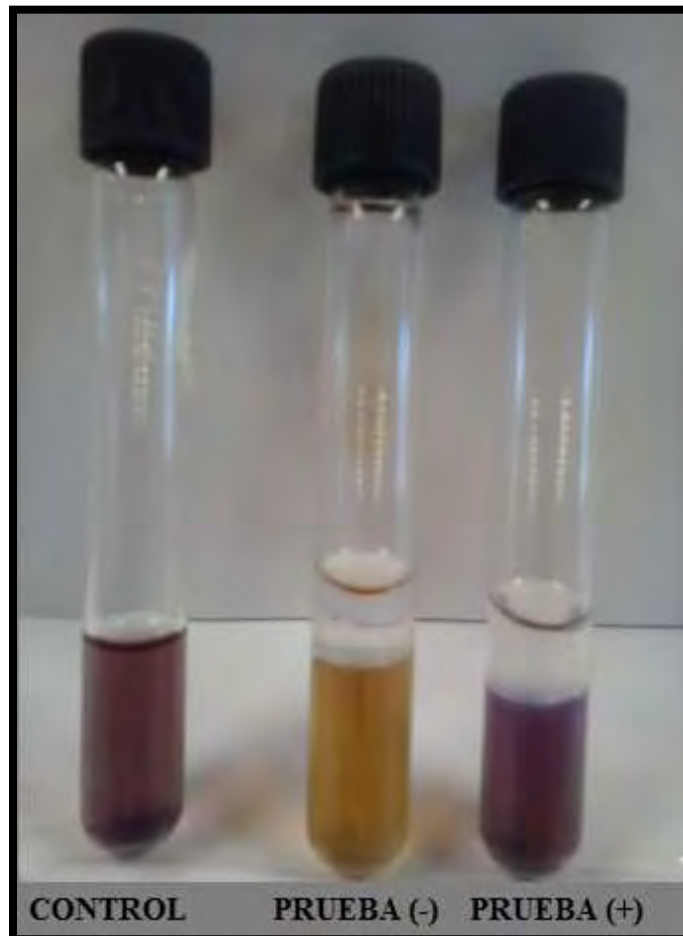


Foto 91. MIO. Descarboxilación de la ornitina



Prueba de LIA (Agar Hierro Lisina)

Fundamento

Si la bacteria tiene la capacidad de producir la enzima lisina descaboxilasa, atacara el aminoácido L-lisina, el cual al ser descarboxilado formara dióxido de carbono y la diamina cadaverina; la cual es estable en condiciones anaerobias. Debido a que el pH puede controlarse se agrega un indicador, el Purpura de bromocresol. Como se menciono anteriormente para que se lleve acabo la descarboxilación primero debe de haber una acidificación del medio, esto se realiza primeramente con la metabolización de la glucosa dando como productos una mezcla de ácidos; que acidifican el medio y provocando el vire del purpura de bromocresol a amarillo. Después llevándose acabo la descarboxilación del aminoácido dando la producción cadaverina, la cual alcaliniza el medio y provoca el vire del indicador nuevamente a un color purpura más intenso.

También se hace la interpretación de la presencia de H₂S, La formación de ácido sulfhídrico se observa por una coloración negra debida al sulfuro de hierro producido.

Hay bacterias que a fin de realizar una descarboxilación de la L-lisina realizan la desaminación de la lisina a ácido alfa cetocarbónico, formando compuestos pardo-rojizos en el pico de flauta del medio con la sal de hierro y por la acción del oxígeno.

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Agar	13.5	L-Lisina	10.0
Citrato férrico de amonio	0.5	Peptona de gelatina	5.0
Dextrosa	1.0	Púrpura de bromocresol	0.02
Extracto de levadura	3.0	Tiosulfato de sodio	0.04
		pH	6.7±0.2

Técnica

1. Se inocula un medio de LIA en forma inclinada (pico de flauta) de consistencia sólida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inculo liviano de un cultivo de 18 a 24hrs. puro, con el asa recta.
3. Sembrar el tubo por picadura en el fondo y por estría el pico de flauta.
4. Incubar a 37°C durante 6hrs:
5. Observar si hay un cambio de pH, el indicador cambio de purpura a amarillo. Reportar este cambio.
6. Se deja incubar nuevamente hasta el cumplimiento de 24hrs.
7. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación en el siguiente orden:
 - A. Prueba de descarboxilación de ornitina
 - B. Producción de H₂S



Interpretación

Prueba de descarboxilación de lisina

Lisina (+): primeramente debe de haber a las 6hrs. un cambio del indicador de pH a amarillo y después un regreso a purpura más intenso.

Lisina (-): no existe el regreso de pH ácido a alcalino, decir, el tubo permanece de color amarillo.

Desaminación de lisina: formación de compuestos pardo-rojizos en el pico de flauta del medio.

Producción de H₂S se reporta de la siguiente manera:

H₂S (+): presencia de un precipitado de color negro.

H₂S (-): ausencia de un precipitado de color negro.

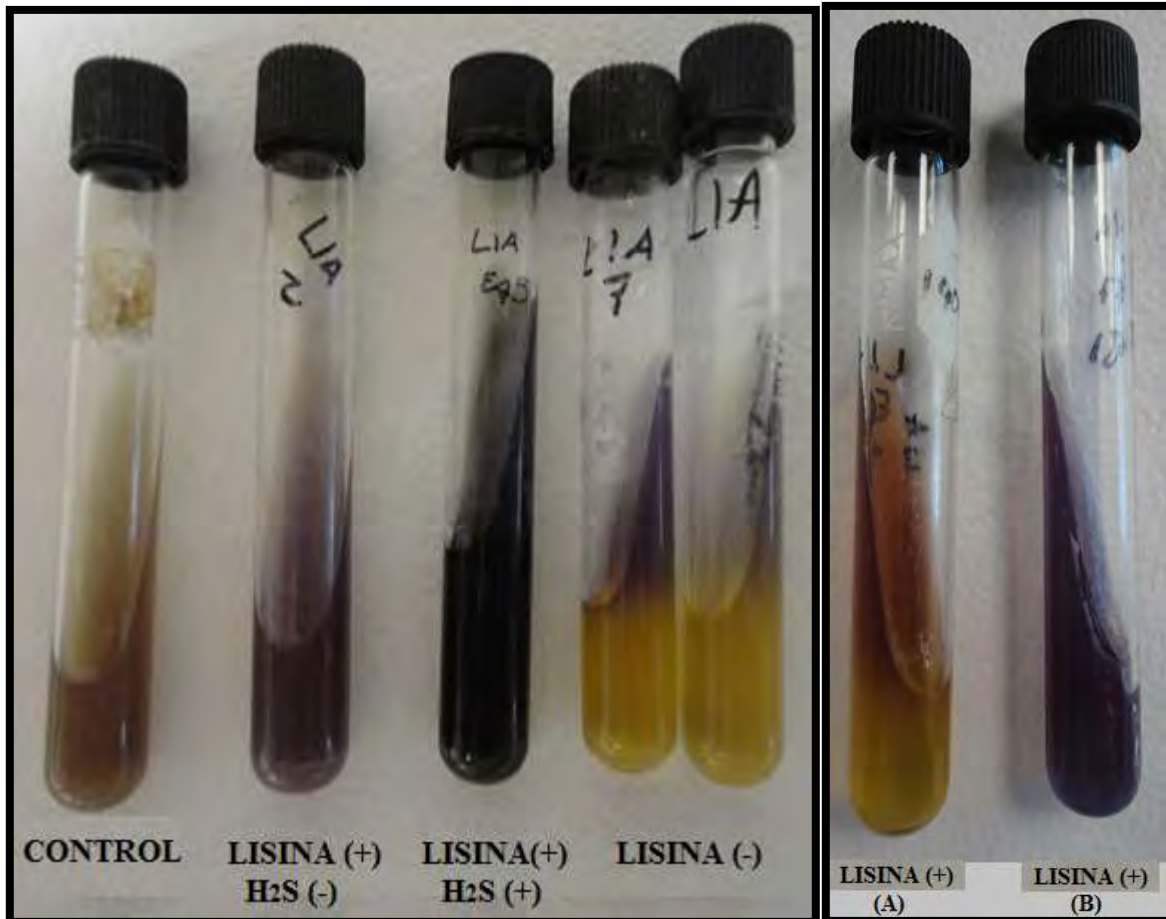


Foto 92. Descarboxilación de la lisina y producción de H₂S.

Foto 93.
A) Desaminación de la lisina.
B) Descarboxilación de la lisina.



Prueba de Arginina

Fundamento

El aminoácido L-arginina es catabolizado (degradado) por medio de dos sistemas que pueden ocurrir de manera simultánea o separa: sistema de la arginina descarboxilasas u sistema de la arginina deshidrolasa.

En el sistema descarboxilasa, la L-arginina sufre una descarboxilación para producir agmatina, una molécula más grande que la putrecina, que no puede ser considerada el producto final en el catabolismo de la arginina por las bacterias vivas. La posterior degradación de esta en dos compuestos, putrecina y urea. Si la enzima ureasa está presente, la urea es catabolizada aun mas para 2 moléculas de amoniaco y dióxido de carbono. La agmatina es catabolizada por la agmatina deshidrolasa a putrecina, CO_2 y NH_3 .

En el sistema dihidrolasa, la degradación de la L-arginina ocurre en un proceso de dos pasos: primero una degradación de la L-arginina a L-citrulina, segunda por un sistema que fracciona la citrulina. La reacción global produce formación de L-ornitina, CO_2 y NH_3 a partir del sustrato L-arginina.

Una cambio rápido e intenso del indicador de pH a la alcalinidad indica que el catabolismo de la L-arginina se debió al sistema arginina dihidrolasa. Un cambio más débil y mas lento del pH sin la formación de amoniaco ocurre cuando L- arginina solo es degradada por el sistema de arginina descarboxilasa.

Ingredientes del medio:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada
Caldo base descarboxilasa de Moeller

Dextrosa	0.5	Piridoxal	0.005
Extracto de carne	5.0	Púrpura de bromocresol	0.01
Peptona	5.0	Rojo de cresol	0.005
+ Aminoácido (Arginina)	1%	pH	6.9±0.2

Técnica

1. Se inocula un caldo de Arginina de consistencia líquida por cada microorganismo a probar.
2. Tomar un inculo liviano de un cultivo de 18 a 24hrs. puro, con el asa redonda.
3. Sembrar el tubo por difusión.
4. Se le agrega un mililitro de aceite mineral.
5. Incubar a 37°C durante 6hrs:

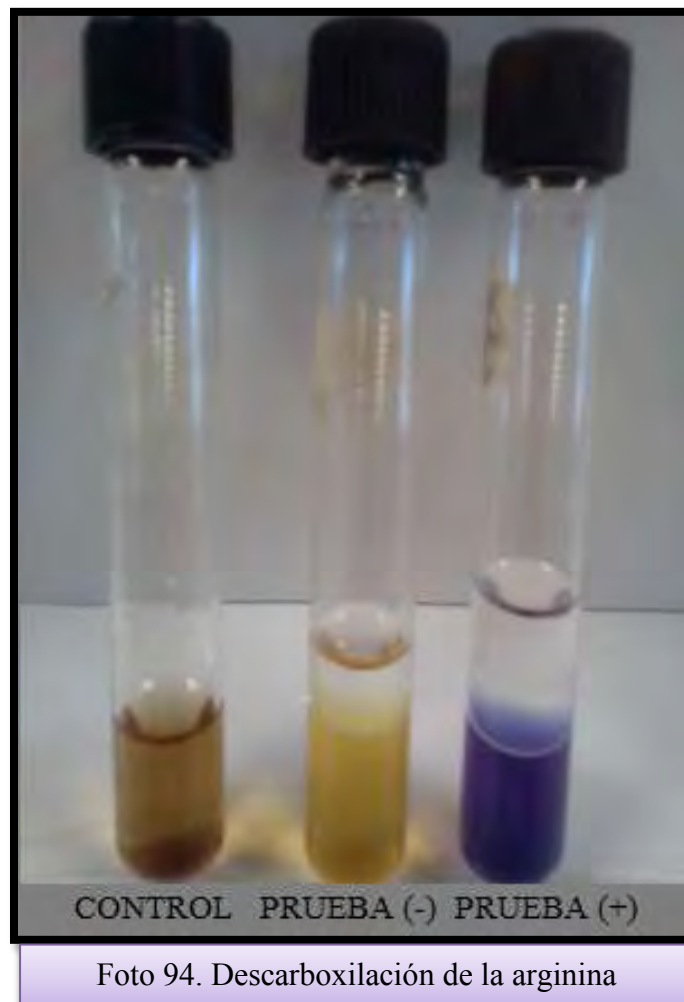


6. Observar si hay un cambio de pH, el indicador cambio de purpura a amarillo. Reportar este cambio.
7. Se deja incubar nuevamente hasta el cumplimiento de 24hrs.
8. Terminadas las 24hrs realizar la lectura e interpretación.

Interpretación

Arginina (+): primeramente debe de haber a las 6hrs. un cambio del indicador de pH a amarillo y después un regreso a purpura más intenso.

Arginina (-): no existe el regreso de pH acido a alcalino, decir, el tubo permanece de color amarillo.





TEMA 9

PRUEBAS DE EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS

Antibiótico: Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos. Agentes naturales que son producidos por microorganismos y los agentes químicos son obtenidos por modificaciones químicas.

Los antimicrobianos tienen mayor efectividad cuando se el fármaco administrado es el adecuado, a una dosis efectiva, por la vía indicada, en el momento preciso y durante el tiempo necesario.

El espectro de acción de un determinado antimicrobiano está constituido por el conjunto de microorganismos frente a los cuales es activo. Se denominan bacteriostáticos los que inhiben el crecimiento, y bactericidas los que ejercen acción letal sobre el microorganismo.

Los antimicrobianos se clasifican según su estructura química, su uso terapéutico y su espectro o mecanismo de acción, principalmente. De acuerdo con su estructura química, se establecen diferentes grupos*:

1. Betalactámicos.
2. Aminoglucósidos.
3. Tetraciclinas.
4. Macrólidos.
5. Polipéptidos.
6. Sulfamidas.
7. Nitrofurantoínas.
8. Quinolonas.

*Ver Tabla 8 del Anexo 9.

Hay varios sitios de acción posibles para los antimicrobianos dentro de la célula bacteriana, pero las vías o las estructuras atacadas con mayor frecuencia son la síntesis de la pared celular, la membrana celular, síntesis de proteínas y síntesis de material genético (DNA y RNA). En la figura 25 se resumen los diferentes mecanismos de actividad antimicrobiana.

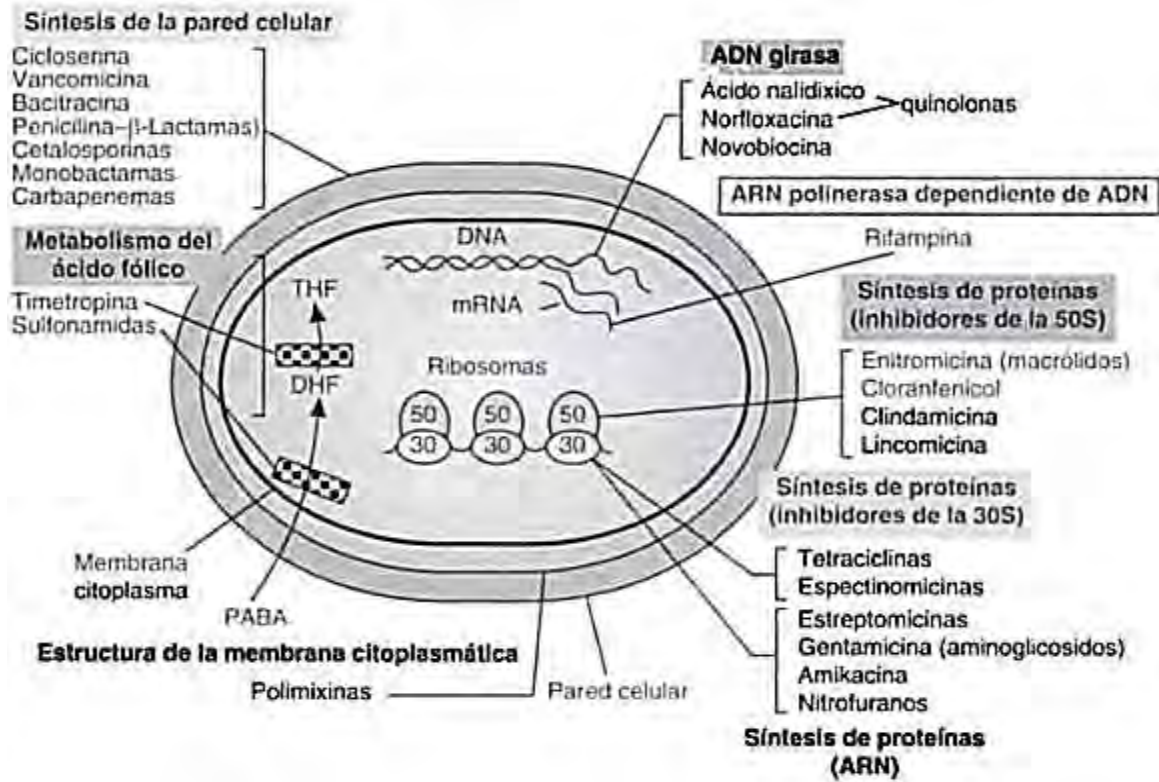


Fig. 25. Visión General del Mecanismo de acción antimicrobiana. Tomado de Brok: Biología de los microorganismos, Madrid. Prentice Hill. 1998.

El uso indiscriminado y el abuso en la utilización de los antimicrobianos dan lugar a una selección de las cepas resistentes, por eliminación de la flora sensible. La mayoría de las bacterias con importancia clínica son capaces de adquirir y expresar resistencia a los agentes antimicrobianos que habitualmente se usan para tratar infecciones. Por consiguiente, una vez que un microorganismo es aislado en el laboratorio, su caracterización con frecuencia incluye pruebas para detectar la sensibilidad así como la resistencia a antimicrobianos. Los procedimientos para detectar la resistencia a antimicrobianos se denominan pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.

El antibiograma es un método de estudio in vitro del comportamiento de los antimicrobianos frente a los agentes infecciosos. Con los resultados obtenidos en el antibiograma clasificaremos las bacterias en: sensible o resistentes, aun determinado antimicrobiano. Por ello, el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces y además, la información proporcionada por la vigilancia debe servir de insumo para la elaboración de un programa de uso racional de antibióticos



ANTIBIOGRAMA POR EL MÉTODO KIRBY-BAUER

1. Seleccionar el número de antibióticos a probar en el análisis dependiendo del tamaño de la caja
2. Rotular una placa de Müeller-Hinton con el nombre del microorganismo a trabajar.
3. Preparar una suspensión del microorganismo problema (a partir de una colonia del AST o agar-sangre) en solución salina fisiológica equivalente al 0,5 en la escala de Mc Farland (reservar la suspensión).
4. Humedecer un hisopo estéril en la suspensión.
5. Escurrir el exceso de líquido contra las paredes del tubo de ensayo.
6. Inocular la placa utilizando la técnica de sembrado masivo dejar reposar por 10 min.
7. Con la ayuda de unas pinzas esterilizadas previamente por flameando; distribuir los discos uniformemente los antibióticos elegidos. No deben colocarse más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente. (Ver Fig. 26)
8. Incubar la placa en la estufa a 37°C durante 24 horas.
9. Medir el diámetro del halo de inhibición (vernier o regla convencional) y se interpreta según las tablas de estándares, que normalmente proporciona cada casa comercial expendedora de discos de antibióticos (p. ej. ver Anexo 8).

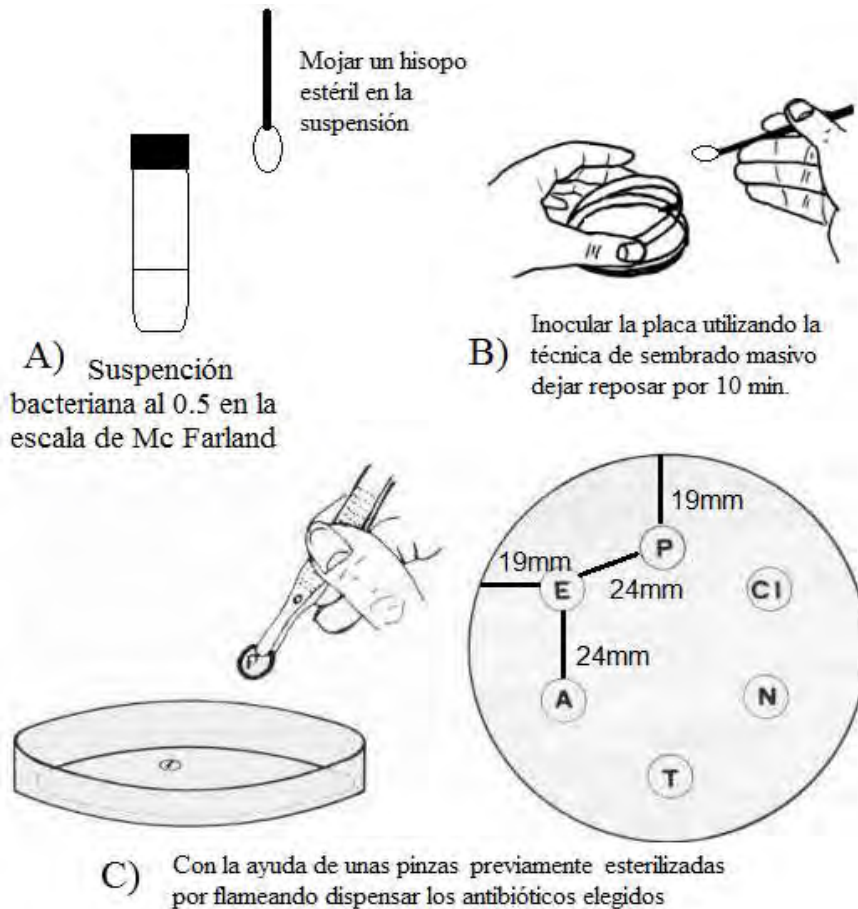


Fig. 26.
Técnica de colocación de los sensidiscos para un antibiograma.

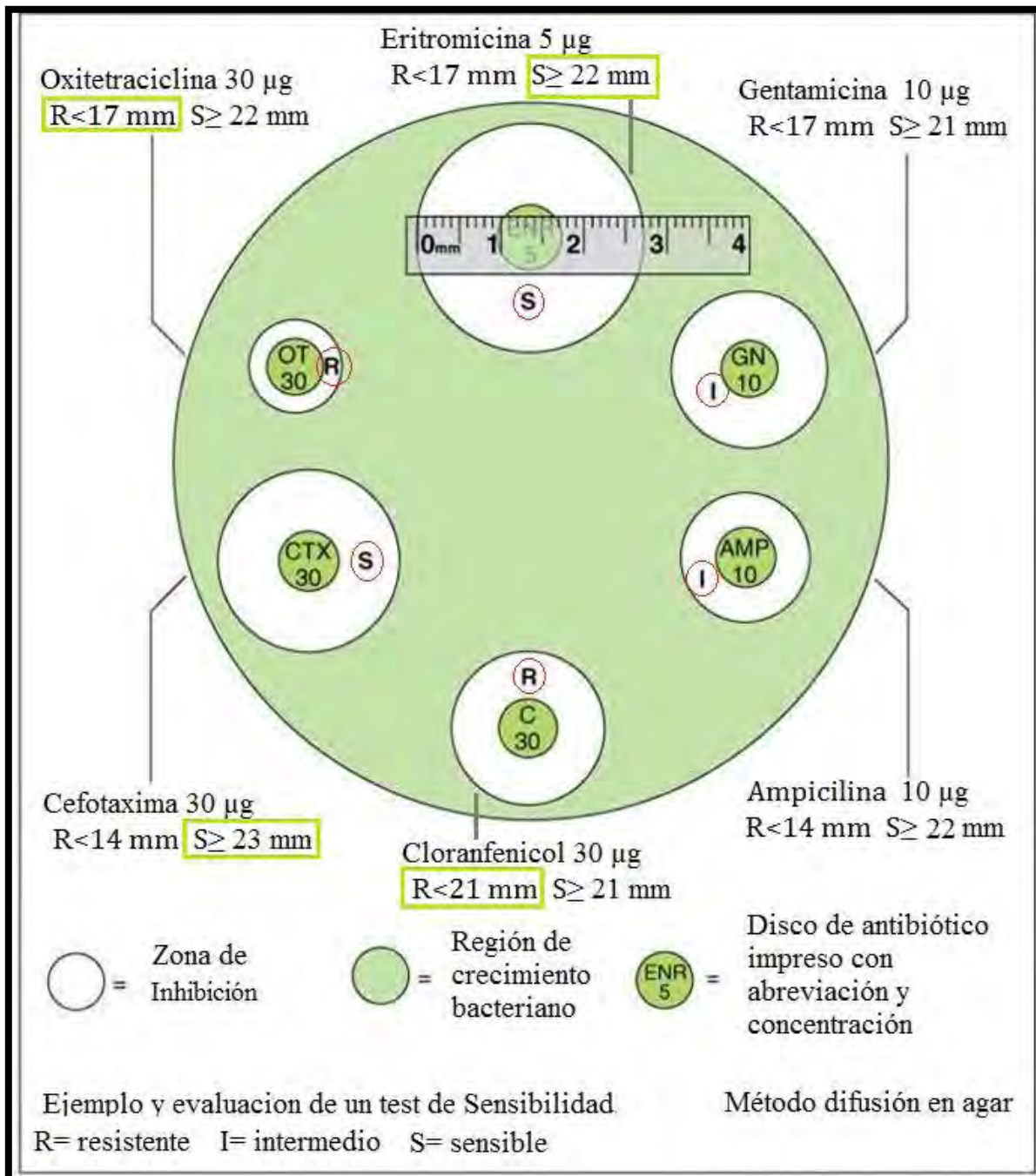


Fig. 27. Lectura de los halos de inhibición de un antibiograma por el Método Kirby-Bauer

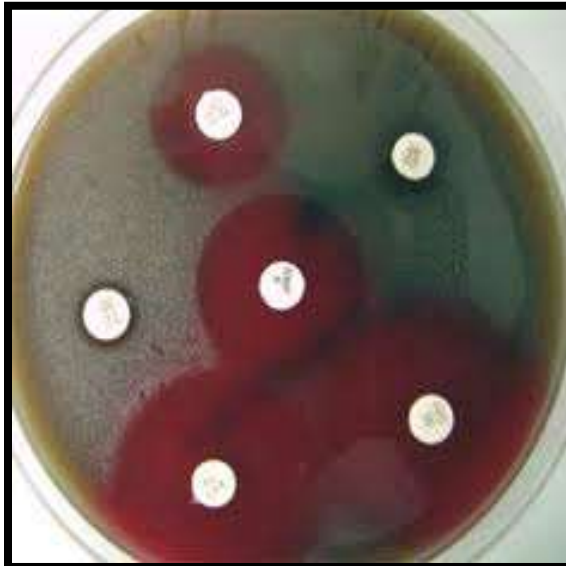


Figura 95. Antibiograma en MH- Sangre correctamente realizado para *Staphylococcus aureus*.



Figura 96. Antibiograma para *Staphylococcus aureus*. Sembrado masivo insuficiente y contaminación por otro microorganismo

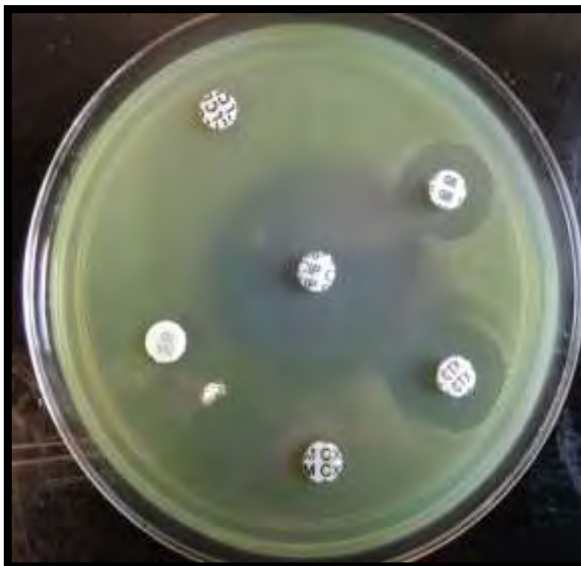


Figura 97. Antibiograma correctamente realizado para *Pseudomonas aeruginosa*.

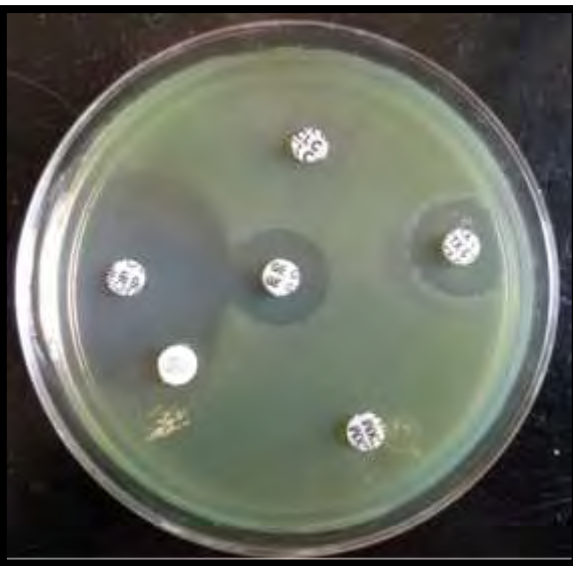


Figura 98. Antibiograma para *Pseudomonas aeruginosa*. Sensidiscos colocados muy juntos, por lo que hay unión entre halos de inhibición.



ANTIBIOGRAMA POR EL MÉTODO DE SENSIBILIDAD POR DILUCIÓN EN TUBO

A. Preparación de la Solución Stock.

Para cuestiones didácticas se utilizarán presentaciones comerciales de los antimicrobianos, pero se debe de considerar que al probar un antibiótico debe ser con la sal pura. Nota: que no cause el antibiótico turbidez al diluirse.

1. Se tiene la presentación comercial del antibiótico a utilizar en una concentración conocida (250mg/2ml o 500mg/5ml). Por ejemplo la Amikacina una de sus presentaciones comerciales es de 500mg/2ml por lo que por mililitro tenemos 250mg/ml.
2. Se deben preparar 10ml de una solución Stock a una concentración de 1024µg/ml. Ya que todos los estándares utilizados para realizar esta técnica se encuentran a esta concentración. Por lo que hay que realizar los siguientes cálculos:

$$10ml \times \frac{1024 \mu g}{1ml} = 10240\mu g \times \frac{1mg}{1000\mu g} = 10.24mg$$

Requerimos 10.24mg de mi antimicrobiano.

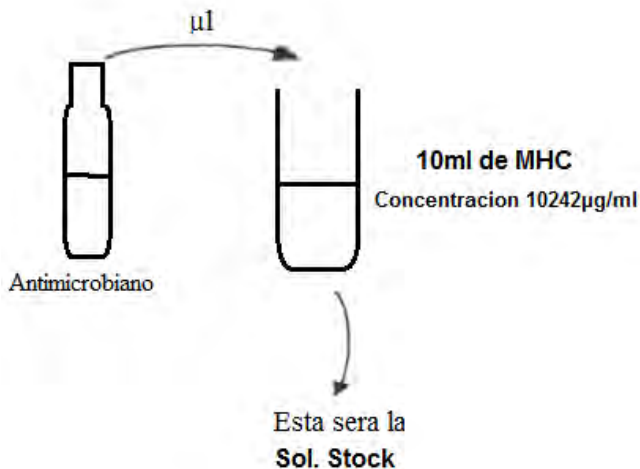
3. Pero la presentación comercial esta a una concentración de 250mg/ml ahora necesito realizar el calculo para conocer cuantos micro litros (µl) debo tomar de mi presentación comercial para prepara la solución Stock a 1024 µg/ml.

$$250mg \rightarrow 1ml$$

$$10.24mg \rightarrow X$$

$$X = 0.041 ml$$

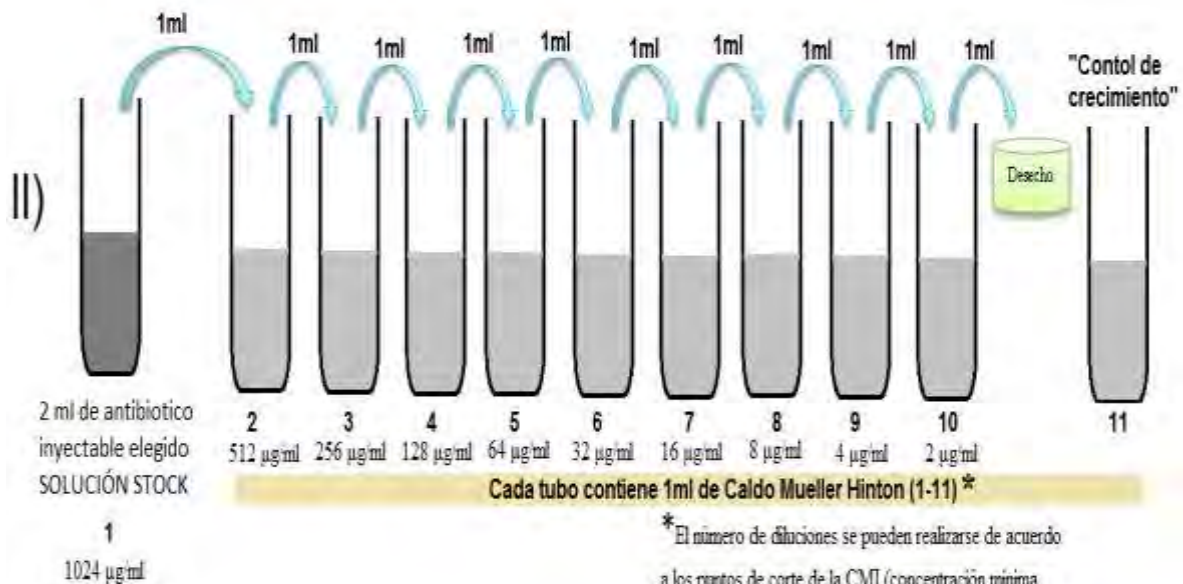
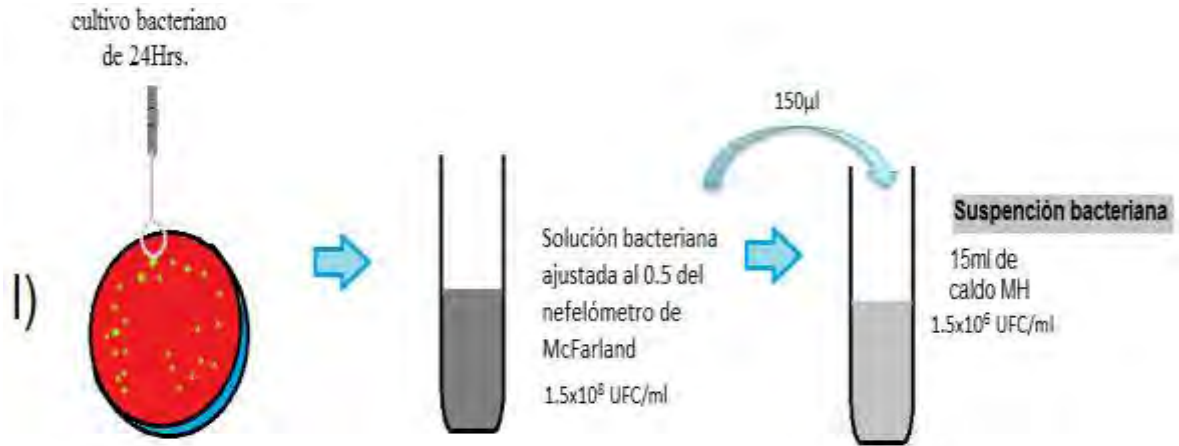
$$0.041ml \times \frac{1000\mu l}{1ml} = 40.1\mu l$$



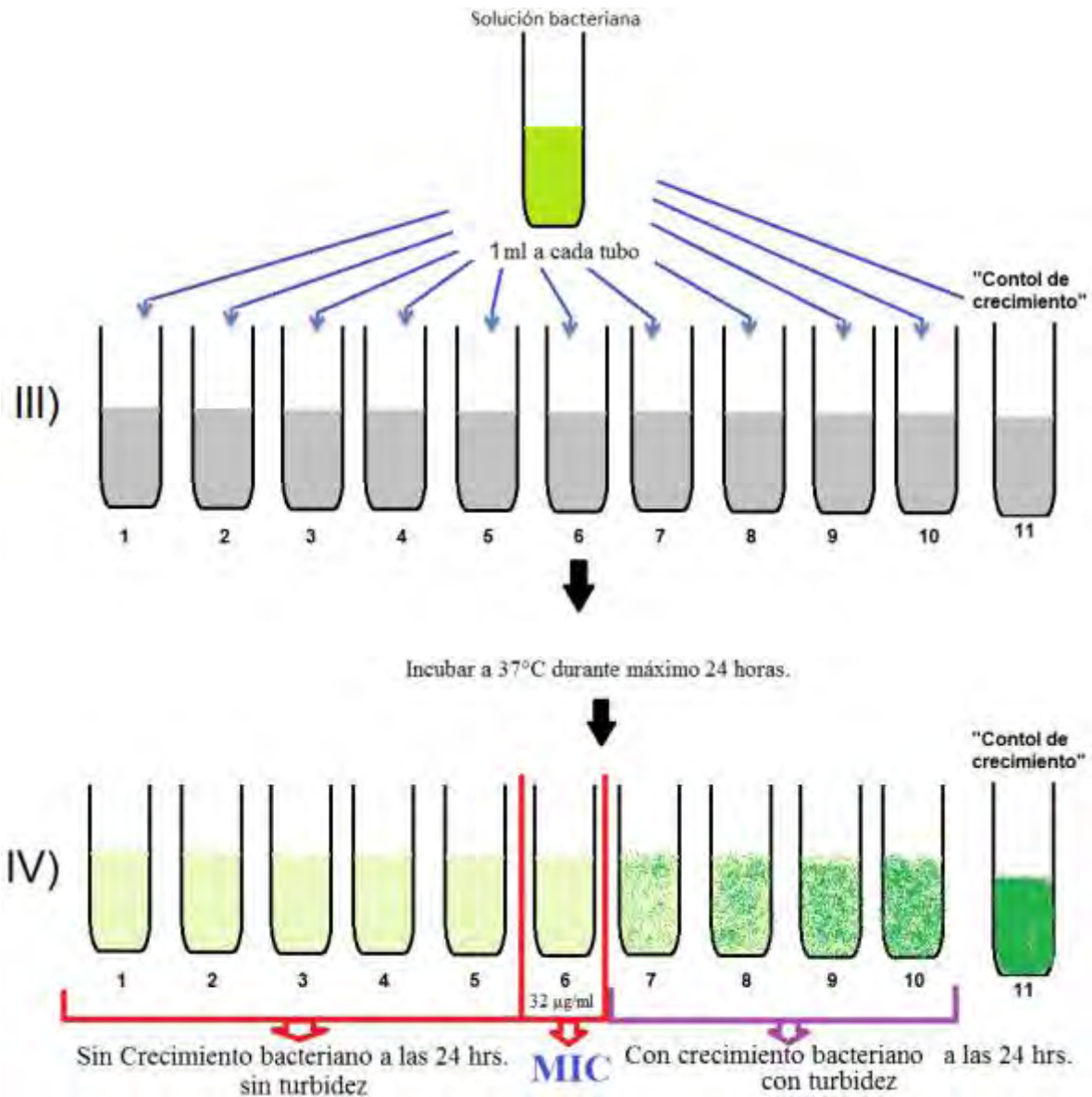
Requiero 40.1µl de mi antibiótico.



B. Ahora ya preparada la solución Stock, se debe continuar el procedimiento de la técnica de sensibilidad por dilución en tubo que se describe a continuación:



*El número de diluciones se pueden realizarse de acuerdo a los puntos de corte de la CMI (concentración mínima inhibitoria) teóricas de cada antibiotico respecto a la bacteria en estudio. Puede aumentar el número de tubos.



C. Calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC) tomando la última dilución donde no hubo crecimiento alguno en la serie de diluciones (ver Anexo 9)

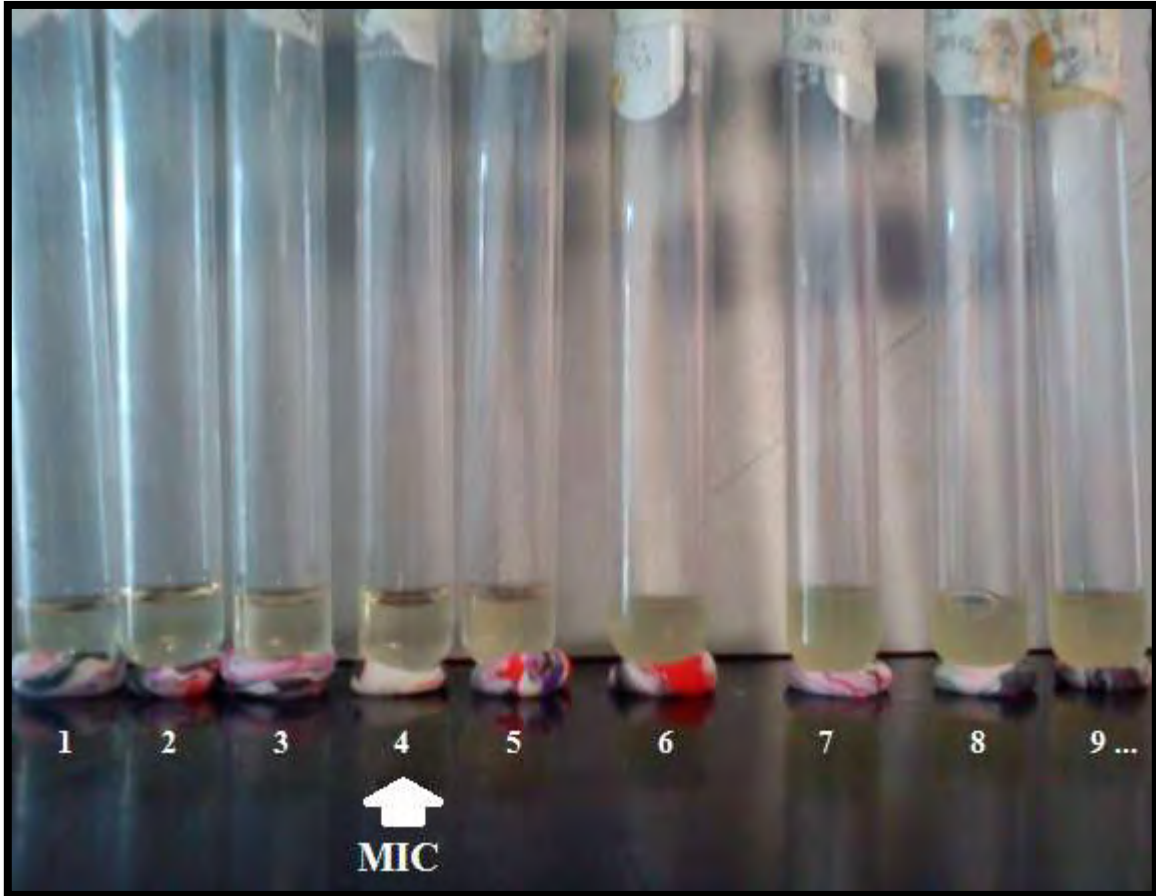


Foto 99. Antibiograma por el método de sensibilidad por dilución en tubo. En el Tubo 4 es la última dilución donde no hubo crecimiento bacteriano.

Según EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING reporta que la MIC de Gentamicina contra *Staphylococcus aureus* es de menor a 1mg/L; siendo comprobada en el laboratorio ya que se encuentra en 0.1mg/ml (ver cálculo en el anexo 9).



TEMA 10

PROTOZOARIOS

Los parásitos son microorganismos que requieren de otro organismo (hospedero) para vivir o para completar una parte de su ciclo biológico. Son eucariotes y contiene estructuras y organelos similares a lo de las células humanas, no presentan pared celular y se consideran animales. Por ello es muy difícil crear antibióticos eficaces y seguros contra los parásitos, ya que la mayor parte de los fármacos antiparasitarios ejercen algunos efectos adversos en las células de los humanos.

El parasitismo es la asociación biológica entre dos seres vivos, en la cual un de los asociados (el parásito), deriva todo el benéfico de la asociación para si mismo, es decir, le va a proporcionar casa y sustento del otro asociado (hospedero) con la particularidad de que el parasitismo causa daño al huésped.

Aunque los microorganismo patógenos, como los virus, algunas bacterias y hongos, también son parásitos, estos son estudiados en la microbiología. La parasitología es la ciencia que estudia los protozoarios y helmintos, incluyendo también a los artrópodos de importancia médica.

Los protozoarios son organismos unicelulares, eucariotes, la mayor parte tiene vida libre, algunos actúan como parásitos adaptándose incluso a las condiciones de vida que le prosee su hospedero. Dentro de los cuales se encuentran varios grupos:

- Apicomplexa (esporozoarios): se localizan en la sangre, los tejidos o en el intestino y presentan reproducción sexual y asexual. Entre los más importantes se encuentran *Plasmodium* (paludismo), *Toxoplasma* (toxoplasmosis) y *Cryptosporidium* (cryptosporidiasis).
- Ciliosporidium (ciliados): *Balantidium coli* (disentería).
- Sarcomastigophora (flagelados y amibas): incluye los flagelados que se encuentran en la sangre (*Trypanosoma*), tejido linfático (*Leishmania*) o aparato digestivo (*Giardia*). Entre las amibas se tiene a *Entamoeba histolytica* (disentería amebiana), y a las amibas de vida libre *Acanthamoeba*. Entre otros.

Los helmintos son organismos pluricelulares muy complejos con tejidos y órganos diferenciados. Su tamaño puede variar, pudiendo llegar a alcanzar hasta varios metros de longitud. Son miembro de dos grupos:

- Aschelminths (gusanos redondos), por ejemplo. *Ancylostoma*, *Ascaris*, *Eterobius*, *Onchacerca*, *Strongyloide*, *Trichinella*, *Trichuris*.



-
- *Platelmintos* (gusanos planos) como *Taenia*, *hymenolepis*, *Echinococcus*, *Dypylidium*, *Fasciola*.

Todas las etapas del ciclo biológico de un parásito pueden ser desarrolladas en un hospedero, o parte de este ciclo se da en un hospedero y en el medio ambiente.

En el caso de los parásitos que desarrollan ciclos sexuales y asexuales, se les denomina hospedero intermediario a aquel donde forman las etapas asexuales. Y hospedero definitivo, donde se desarrolla la etapa sexual.

El parásito después de penetrar en un hospedero se establece en un órgano blanco o en tejidos. La mayoría de los parásitos que entran por ingestión de alimentos o agua contaminados con heces (vía fecal-oral) pasan su ciclo de vida en el aparato digestivo. Los que penetran de manera directa a través de la piel o se introducen a través de un vector, infectan la sangre o los vasos sanguíneos o establecen infecciones en los tejidos subcutáneos u órganos principales, incluso en la médula o en tejidos linfáticos.

El diagnóstico de los parásitos en el laboratorio se basa sobre todo en el hallazgo del parásito en los tejidos linfáticos, heces y en líquidos corporales (sangre, LCR, orina esputo y otros). Cuando un parásito es un protozoario, las muestras se tiñen y se examinan al microscopio, donde se pueden detectar trofozoitos (formas metabólicas activas que se nutren del hospedero) o quistes (formas latentes). Cuando el agente infeccioso es un helminto, el diagnóstico se basa en el hallazgo de huevos del gusano de larvas en heces, microfilarias en sangre, gusanos adultos en los tejidos subcutáneos o en el aparato digestivo.

A continuación se en listan los parásitos representativos a nivel clínico:

- *Giardia lamblia*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Entamoeba hystolitica*
- *Cryptosporidium sp.*
- *Trypanosoma cruzi*
- *Leishmania chagasi*
- *Toxoplasma gondii*
- *Sarcocystis spp.*



Giardia lamblia

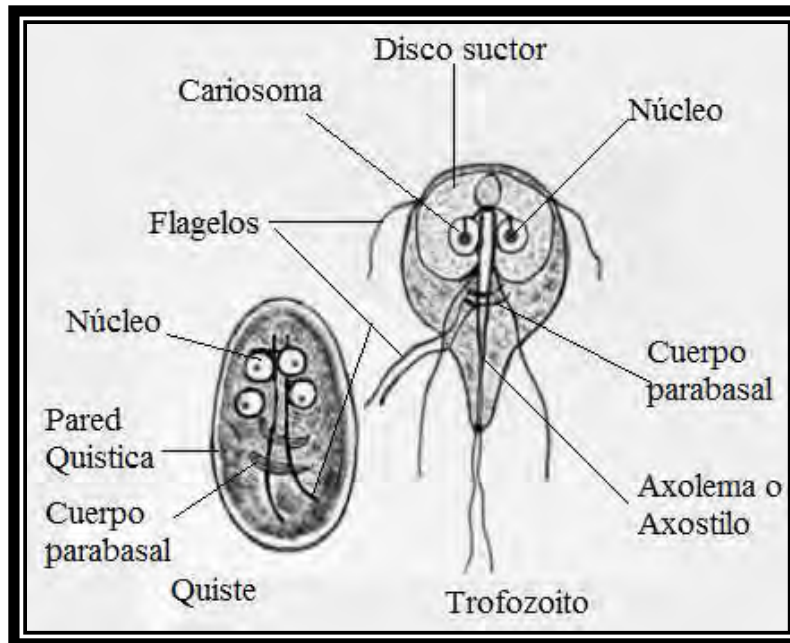


Fig. 28. Esquema de *Giardia lamblia*

La giardiasis es de distribución cosmopolita, es mas frecuente en edades pediátricas que en los adultos; se adquiere por la ingestión de quistes eliminados en las heces. Presenta únicamente dos estadios morfológicos:

Trofozoito: mide de 9 a 2 micras de longitud por 5 a 12 de ancho, tiene una cara dorsal convexa y una ventral plana, esta última ocupada en su mayor parte por dos depresiones adyacentes que constituyen el disco suctor, el cual funciona de manera semejante al de una ventosa. Posee dos núcleos dispuestos a los lados de la línea media y cuatro pares de flagelos situados a corta distancia del borde anterior de la célula.

Quiste: es ovoide, mide de 4 a 10 micras de largo y tiene cuatro núcleos. Posee una pared gruesa, quedan restos de los flagelos. Constituye la fase de resistencia y la infectante.

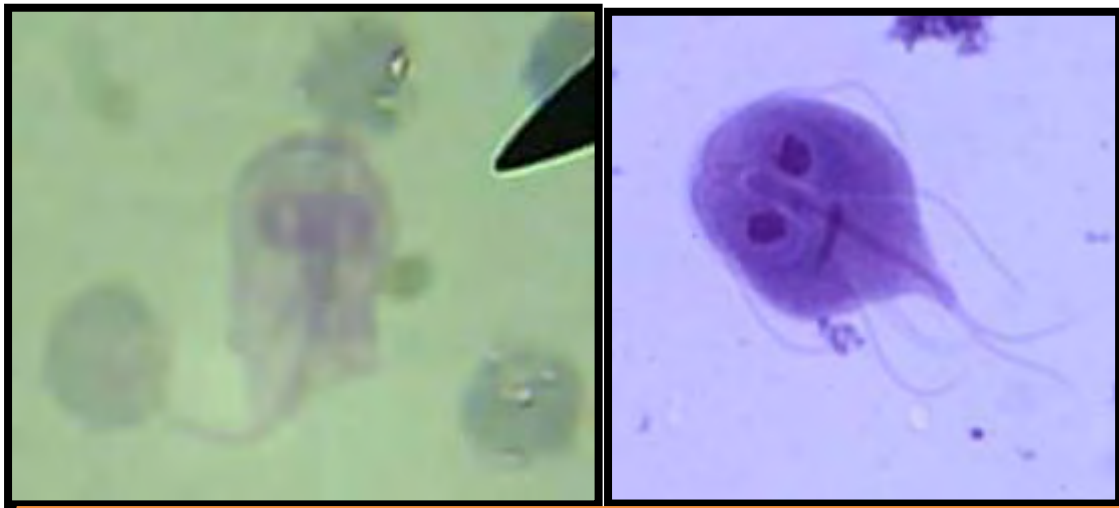


Foto 100. Trofozoito de *Giardia lamblia*.



Foto 101. Quiste de *Giardia lamblia*



Trichomonas vaginalis

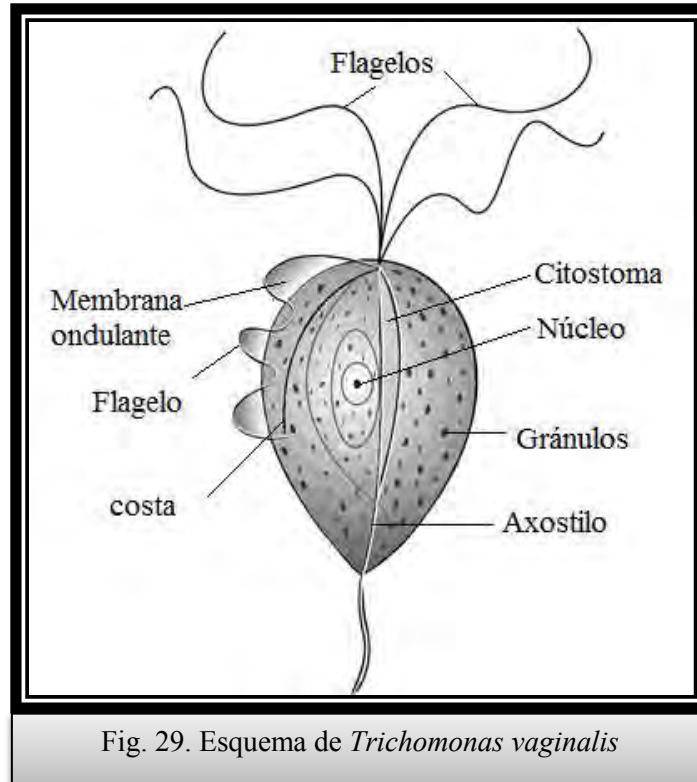


Fig. 29. Esquema de *Trichomonas vaginalis*

El protozoo tiene distribución cosmopolita, pero la infección es más frecuente en grupos de mujeres donde la higiene es deficiente, siendo el contacto sexual el mecanismo más frecuente por el que se adquiere el parásito. *Trichomonas vaginalis* a este flagelado se le conoce solamente en fase de trofozoito, los intentos por encontrar la forma quística han fracasado.

Morfología	Trofozoito
Localización en el humano	Afección de vías urogenitales
Membrana ondulante	Corta y produce movimiento por ondas
Flagelos	4 anteriores y 1 a lo largo de la membrana ondulante. Motil (ver video en disco).
Citoplasma	Gránulos de volutina, siderófilos, de glucógeno, fagosomas y vacuolas
Citostoma	Orificio de manera de boca
Tamaño	7-20 μm
Forma	Alargada y ovoide
Axostilo	Esqueleto
Núcleo	1 grande y ovoide, con cromatina y envuelto por una membrana nuclear porosa.
Costa	Estructura delgada que da movilidad junto con la membrana ondulante
Blefaroplasto	De ella se generan los flagelos

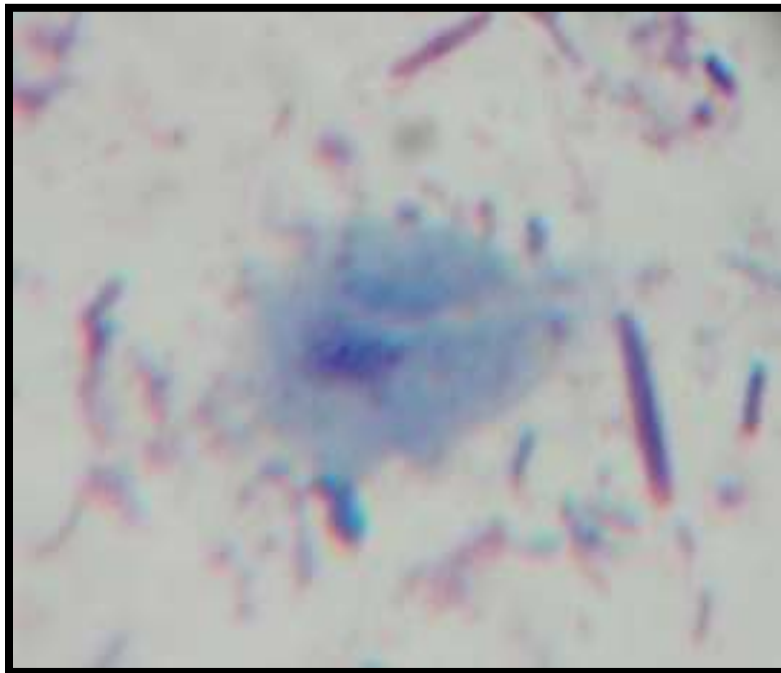
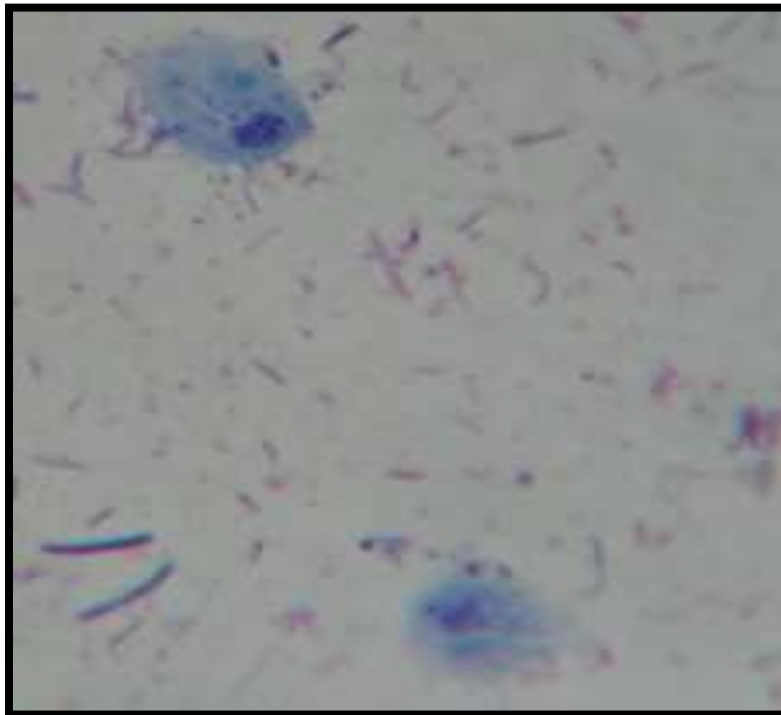


Foto 102. Trofozoito de *Trichomonas vaginalis*.





Entamoeba hystolitica

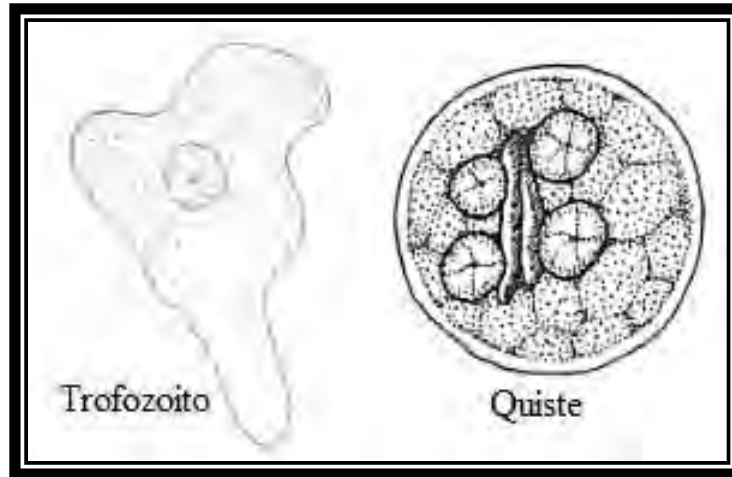


Fig. 30. Esquema de *Entamoeba hystolitica*

Entamoeba hystolitica, se observa prácticamente en todos los países del mundo, pero sin lugar a dudas la mayor incidencia de la infección se encuentra en los países con clima cálido o templado y húmedo; y en condiciones socioeconómicas donde la sanidad ambiental y alimenticia son inadecuadas. Se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales: el trofozoito (forma móvil o vegetativa), el prequiste y el quiste (inmóviles).

Trofozoito: célula de dimensiones variables cuyas medidas fluctúan entre 10 y 60 micras de diámetro, con forma irregular y movimiento característico, mediante la emisión de pseudópodos rápidos y explosivos, digitiformes, largo y anchos. El su citoplasma se encuentra el núcleo, redondo vesiculoso, sin posición fija en el endoplasma, mide de 5 a 7 micras de diámetro.

Prequiste: cuando en las condiciones del medio ambiente en las que se mueve el trofozoito (intestino grueso) son poco favorables para su vida este empieza a inmovilizarse, eliminado todo el material intracitoplásmico que no ha digerido, se redondea, se reviste de una doble membrana gruesa y refringente; en este momento el prequiste presenta un solo núcleo y puede llegar a presentar un masa de glucógeno en una vacuola y barras cromatoides.

Quiste: (forma infectante) el núcleo se divide en dos y luego en cuatro, quedando al final del proceso de maduración el quiste maduro que tiene 4 núcleos pequeños; se recubre de una pared quística resistente y mide de 5 a 20 micras. Desaparece el glucógeno y las barras cromatoidales se hacen poco visibles o desaparecen.

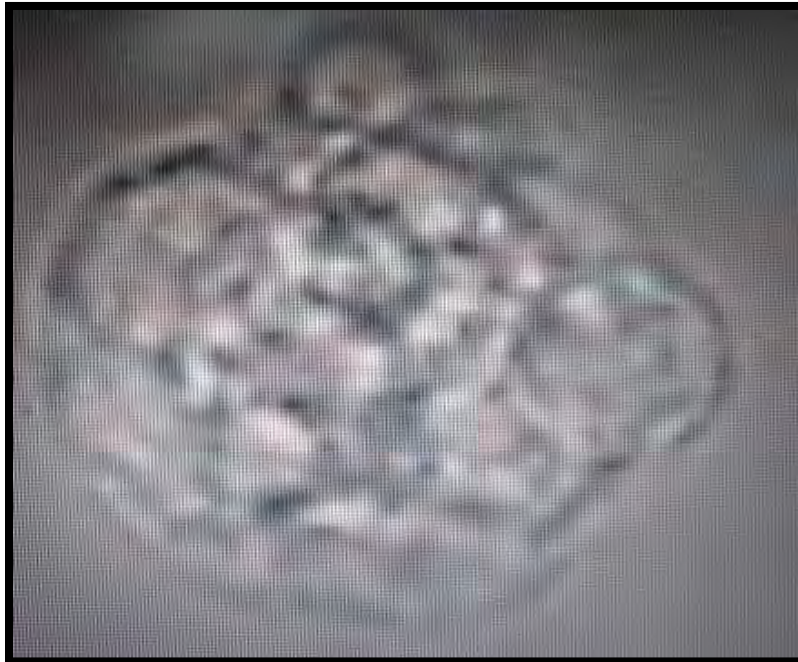


Foto 103. Trofozoito de *Entamoeba histolytica*.

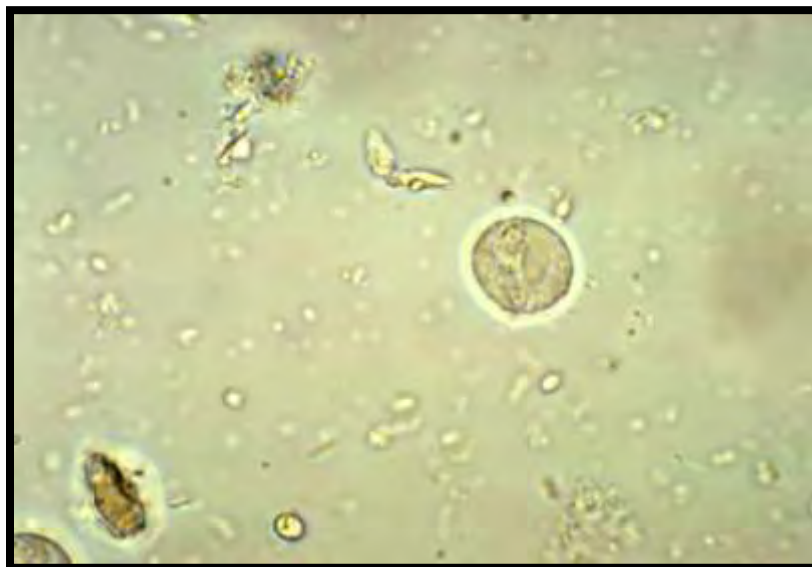


Foto 104. Quiste de *Entamoeba histolytica*



Cryptosporidium sp.

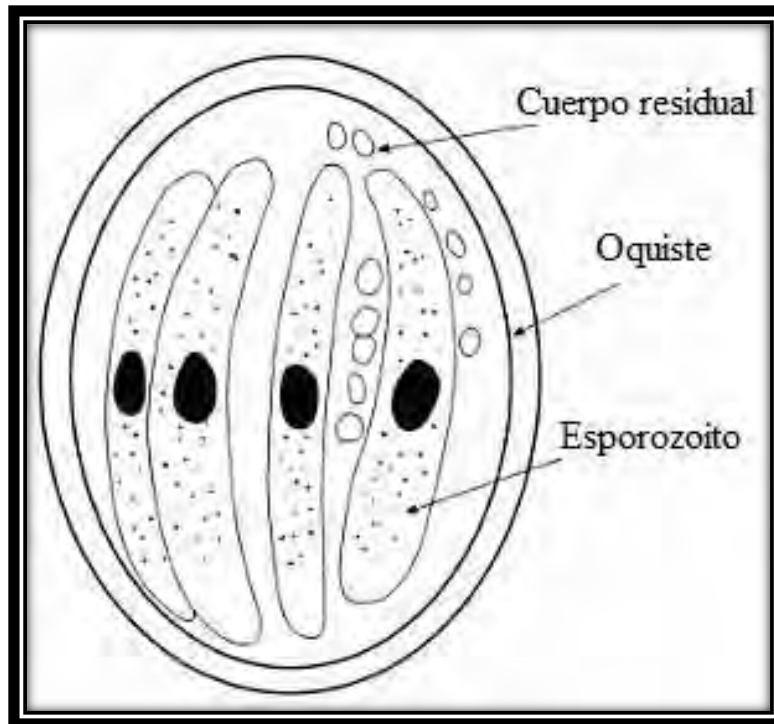


Fig. 31. Esquema de *Cryptosporidium sp.*

Considerado un parásito oportunista o enteropatógeno de distribución mundial. Se presenta el padecimiento en la población infantil, como una de las causas de diarrea autolimitada, por lo que hay que descartar a este agente etiológico como causa de diarrea. La criptosporidiosis enfermedad, se encuentra más frecuente en individuos inmunocomprometidos o con pacientes VIH (+).

Se presenta en el estadio de oquiste, en materia fecal, de forma esférica u ovoide de 4 a 6 μm de diámetro. Cuando se observa a esta estructura se le ve una doble pared y en su interior 4 esporozoitos en forma de pequeños gusanos, aun cuando también se pueden observar oquistes sin esporozoitos formados. Con menos frecuencia se observan oquistes en proceso de desenquistamiento.

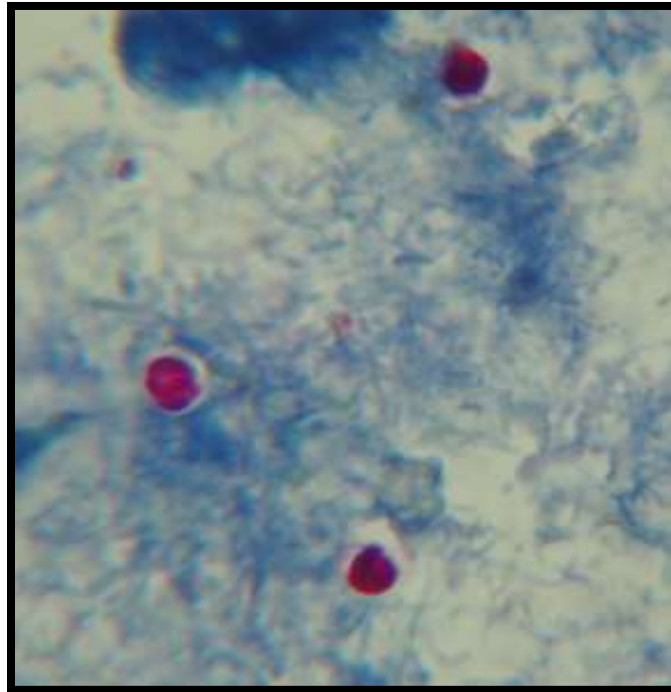
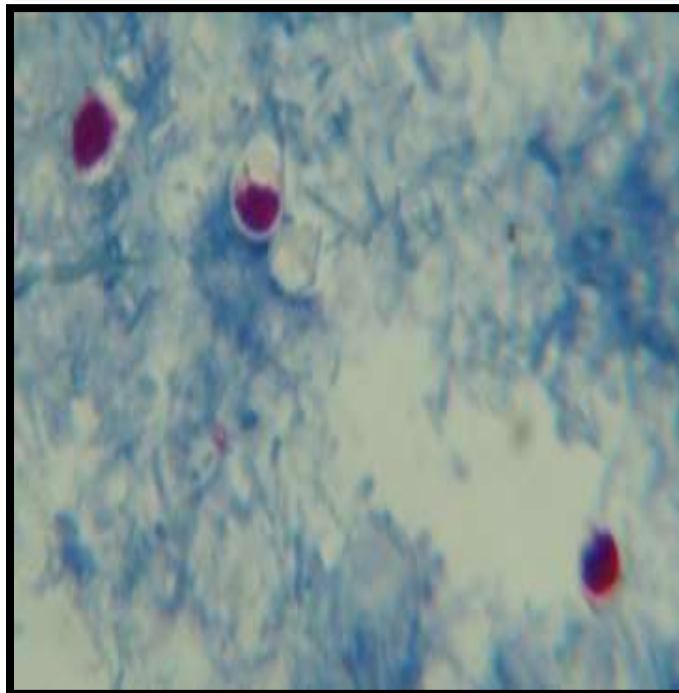


Foto 105. Ooquiste de *Cryptosporidium sp*





Trypanosoma cruzi

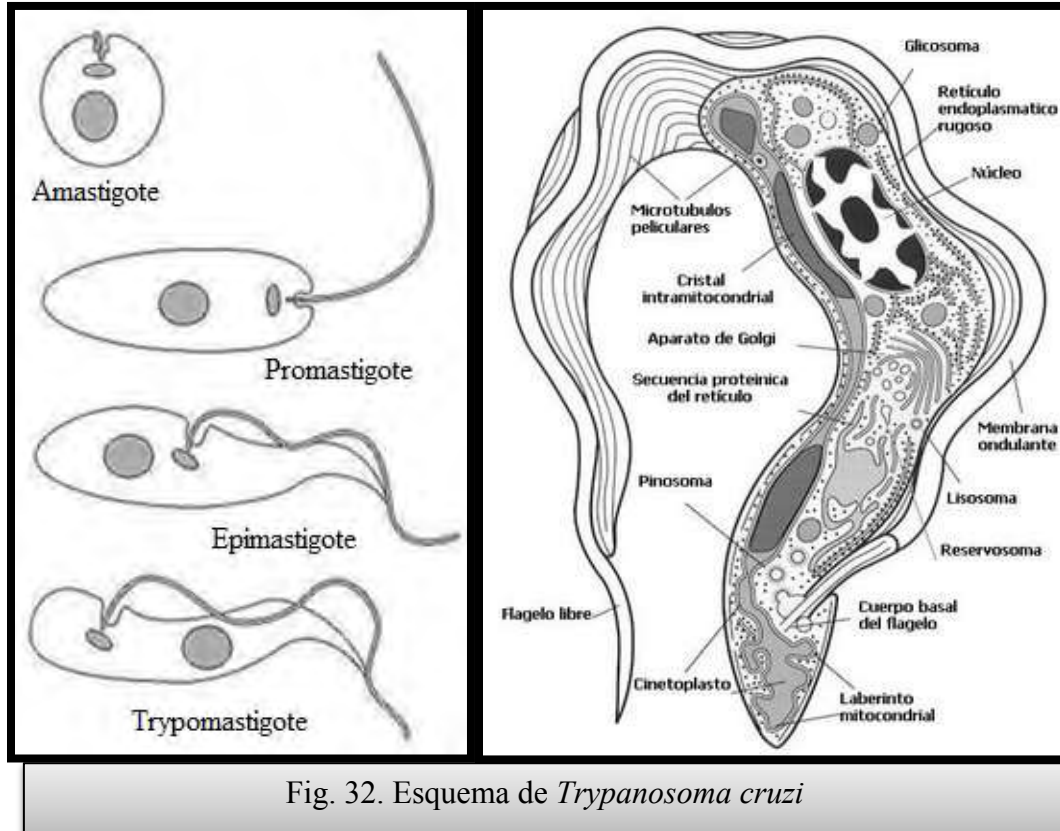


Fig. 32. Esquema de *Trypanosoma cruzi*

La enfermedad de Chagas es la infección causada por este parásito en el hombre y animales. Los triatóminos (artrópodos) son los que transmiten el parásito.

Trypomastigote: es un flagelado de cuerpo alargado que mide unas 20-25 micras de longitud. Presenta un gran núcleo. Del cinetoplasto surge la membrana ondulante que recorre al parásito a todo lo largo de su cuerpo, saliendo libre en la porción anterior ya como flagelo para moverse activamente. El citoplasma es poco granuloso. A este estadio morfológico se le encuentra en la sangre.

Promastigote: es un estadio flagelado alargado de 20 a 25 micras de longitud en el que el cinetoplasto se localiza en porción anterior y lejano al núcleo del cual emerge el flagelo sin formar membrana ondulante, sale libre por la porción anterior del cuerpo, es de duración fugaz.

Epimastigote: es el aspecto fusiforme con 20 a 25 micras de longitud, en el que el cinetoplasto ha migrado desde la porción anterior del cuerpo hasta localizarse en posición anterior pero cercana al núcleo, el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio morfológico se multiplica en el intestino de los triatomíneos profusamente (vector).



Amastigote: es la forma redondeada. Mide 2-2.5 micras, sin flagelo libre, pero se puede observar al flagelo dentro de una bolsa, presenta un gran núcleo y cinetoplasto. Este estadio morfológico se encuentra en el interior de la célula del huésped.

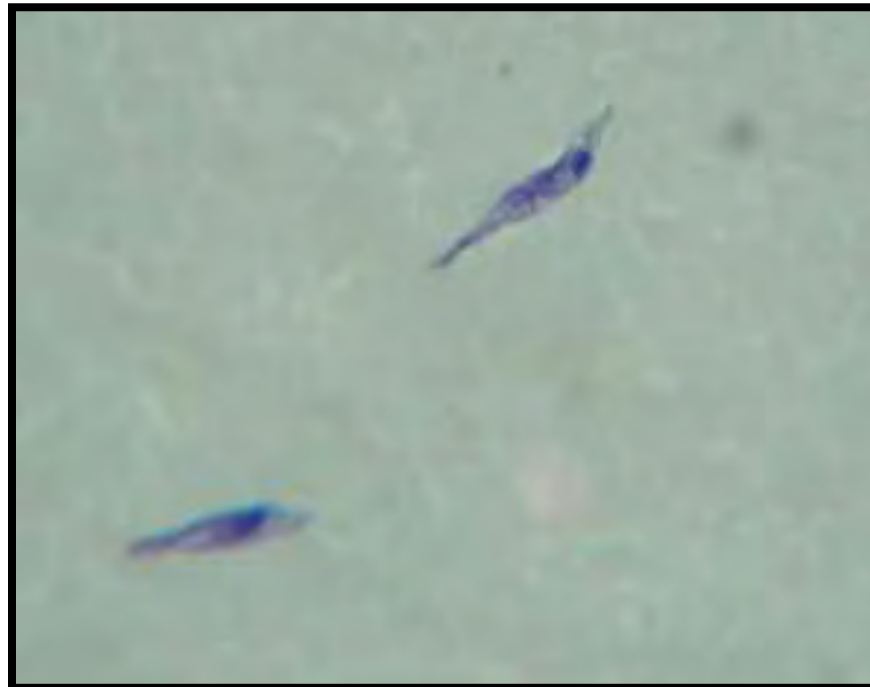


Foto 106. Tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*





Leishmania chagasi

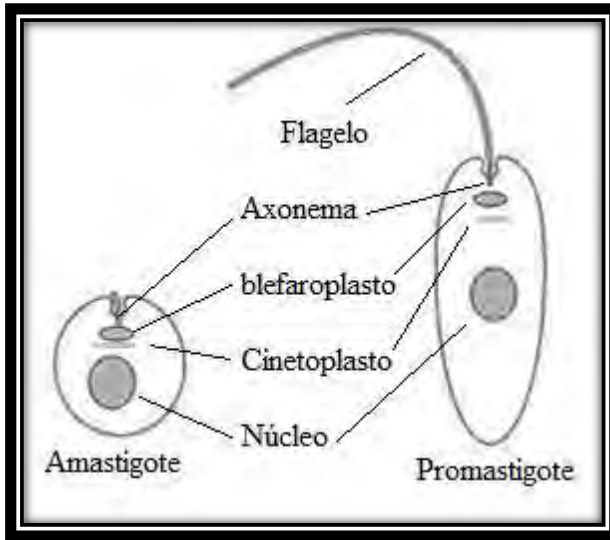
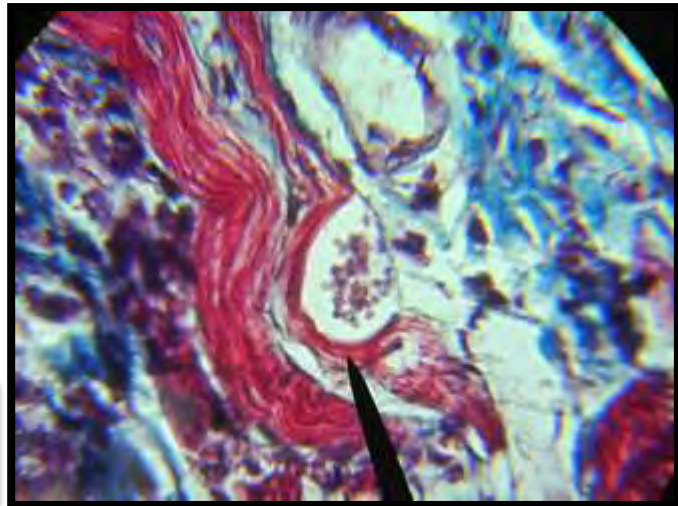


Fig. 33. Esquema de *Leishmania chagasi*

Foto 107. Amastigote de *Leishmania chagasi*.



La leishmaniasis es una enfermedad de la piel, mucosa y vísceras que afecta al hombre y animales causando diversos “complejos” del género *Leishmania* y transmitidas por pequeños moscos de la familia *Psychodidae*. En su ciclo biológico *Leishmania* pasa por dos estadios: amastigote y promastigote.

Amastigote: tiene forma redondeada y oval, 2-7 micras de diámetro, consta de membrana, citoplasma, núcleo esférico, compacto con cromatina granulomatosa, cinetoplasto de forma bacilar y rizoplasto que se convertirá en flagelo en el siguiente estadio.

Promastigote: es fusiforme, mide de 16-18 micras de longitud, posee núcleo central y blefaroplasto situado en posición anteronuclear de donde emerge un flagelo que sin formar membrana ondulante emerge por las porción anterior.



Toxoplasma gondii

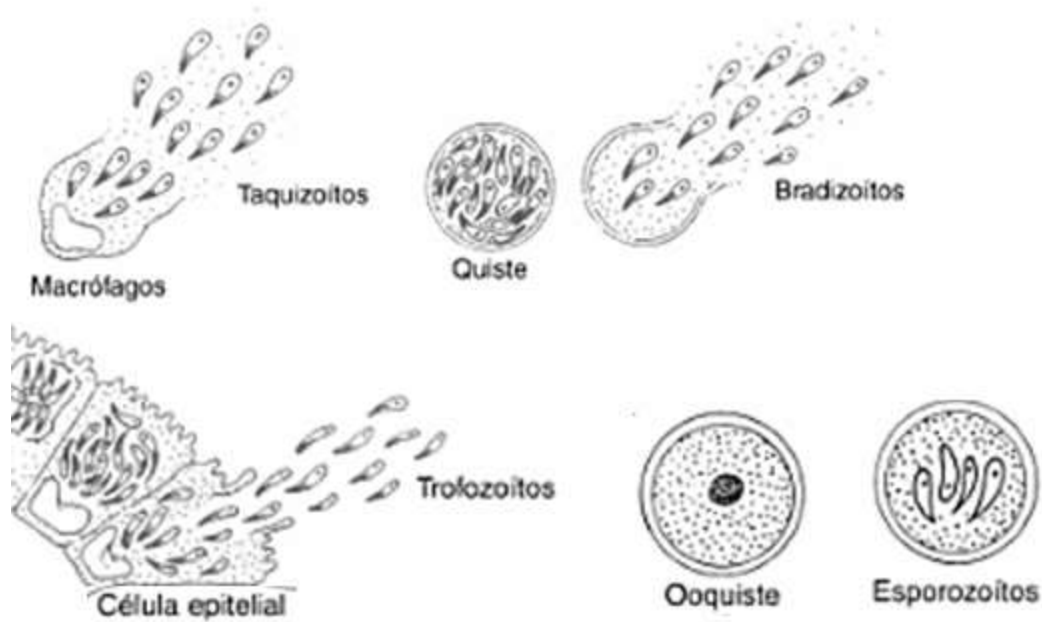


Fig. 34. Esquema de *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria producida por el agente etiológico *Toxoplasma gondii*; generalmente este parásito se encuentra causando meningoencefalitis en recién nacidos. Tiene tres formas que son importantes:

Endozoito, taquizoito o trofozoito: tiene forma ovalada, ligeramente arqueada, con uno de sus extremos terminado en punta y el otro redondeado. Mide de 2 a 6 micras de longitud y de 2 a 3 micras de ancho. El núcleo está localizado en el centro. El citoplasma además de Aparato Golgi, Ribosomas, Retículo Endoplasmático Rugoso y Mitocondrias. Carece de organelos de locomoción y su desplazamiento lo hace por flexión del cuerpo por deslizamiento. Es intracelular obligado.

Quiste: su tamaño depende del número de bradizoitos que contenga cada quiste en su interior, varía de 50 a 200 micras. Son esféricos cuando se localizan en cerebro u otros órganos y adoptan la forma alargada en el tejido muscular o en el corazón.

Ooquiste: resulta de la reproducción sexual que tiene lugar en el epitelio intestinal del vector. Son esféricos u ovales y miden en promedio 12 micras de largo por 11 de ancho, en su interior hay un esporoblasto que se divide en dos porciones, dando lugar a dos esporoblastos.

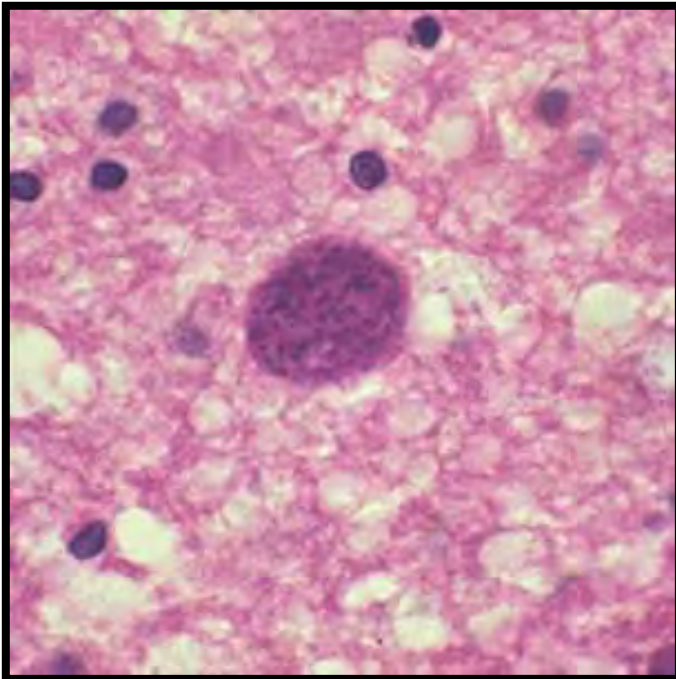


Foto 108. Quiste de *Toxoplasma gondii*.

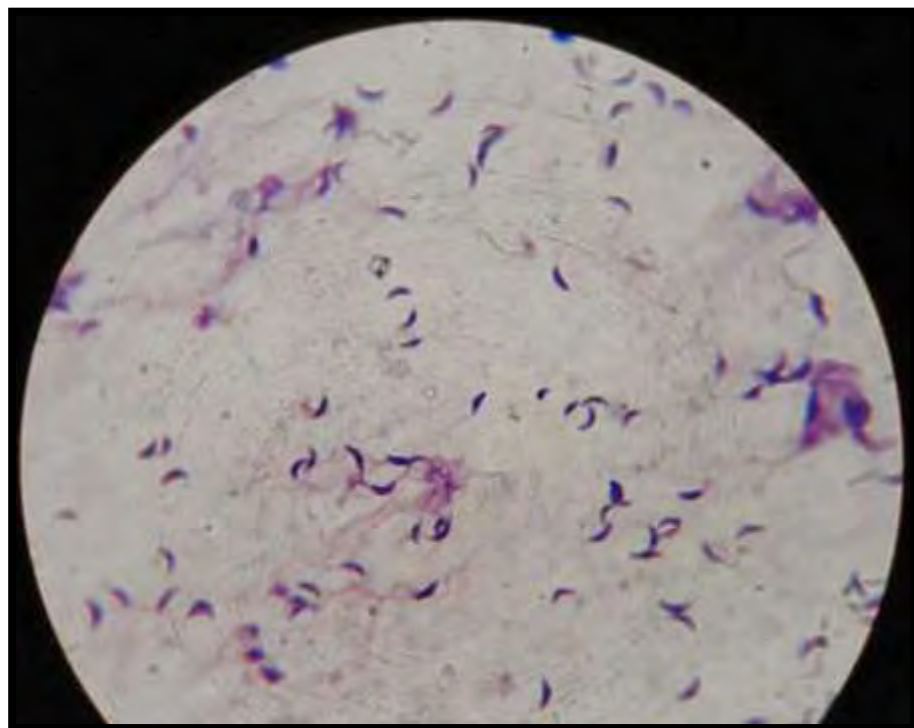


Foto 109. Bradizoitos de *Toxoplasma gondii*.



Sarcocystis spp.

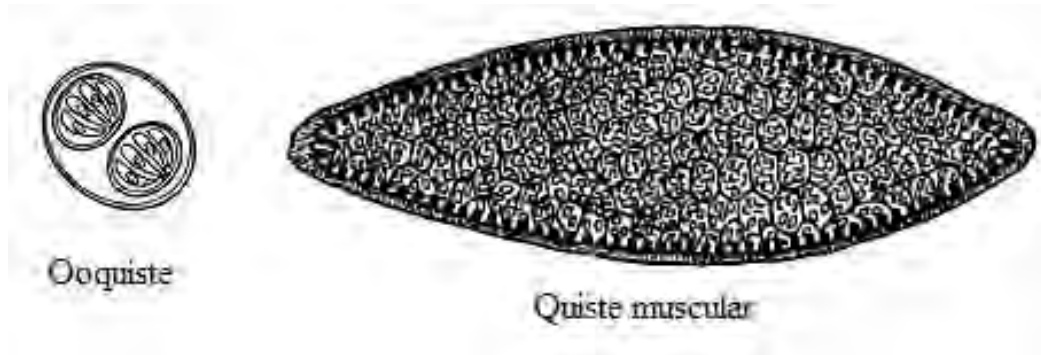


Fig. 35. Esquema de *Sarcocystis* spp.

La sarcosporidiosis es una infección parasitaria causada por varias especies del género *Sarcocystis*, en donde los huéspedes definitivos son carnívoros. La transmisión del huésped definitivo se realiza por ingesta de carne infectada con los quistes en las fibras musculares o en el endotelio del hígado u otros órganos del hospedador.

Fase	Morfología
Ooquiste	Forma ovalada; mide entre 15 y 19 μm de largo por 15 a 20 μm de ancho; muestra una pared delgada y posee dos esporoquistes, cada uno de los cuales contiene 4 esporozoitos en forma de salchicha y un cuerpo refringente residual. Los esporoquistes miden entre 15 y 19 μm de largo por 8 a 10 μm de ancho

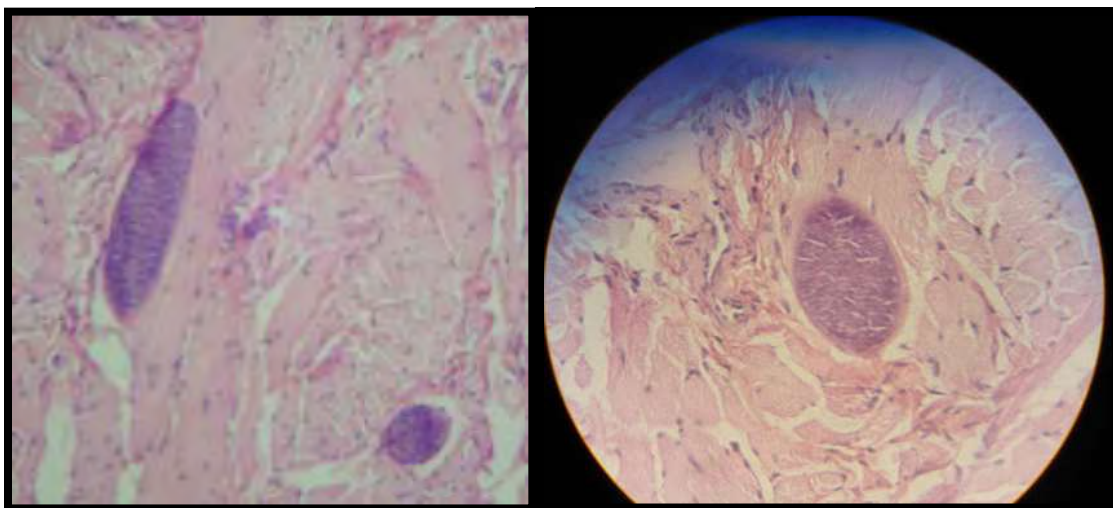


Foto 110. Ooquiste muscular de *Sarcocystis* spp.



En la materia de Microbiología General se busca introducir al estudiante al Reino Protista, no profundizando en técnicas de diagnóstico y estructuras especializadas de cada uno de los parásitos existentes, solo se enfoca al estudio de protozoarios. Es estudio de los demás Phylum le corresponde a la asignatura de Parasitología que cursara en semestres posteriores.

Las siguientes imágenes son una muestra de los phylums que complementa la asignatura de Parasitología. Por lo tanto se incluye en el presente trabajo con carácter ilustrativo e informativo.

PLATELMITOS

HELMITOS



Foto 111. *Fasciola hepática.*

Localización: Parasitan el hígado, las vías biliares proximales y la vesícula biliar de numerosos herbívoros, omnívoros y ocasionalmente los del hombre.

Mecanismos de transmisión: Consumo de agua y vegetales silvestres.

CESTODOS



Foto 112.
Lavas cisticercoides de
Taenia solium.

Foto 113.
Hymenolepis nana.

Foto 114.
Dipylidium caninum.

Localización: Las tenías adultas en el intestino delgado de perros, gatos, cerdos y accidentalmente en los humanos. Lavas cisticercoides accidentalmente en el cerebro.

Mecanismos de transmisión: Consumo de agua y alimentos contaminados con lavas cisticercoides o huevos.



NEMATELMINTOS

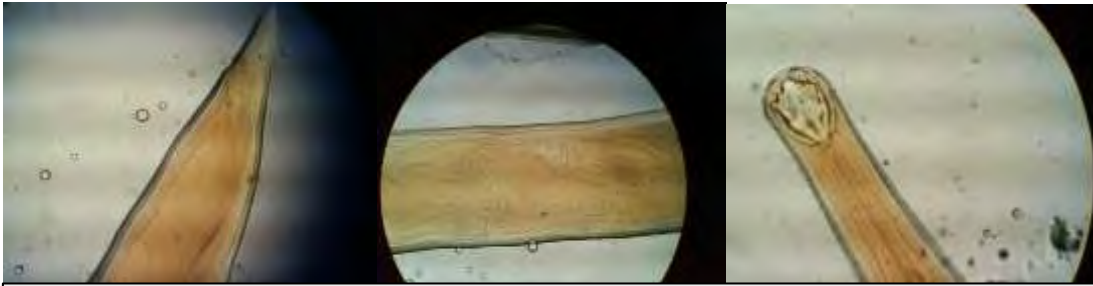


Foto 115. *Ancylostoma caninum*.

Localización: En la luz intestinal, accidentalmente en pulmones, corazón de perros y algunos carnívoros silvestres.

Mecanismos de transmisión: penetración percutánea de la larva o ingestión de alimentos contaminados con lavas o huevos.



Foto 116. *Ascaris lumbricoides* (hembra).

Foto 117. *Ascaris lumbricoides* (macho).

Localización: En la luz intestinal, accidentalmente en pulmones, corazón de humano.

Mecanismos de transmisión: Ingestión de alimentos contaminados con lavas o huevos (producto contaminado con heces humanas).

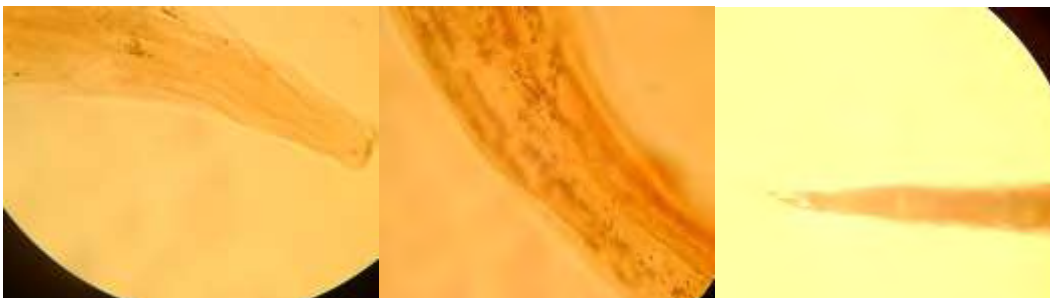


Foto 118. *Enterobius vermicularis* (hembra grávida).

Localización: En la luz intestinal y ano de humano.

Mecanismos de transmisión: Ingestión de alimentos, introducir objetos inanimados a la boca o las propias manos sin lavar (productos contaminado con heces humanas).



ARTRÓPODOS

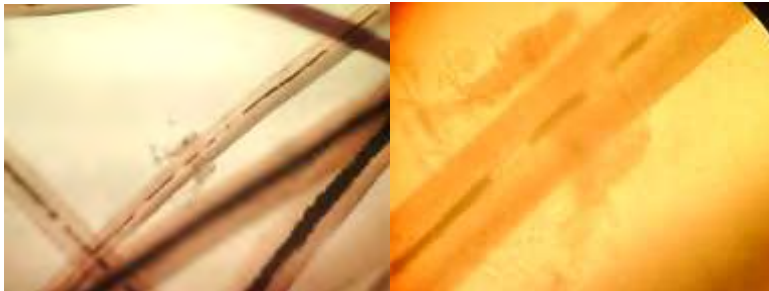


Foto 119. Liendre (huevos) de *Pediculus humanus capitis*.
Localización: Piojo de la cabeza.
Mecanismos de transmisión: por contacto corporal directo o mediante fómites, como ropa, sombreros o gorras, y sábanas.



Foto 120. *Phthirus pubis*.

Localización: Piojo del pubis. Habita pelos de pubis, región ano genital, muslos, axilas y zonas muy pilosas de tórax y abdomen.
Mecanismos de transmisión: por contacto directo, generalmente por vía sexual.

Foto 121. *Cimex lectularius*.

Localización: Chinche domestica que por el día se encuentran escondidos en las grietas del suelo y paredes, colchones y almohadas. Y por las noches abandonan estos refugios para alimentarse de sangre de sus hospederos.
Mecanismos de transmisión: contaminación de almohadas colchones u otros objetos por huevos o ninfas. Los cuales fueron desplazados de un sitio con infección a uno sin.



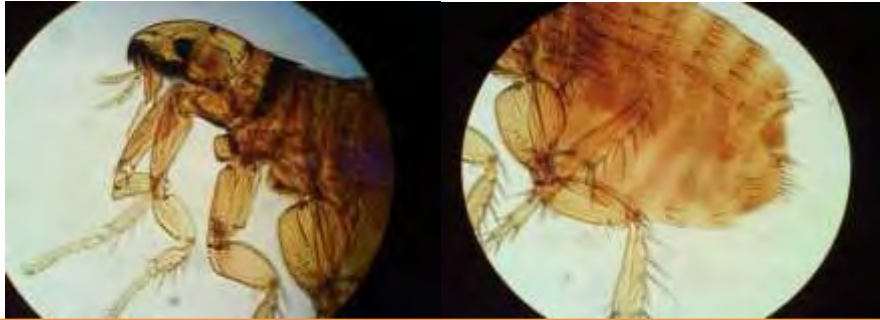


Foto 122. *Ctenocephalides felis*.

Localización: Desarrollo enterradas en el sitio alrededor de donde reposa el hospedero (gato), pueden estar entre el pelo y en todo el cuerpo.

Mecanismos de transmisión: Contacto directo con un hospedero parasitado.

MIASIS



Foto 123. Larva de *Dermatobia homini*.

Localización: Desarrollo subcutáneo en la piel.

Mecanismos de transmisión: picadura de un mosquito infectado, fungiendo la función de vector.

GARRAPATAS



Foto 124. *Amblyoma spp.*

Localización: Parasitando todo el cuerpo principalmente zonas oscuras o de difícil alcance.

Mecanismos de transmisión: Ambiente contaminado (vegetación, hospedadores portadores)



Foto 125. *Otobius spp.*

Localización: Fondo del oído externo del hospedador.

Mecanismos de transmisión: Ambiente contaminado (vegetación, hospedadores portadores)

Foto 126. *Bophilus spp.*

Localización: Parasitando todo el cuerpo principalmente zonas oscuras o de difícil alcance de ganado.

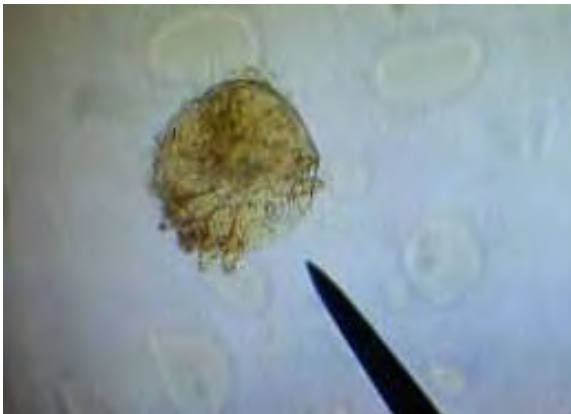
Mecanismos de transmisión: Ambiente contaminado (vegetación, hospedadores portadores).



Foto 127. *Sarcoptes scabiei*

Localización: Parasitando todo el cuerpo, produce la enfermedad conocida como sarna.

Mecanismos de transmisión: contacto directo, o a través de fómites (prendas, ropa, sábanas, toallas). En algunos casos se puede adquirir por contacto con animales infectados, sobre todo perros.





TEMA 11

HONGOS

Los hongos son organismos eucariontes con núcleos bien organizados, cuya membrana nuclear está bien definida. Existen dos tipos de células fúngicas, las somáticas (con núcleo pequeño y su división por mitosis ordinaria) y las reproductoras (núcleos más grandes y su división por meiosis). Al igual que otros eucariontes poseen mitocondrias, sistema endomembranoso y una membrana basal bien organizada.

Los hongos presentan una pared celular rígida en la mayoría de los casos, la quitina (N-acetil glucosamina) es el componente cuantitativamente más importante pero también contiene celulosa, glucanas y mananas. Así como poseen células unicelulares (levaduras) o multicelulares (filamentosos).

Los hongos presentan una morfología muy variada. La única célula o el conjunto de células que lo constituyen se denominan talo. En la naturaleza pueden encontrarse formas muy simples como las levaduras, formas filamentosas multinucleadas y estructuras macroscópicas más complejas como las denominadas setas.

Levaduras: son hongos unicelulares. Pueden ser esféricos, ovoides, elípticas, cilíndricas o muy alargadas. Sus dimensiones varían entre 3 y 10 μ de ancho por 5 a 30 μ de largo. La mayoría de las veces se encuentran aisladas. En algunos casos permanecen unidas formando pseudohifas, cuyo entrecruzamiento constituye el pseudomicelio.

Filamentosos: están formado por estructuras filamentosas, por lo tanto a su unidad funcional se denomina hifa o filamento, y al conjunto de ellas micelio o talo. Las hifas son más resistentes a los efectos mecánicos que las pseudohifas. Estas están constituidas por células unidas muy débilmente.

Los hongos son heterótrofos, es decir, no pueden fotosintetizar por carecer de cloroplastos y, por lo tanto, deben utilizar el carbono de los compuestos orgánicos. Se nutren por absorción ya que no son capaces de incorporar nutrientes simples solubles.

Requerimientos nutricionales:

- Carbono
- Nitrógeno.
- Vitaminas y factores de crecimiento.
- Iones inorgánicos.
- Otros elementos.



Los factores ambientales que influyen sobre estos microorganismos para su desarrollo son:

- Temperatura (crecen a 0° y 55°C con un rango de 25-37°C)
- pH (acidofilos pH 5.6)
- Oxígeno.
- CO₂.
- Humedad.
- Luz (no es vital pero hay veces que juega un papel en la esporulación).

Fig. 36.
Algunas estructuras de los hongos filamentosos.

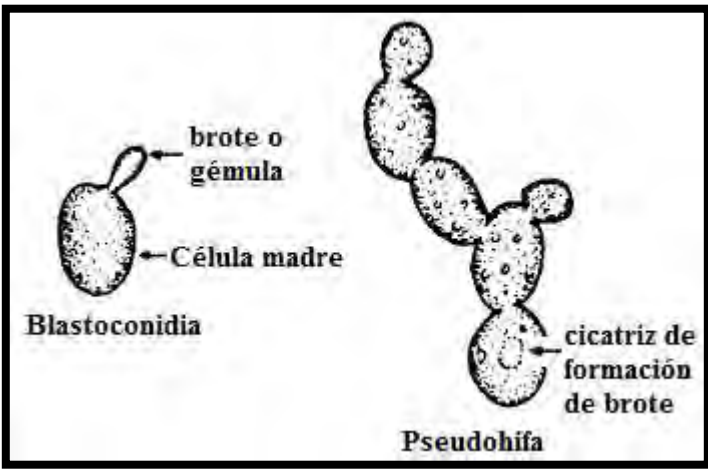
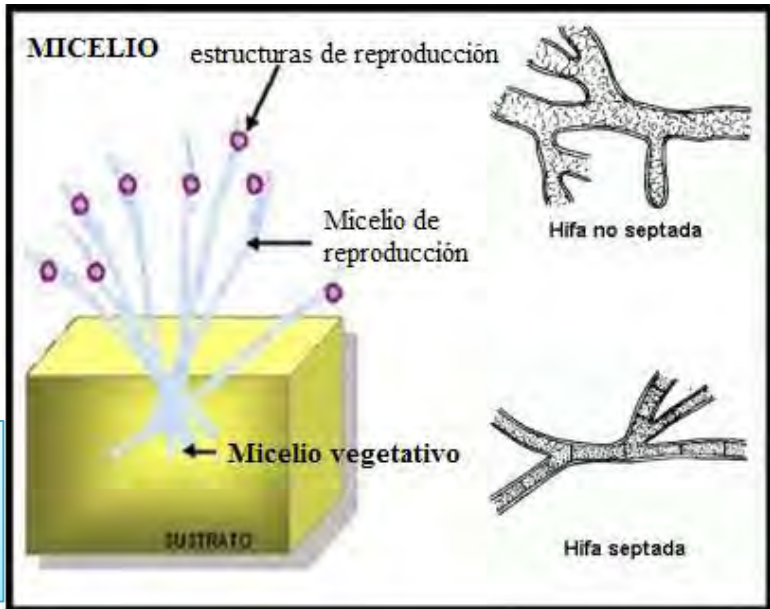


Fig. 37.
Algunas estructuras de los hongos levaduriformes.



Técnica de microcultivo.

1. Cortar cuadritos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y 3 mm de espesor de medio de cultivo (SDA o ADP). ideal para el crecimiento de hongos filamentosos Con ayuda de un bisturí estéril y caliente. Todo se realiza dentro del perímetro del área de esterilización creada con ayuda de un mechero.
2. El sistema para microcultivo esta compuesto de: una caja Petri de vidrio estéril, una varilla de vidrio doblada en “V” estéril, un portaobjetos estéril y un cubreobjetos estéril.
3. Con ayuda de unas pinzas de disección estériles acomodar el sistema dentro de la caja Petri. Se coloca el portaobjetos encima de la varilla de modo que este no se caiga ó mueva con facilidad.
4. Se coloca el cuadro de medio de cultivo sobre el centro del portaobjetos.
5. Tomar con el asa en forma de “L” él inóculo del hongo filamentosos previamente seleccionado.
6. Inocular el medio en cada uno de los lados del cuadro de agar.
7. Colocar sobre el agar ya inóculado un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se adhiera al medio.
8. Adicionar de 5-10ml de agua glicerinada estéril en la caja Petri, teniendo cuidado de no mojar el agar.
9. Incubar la caja a 25°C durante 5-7 días.
10. Realizar observaciones mínimo cada 12 horas hasta obtener un crecimiento abundante.
11. Retirar el agua del microcultivo.
12. Adicionar 5ml de formaldehido al 10% a la caja (sin tocar el portaobjetos) durante 15min, para inactivar el hongo.
13. Desprender con cuidado el cubreobjetos que se encuentre sobre el cuadro de agar y colocarlo sobre un portaobjetos limpió que contenga una gota de azul de lactofenol.
14. Desprender con cuidado el cuadro de agar y colocar una gota de azul de lactofenol, colocar un cubreobjetos sobre el colorante.
15. Observar las preparaciones a 10x y 40x.

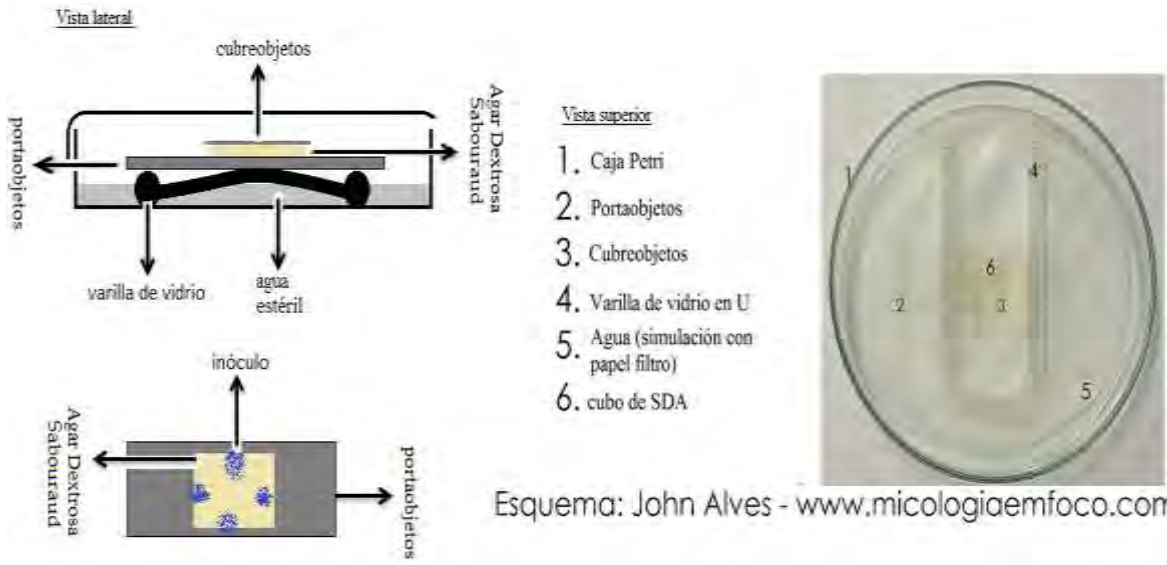


Fig. 38. Partes que conforman un microcultivo.

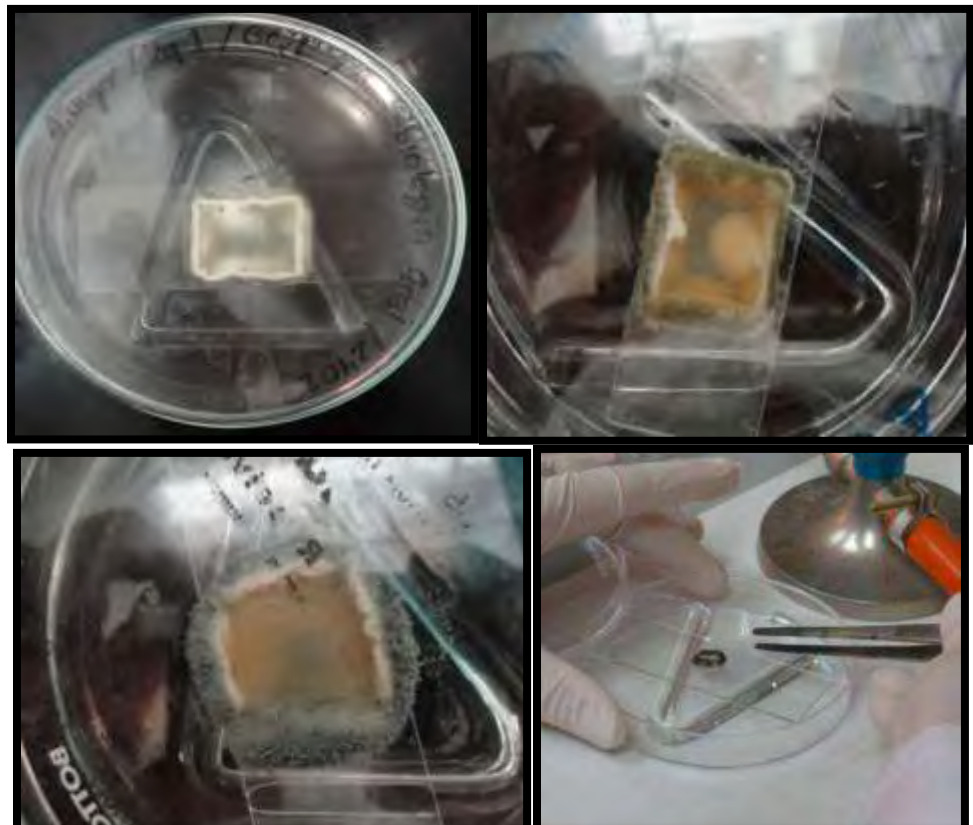


Foto. 12. Serie fotográfica de microcultivos micológicos.



Técnica de sembrado por puntos aislados para Hongos filamentosos.

- 1.- Se tiene un cultivo del hongo filamentosos ya sea en tubo o en caja. Con ayuda del asa de siembra estéril en forma de “L” se toma un inóculo ligero del hongo.
- 2.- El medio de cultivo en caja ya deberá de estar atemperado y libre de agua de condensación.
- 3.- Se siembra en “puntos aislados”; estos puntos pueden ser des uno o hasta 4. Esto se realiza haciendo contacto el asa con el medio, sin picar el agar. Colocando así el inóculo solo sobre la superficie del medio.
- 4.- Incubar a 25°C durante 3-7 días. Con revisiones diarias.

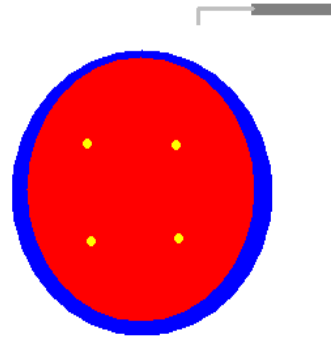


Foto 129. Cultivo en SDA de *Aspergillus niger*.



Foto 130. Cultivo en SDA de *Aspergillus flavus*.

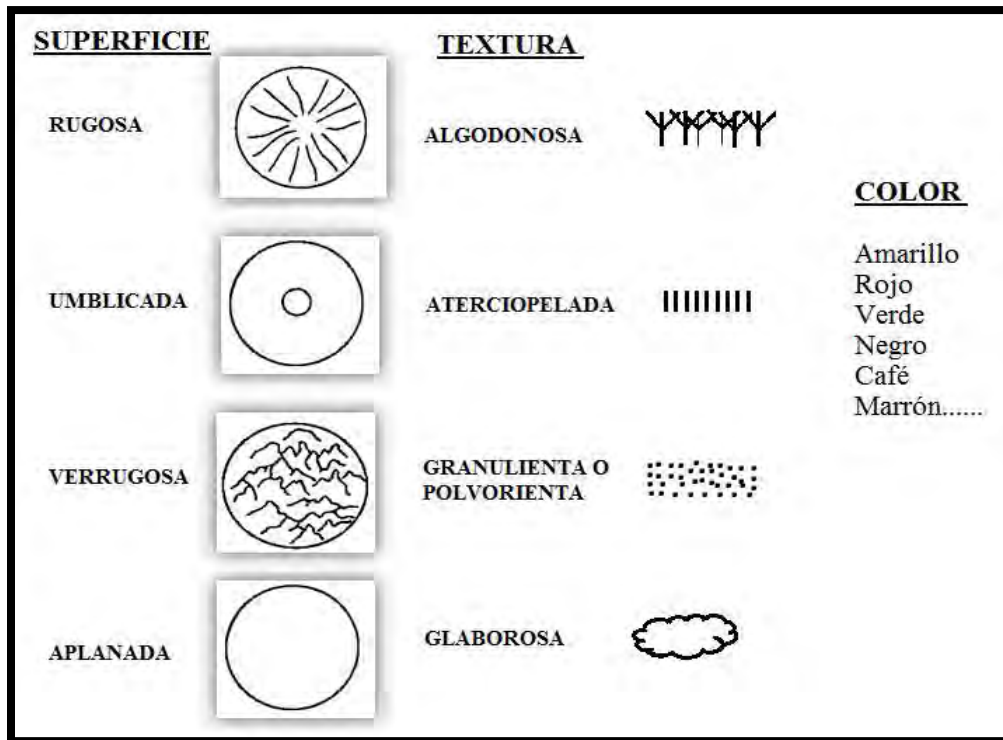
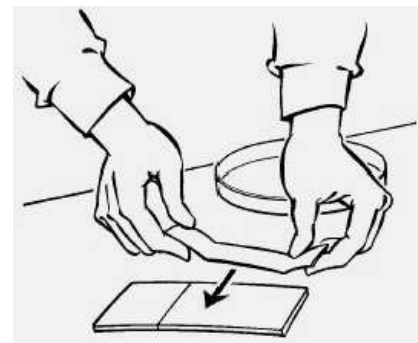


Fig. 39. Descripción morfología macroscópica de la colonia de los hongo filamentoso.

Preparación del hongo filamentoso con cinta de celofán adhesiva (diurex)

El procedimiento se lleva a cabo como sigue:

1. Al asa de siembra redonda colocarle un trozo de cinta de 1 cm de ancho por 2cm largo. Apoyar el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobrante sobre la superficie de la colonia filamentosa del hongo.
2. Colocar la cinta bien extendida sobre una gota de azul de algodón lactofenol, a su vez, sobre un portaobjetos limpio. Esterilizar el asa de siembra flameándola durante 2min en el mechero.
3. Observar al microscopio a 40x para observar estructuras del micelio reproductivo (o aéreo).



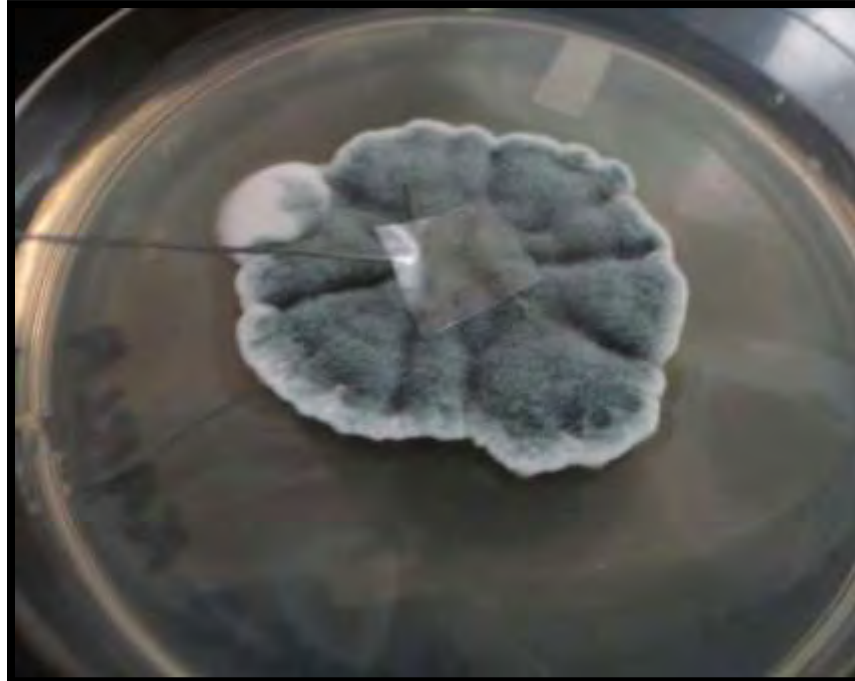
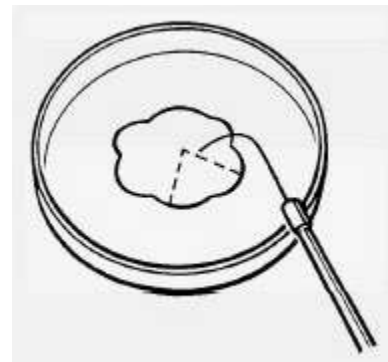


Foto 131. Toma de una muestra de hongo filamentoso para realizar una preparación con cinta de celofán adhesiva (diurex)

Preparación para realizar la tinción de Azul de Algodón Lactofenol.

Se realiza empleando el procedimiento descrito a continuación:

1. Seleccionar una colonia aislada del hongo filamentoso.
2. Calentar a la llama el asa de siembra en forma de "L".
3. Con la ayuda del asa, extraer un fragmento triangular de la colonia que contenga además un poco de agar en la parte inferior.
4. Depositar el fragmento extraído sobre un portaobjetos en el cual, previamente, se ha depositado una gota de azul de algodón lactofenol (ver anexo 10). Esterilizar el asa de siembra flameándola 2min en el mechero.
5. Cubrir con un cubreobjetos limpio y presionar suavemente para dispersar la colonia y el agar; de esta forma, la muestra está disponible para su observación al microscopio a 40x.



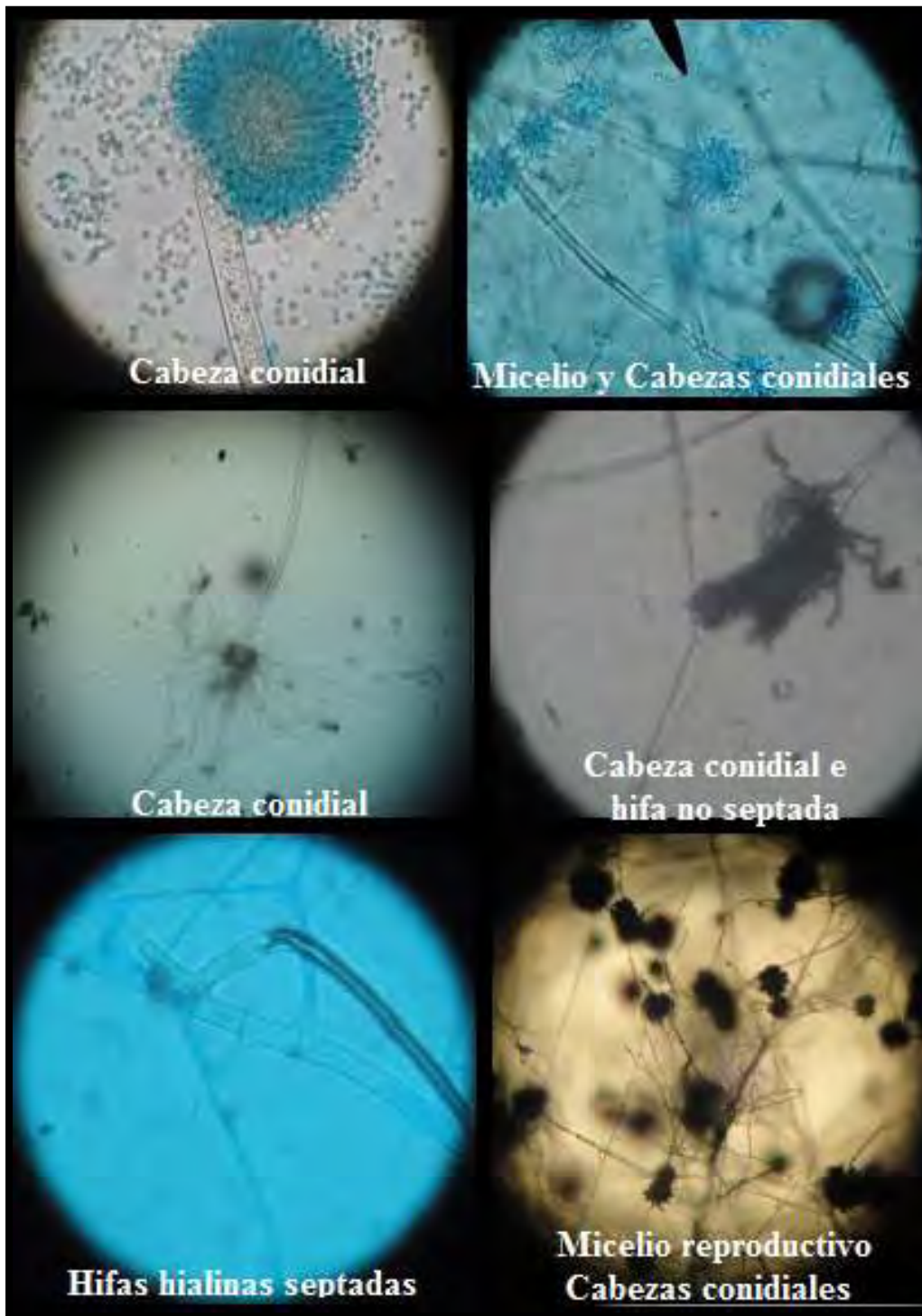


Foto 132. Serie fotográfica de Hongos filamentosos teñidos con Azul de Algodón Lactofenol: observando hongos hialinos (teñido de azul) y pigmentados (color nativo negro, café o rojizo)



Técnica de sembrado, observación y descripción morfológica de Levaduras

1. Se tiene el cultivo de donde se tomara el inóculo de levadura para realizar la siembra por dilución (Técnica Americana) en medios específicos para levaduras como es el SDA; esta misma técnica se puede utilizar cuando deseamos sembrar en medios selectivos o diferenciales como es el caso del Cromoagar Candida, Niger o Biggy.
2. Si las colonias tienen una consistencia seca o demasiado mucosa puedes realizar una suspensión en caldo nutritivo ajustada al 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland, para poder realizar mejor la dilución al sembrar.
3. Tomar el inóculo con asa de siembra redonda estéril ya sea del cultivo en caja o de la suspensión.
4. Sembrar utilizando la técnica americana para obtener colonias aisladas (ver Tema 5).
5. Incubar a 37°C (p. ej. *Candida sp.*) durante 24-48 hrs.
6. Describir la morfología colonial utilizando los mismos términos que describen una colonia bacteriana (ver tema 5).
7. La observación microscópica de las levaduras se realiza utilizando la tinción de Gram (ver Tema 6). Describiendo la forma de las blastoconidias (redonda u ovalada) y clasificándola como Gram (+) o (-) de acuerdo a su color tomado después de la tinción.



Foto 133. Morfología colonial en SDA de una levadura: *Candida albicans*.

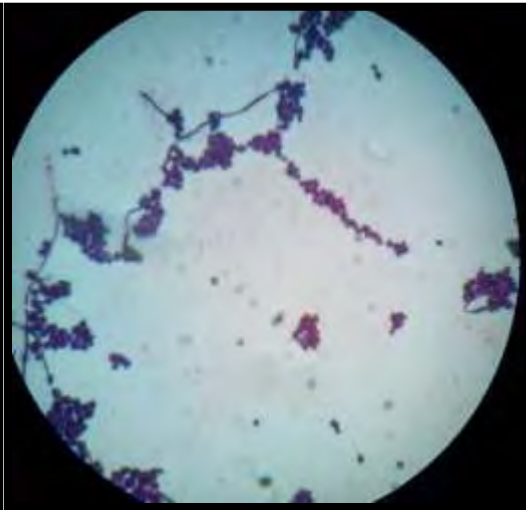
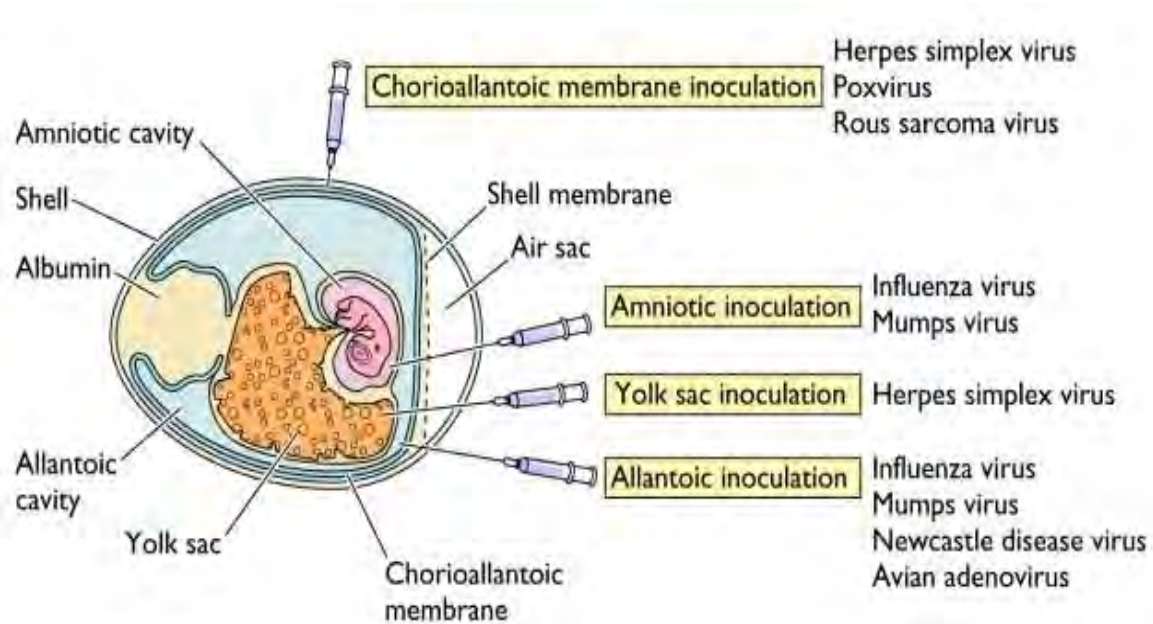


Foto 134. Tinción de Gram (40x) de una levadura: *Candida albicans*



TEMA 12

VIRUS



Adapted from F. Fenner et al., *The Biology of Animal Viruses* (Academic Press, New York, N.Y., 1974), with permission.

Los virus son partículas formados por ácido nucleíco y proteínas. Son agentes infecciosos que se caracterizan por: ser parásitos intracelulares obligados. Miden entre los 20 a 259 nanómetros (nm). Los virus tienen una estructura elemental y un mecanismo especial de replicación. Están formados por ácidos nucleícos y proteínas. Los ácidos nucleícos pueden ser ADN o ARN el cual puede estar envuelto o desnudo. Para su replicación necesitan una célula viva susceptible. Los viriones son formas extracelulares de un virus que contiene el genoma (ADN o ARN).

Los virus se clasifican en función de varios criterios. Una forma es con base en su ácido nucleíco: virus de DNA y virus con RNA, de cadena sencilla o doble, única o segmentada, positiva o negativa. Un segundo aspecto es la forma de la cápside, de acuerdo con la cual se conocen como virus icosaédricos y virus helicoidales.

Su replicación se conoce con este nombre a la penetración de un virus a una célula, formación de nuevos virus dentro de ésta y la eventual salida de estos para infectar nuevas células. Cumpliéndose los siguientes pasos: Absorción, penetración, periodo de latencia, maduración y síntesis.



Para poder estudiar un virus en un paciente, será necesario obtenerlo del producto biológico relacionado con el sitio donde se pueda encontrar. El principio del estudio de los virus será, por consiguiente, la toma del biológico para tratar de observar el virus, pero esto solo será posible si el producto obtenido contiene células. Uno de los recursos para estudiar los virus es su cultivo. Pero los virus no se cultivan artificialmente como las bacterias; sólo lo hacen en tejidos vivos, por lo que los métodos utilizados son embriones de pollo o líneas celulares.

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, primarios o secundarios.

La introducción del embrión de pollo como sistemas de cultivo y aislamiento para virus, resultó un avance significativo sobre el uso de animales que era el único sistema disponible.

Las membranas embriónicas:

- Saco vitelino con su endotelio vascular, por lo cual se nutre el embrión. Sus funciones son la formación de sangre, absorción de material nutritivo de la yema y transporte de nutrientes al embrión.
- Saco amniótico se forma junto con el corion y envuelve el embrión. Este saco membranoso y transparente se llena de un líquido incoloro, el líquido amniótico.
- La membrana corioalantoidea envuelve todo el ambiente intraembrionario.
- La cavidad alantoidea está llena de líquido alantoideo que aumenta de volumen de 1 ml 7° día a un máximo de 4-10 ml en el día 13° día.

Cuidados del huevo embrionado

Se deben utilizar incubados con temperatura óptima de 37°C, con humedad relativamente de 60%. Es mejor mantenerlos con la concentración de oxígeno normal del aire (2%) y se deben mover los huevos por lo menos dos veces diarias. Los huevos se colocan con la parte más ancha hacia arriba, en el extremo por donde nacen los polluelos y por el que se hacen la mayoría de las inoculaciones. Los huevos fecundados se incuban hasta el momento de su inoculación que suelen oscilar entre 6 y 14 días.



Efectos provocados en el embrión de pollo por algunos virus:

- Muerte embrionaria.
- Pústulas en la membrana.
- Hemorragias.
- Enanismo del embrión.

Ventajas:

- Se pueden adquirir con facilidad.
- Costo accesible.
- Tamaño adecuado.
- No se forman anticuerpos contra el virus inyectado porque carecen de respuesta inmune.

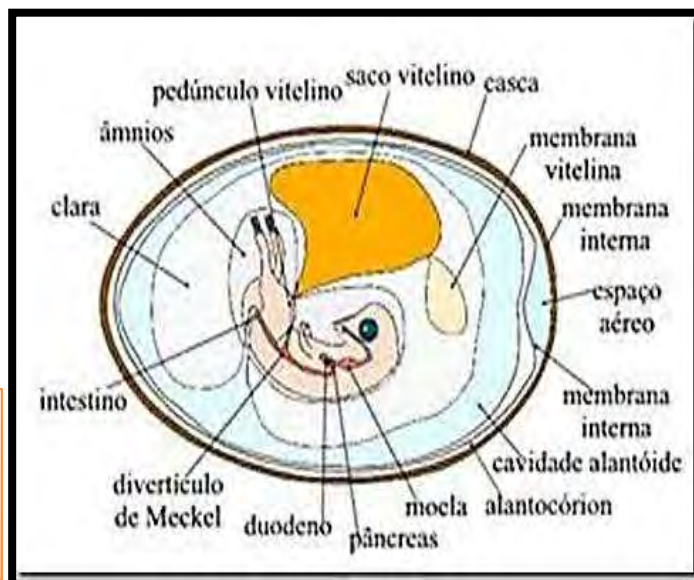


Fig. 40.
Partes de un huevo embrionado.



Foto 135. Embrión de pollo de 10 días.



Técnica de inoculación en Saco vitelino

1. Localizar la cámara de aire, verificar la viabilidad del embrión y marcando su posición, así como también marcar la cámara de aire.
1. Desinfectar con alcohol o otro antiséptico la parte de la cámara de aire.
2. Perforar con una lanceta en la cámara de aire, lado opuesto al embrión.
3. Con ayuda de una jeringa de tuberculina provista de aguja no. 26 de ½", se cargara 0.2 ml de inoculo.
4. Introducir la jeringa hasta $\frac{3}{4}$ de longitud del huevo por el orificio creado.
5. Inocular lentamente
6. Retirar la jeringa y cerrar el orificio con esmalte de uñas.

NOTA: si se trabaja con un virus

7. Incubar a 36°C por 48hrs. en condiciones de humedad.
8. Sacar los huevos de la incubadora, y llevarlos al refrigerador durante 30min para inactivación del virus.

Apertura del huevo embrionado

1. Quebrar el cascarón de la cámara de aire con ayuda de unas pinzas de disección golpeándola suavemente; con ayuda de estas mismas eliminar el cascarón de esta zona. Esto realizarlo en condiciones de esterilidad.
2. Con las mismas pinzas estériles, romper la membrana del cascaron
3. Tratar de retirar con ayuda de las pinzas y tijeras, el contenido del cascaron en una placa Petri estéril.

NOTA: En clase se inoculara un colorante (ejemplo: cristal violeta) en lugar de un virus y posteriormente se obtendrá el embrión en una caja Petri, después de quebrar el cascarón, con el objeto de observar el saco vitelino teñido. El colorante no debe aparecer en ningún otro lugar.

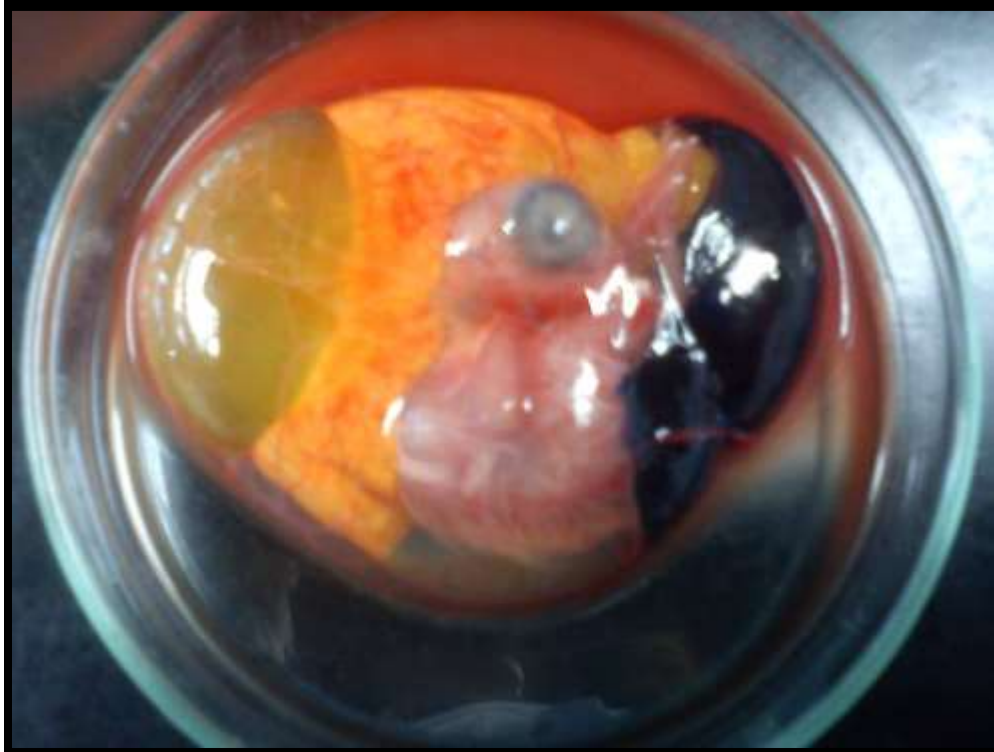
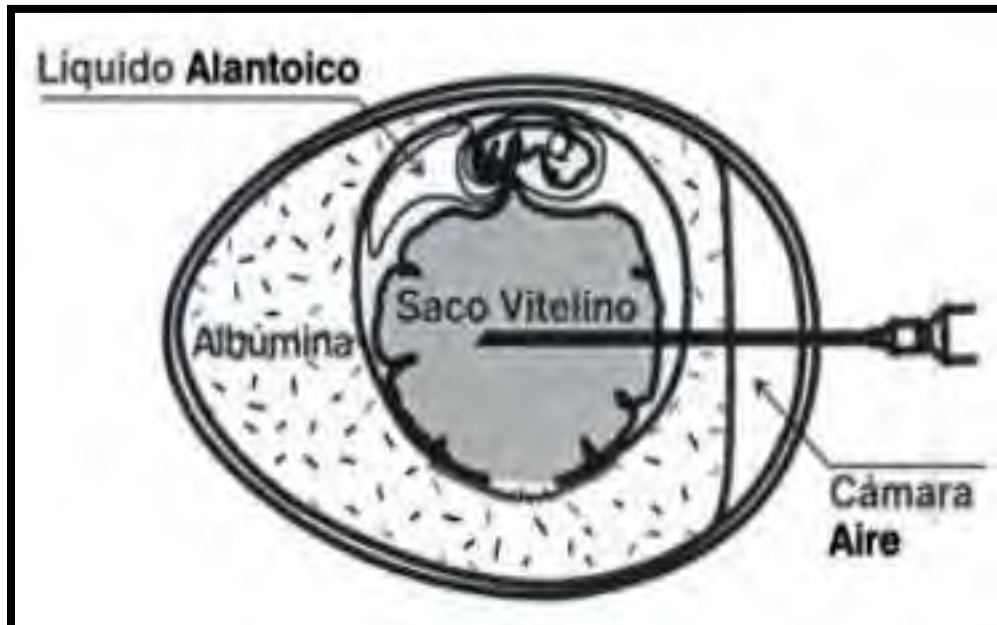


Foto 136. Vía de inoculación por Saco vitelino. Teñido con cristal violeta



Técnica de inoculación en Membrana corioalantoidea

1. Verificar la viabilidad del embrión y marcando su posición, así como también marcar la cámara de aire.
2. Perforar con una lanceta el centro de la cámara de aire.
3. Colocar el huevo horizontalmente y darle vuelta para localizar la zona contraria al embrión (de modo que el embrión quede en la parte inferior).
4. Con ayuda de la lanceta perforar por arriba de la posición del embrión evitando causar hemorragias.
5. Ejercer succión con ayuda de una pera (propipeta) pegada al orificio creado en la cámara de aire para desaparecer está. Con esto se produce la caída de la membrana corioalantoidea formando una cámara artificial donde se encuentra el segundo orificio.
6. Con ayuda de una jeringa de tuberculina provista de aguja no. 26 de ½", se cargara 0.2 ml de inóculo.
7. Inocular lentamente. Introduciendo solo medio centímetro de la aguja.

NOTA: si se trabaja con un virus

8. Retirar la jeringa y propipeta, cerrar los orificios con esmalte de uñas.
9. Incubar los huevos en forma horizontal en la incubadora a 36°C por 4-5 días.
10. Sacar los huevos de la incubadora, y llevarlos al refrigerador durante 30min. Para la inactivación del virus.

Apertura del huevo

1. Quebrar el cascarón de la cámara de aire con ayuda de unas pinzas de disección golpeándola suavemente; con ayuda de estas mismas eliminar el cascarón de esta zona. Esto realizarlo en condiciones de esterilidad.
2. Con las mismas pinzas estériles, romper la membrana del cascarón y corioalantoidea.
3. Ahora, tratar de tirar con ayuda de las pinzas y tijeras el embrión de pollo, para depositarlo en una placa Petri.
4. Observa el los efectos producidos sobre la membrana corioalantoidea que se queda unida al cascarón

NOTA: En clase se inoculara un colorante en lugar de utilizar un virus y posteriormente obtendrá el embrión después de quebrar el cascaron, con el objeto observarla cámara corioalantoidea teñida.

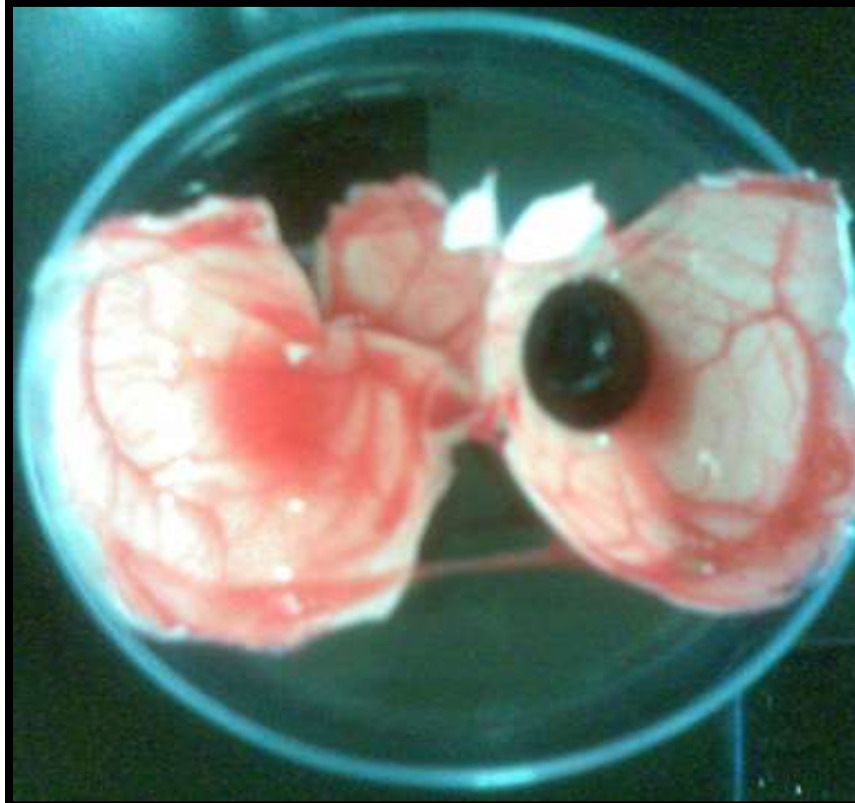
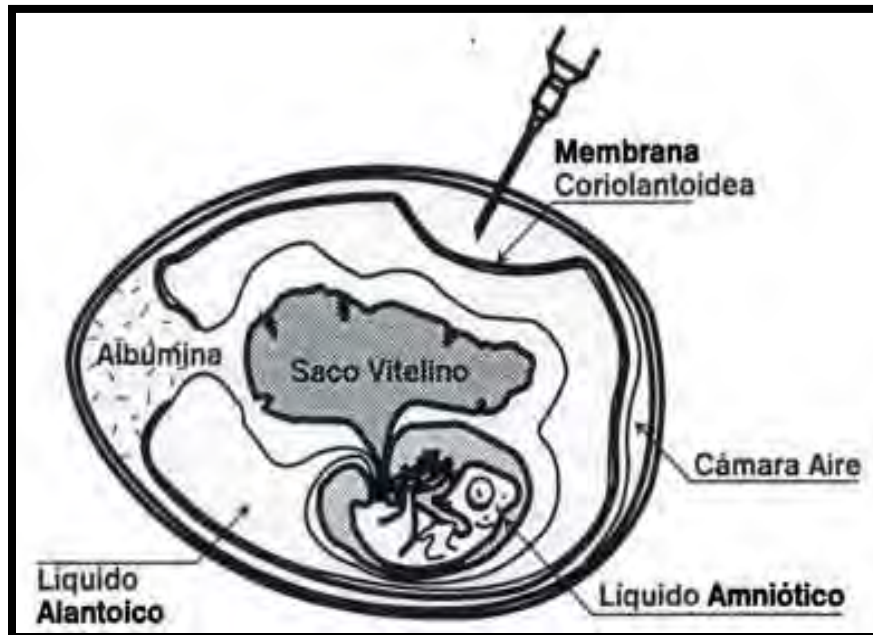


Foto 137. Inoculación en membrana Corioalantoidea. Teñida con cristal violeta.



Técnica de inoculación en Cavidad alantoidea

1. Localizar la cámara de aire y verificar la viabilidad del embrión y marcar su posición.
2. Desinfectar con alcohol u otro antiséptico la parte de la cámara de aire.
3. Colocar el huevo en posición vertical con la cámara de aire hacia arriba.
4. Perforar con una lanceta el centro de la cámara de aire.
5. Con ayuda de una jeringa de tuberculina provista de aguja no. 26 de ½", se cargara 0.2 ml de inóculo.
6. Introducir la jeringa por el orificio formado, introducir la mitad de la aguja formando un ángulo de 45° hacia el borde de la cámara de aire (donde termina la cámara de aire, extremo contrario al embrión de pollo).
7. Inocular lentamente, es decir, descargar la jeringa lentamente.
8. Retirar la jeringa y cerrar el agujero con esmalte de uñas.

NOTA: si se trabaja con un virus

9. Incubar a 36°C por 48hrs. con humedad.
10. Sacar los huevos de la incubadora, y llevarlos al refrigerador durante 30min. para provocar la muerte del embrión.

Cosecha del líquido de alantoideo

1. Quebrar el cascarón de la cámara de aire con ayuda de unas pinzas de disección golpeándola suavemente; con ayuda de estas mismas eliminar el cascarón de esta zona. Esto realizarlo en condiciones de esterilidad.
2. Con las mismas pinzas estériles, romper la membrana del cascarón
3. Con una jeringa de 5ml estéril cargar el líquido contenido en esta cavidad. Tener cuidado de no regar el líquido amniótico. Colocarlo en un tubo estéril y refrigerarlo hasta su posterior uso.

NOTA: En clase se inoculara un colorante en lugar de un virus. Se obtendrá el embrión tratando de no romper alguna cavidad, con el objetivo de ver la cavidad alantoidea teñida.

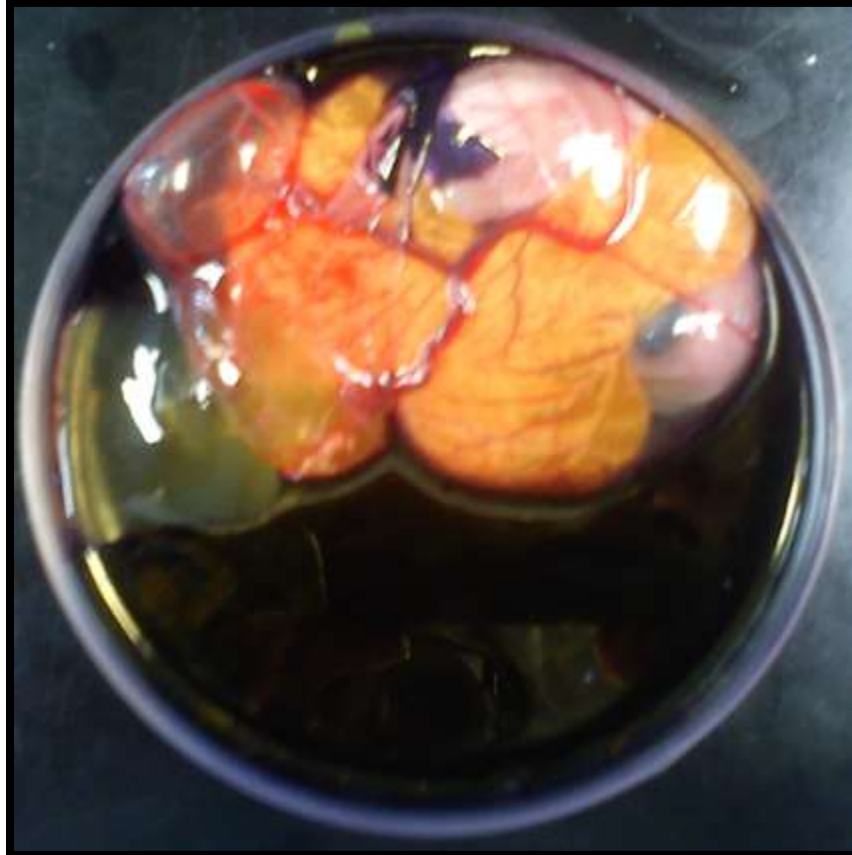
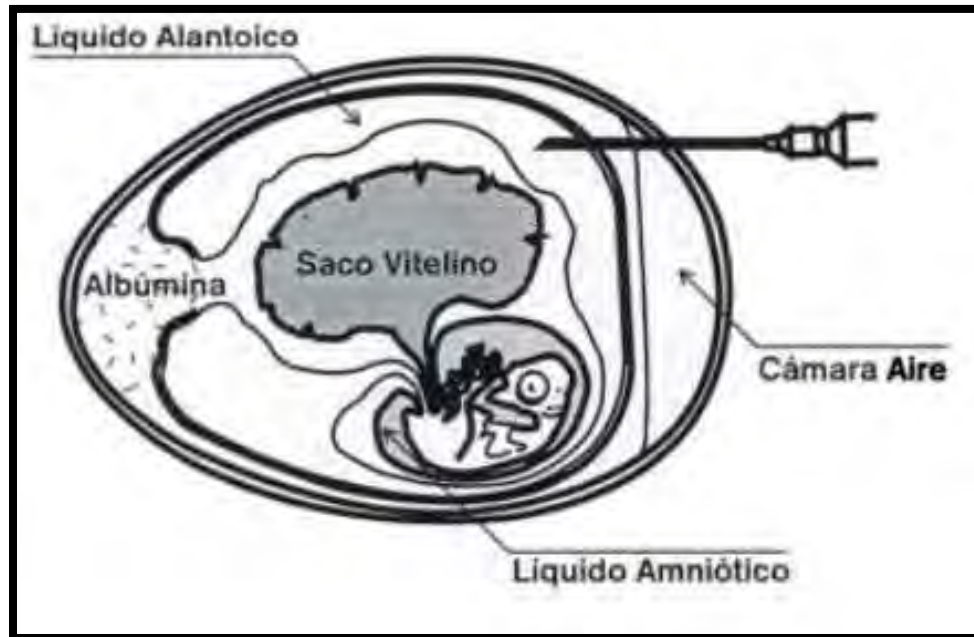


Foto 138. Inoculación en Cavidad alantoidea. Líquido alantoideo teñido con cristal violeta.



Técnica de inoculación en Líquido amniótico

1. Localizar la cámara de aire y verificar la viabilidad del embrión y marcar suposición.
2. Desinfectar con alcohol u otro antiséptico la parte de la cámara de aire.
3. Perforar con una lanceta el centro de la cámara de aire.
4. Con ayuda de una jeringa de tuberculina provista de aguja No. 26 de ½", se cargara 0.2 ml de inoculo.
5. Introducir la jeringa por el orificio creado hasta llegar al embrión. Al llegar a está zona (cavidad amniótica).
6. Inocular lentamente.
7. Retirar la jeringa y cerrar el orificio con esmalte de uñas.

NOTA: si se trabaja con un virus

8. Incubar a 36°C con humedad por 48hrs.
9. Sacar los huevos de la incubadora, y llevarlos al refrigerador durante 30min. Para la inactivación del virus.

Cosecha del líquido amniótico

1. Quebrar el cascarón de la cámara de aire con ayuda de unas pinzas de disección golpeándola suavemente; con ayuda de estas mismas eliminar el cascarón de esta zona. Esto realizarlo en condiciones de esterilidad.
2. Tratar de tirar con ayuda de las pinzas y tijeras el embrión de pollo, para depositarlo estérilmente en una placa Petri.
3. Con una jeringa de 5 ml estéril cargar el líquido contenido en cavidad alantoidea. Tener cuidado de no romper la cavidad amniótica y regar el líquido amniótico.
4. Una vez recogido todo el líquido alantoideo, con otra jeringa estéril punzar el embrión que se tiene a la vista y retirar el líquido de la cavidad amniótica, este debe de ser transparente. Colocarlo en un tubo estéril y congelarlo a hasta su posterior uso.

NOTA: En clase se inoculara un colorante en lugar de un virus. Se obtendrá el embrión tratando de no romper alguna cavidad, con el objetivo de observarla cavidad amniótica teñida.

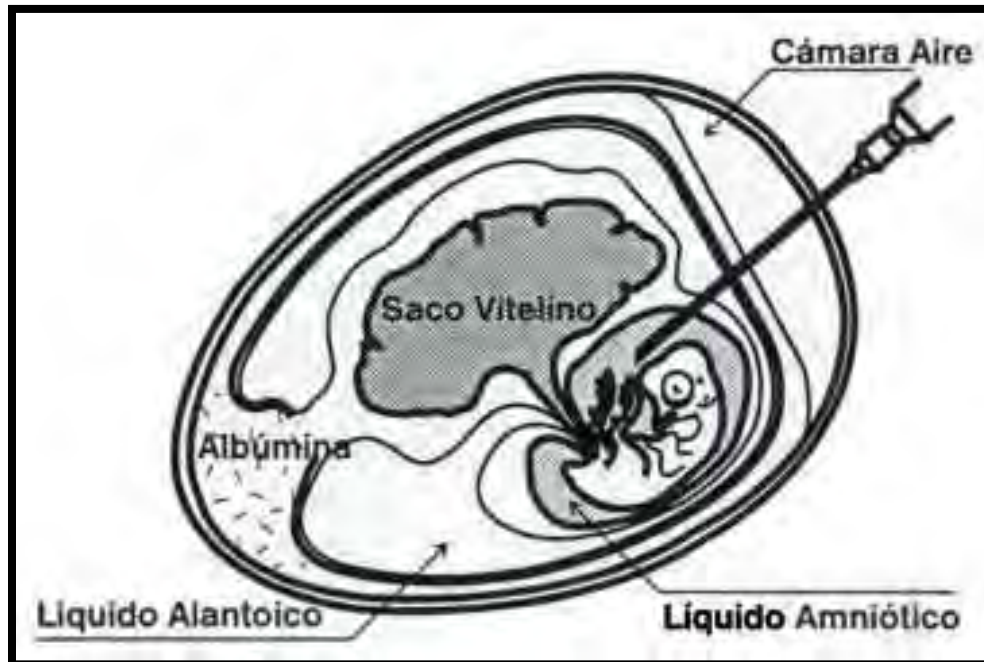


Foto 139. Inoculación en cavidad amniótica. Líquido amniótico teñido con cristal violeta.



CONCLUSIONES

- Se comprendió que esta guía es un documento que orienta y dirige al consultor a un estudio introductorio de los diferentes microorganismos. Al no ser un manual de Microbiología General no cuenta con un apartado para que el lector plasme alguna información obtenida durante la reproducción de algún método o técnica.
- La “Guía Práctica de Microbiología General”, servirá como material de apoyo ya que contiene información, técnicas y métodos actualizados y resultados fotográficos confiables, los cuales le facilitaran al estudiante adquirir los conocimientos necesarios para interpretar y solucionar problemas que puedan surgir en la práctica microbiológica laboral.
- Se logro realizar una búsqueda amplia de la información literaria y digital de los temas que comprenden esta guía, logrando tomar las mejores referencias, técnicas y métodos utilizados actualmente en el estudio de los diferentes microorganismos; determinando que el Internet es una fuente de información primaria y muy consultada por estudiantes o profesionales, en algunos casos no es de gran utilidad ya que contiene excesiva información no concreta.
- Se logro ajustar algunas de las técnicas y métodos empleados en las actividades experimentales a las condiciones, material, equipo y tiempo requerido en el laboratorio de Microbiología de FES Cuautitlán.
- Se logro obtener los mejores resultados durante la reproducción de las técnicas y los métodos de estudio microbiológico ya implementadas en el área, así como las innovadas. Con la observación de las fotografías obtenidas lograremos que el consultor observe mas fácilmente los resultados que probablemente obtendrá al reproducir las técnicas o métodos que en esta guía se plantean.
- La introducción al tema, diagramas de flujo, descripciones detalladas del procedimiento y figuras ilustrativas; de las técnicas y métodos de esta guía afianzaran conocimientos, desarrollaran y fortalecerán habilidades y/o destrezas para introducirse al estudio de los diferentes microorganismos.
- La Guía Práctica de Microbiología General tiene la flexibilidad de ser mejorada con la experiencia y conocimientos de los BQD's, QFB's y Lic. en Farmacia, para adecuarla a las necesidades del Área en la cual se implementara.



SUGERENCIAS

Durante la reproducción de las técnicas y de los métodos que conforman esta guía, se detectó una deficiencia en material, reactivos, equipos que imposibilitaron la actualización o cambio de algunas técnicas o métodos. Por lo que se sugiere más apoyo en el presupuesto de esta área, ya que la tecnología en el estudio de los diferentes microorganismos se encuentra más avanzada y automatizada.

El material necesario para innovar las prácticas experimentales en el área de la microbiología requiere mayor inversión económica ya que su costo es elevado; por lo que se recomienda hacer partícipes a los alumnos en la adquisición del material, de igual forma aceptando donaciones de instituciones.

Al no contar con el material necesario para realizar alguna de las técnicas o métodos aquí mostrados, el académico tiene la habilidad para realizar una clase demostrativa virtual, ya que las imágenes aquí mostradas pueden servir para que el alumno visualice los resultados esperados al reproducir cada uno de estas técnicas o métodos.

Se buscare con el tiempo que este material didáctico se pueda publicar; teniendo un acceso libre y de bajo costo para los consultores; ya que con este material en sus manos y con una calidad de impresión a color observarían mejor cada una de las imágenes aquí mostradas y sería práctico para la consulta cada una de las técnicas o métodos aquí descritos.



“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo.”

Benjamín Franklin



No es suficiente el enseñar porque todo está escrito en libros, artículos y más; lo importante es aprender; involucrarnos en las técnicas y métodos que nos enseñan. Escuchando los consejos de las personas que nos dedican parte de su tiempo para compartirnos sus conocimientos y nosotros dedicando tiempo a la investigación para ampliar el panorama de conocimiento.

La realización de esta esta guía no busca que te conviertas en una persona reproductora de recetas si no que te conviertas en una persona que analice lo que sucede en cada actividad realizada, ya que en la vida laboral se tendrán que tomar decisiones que nuestra formación profesional como QFB, BQD o Lic. Farmacia nos ayudara a que sean las mejores.





ANEXOS



ANEXO 1. FORMA DE UTILIZAR EL AUTOCLAVE

Procedimiento para utilización de la autoclave.

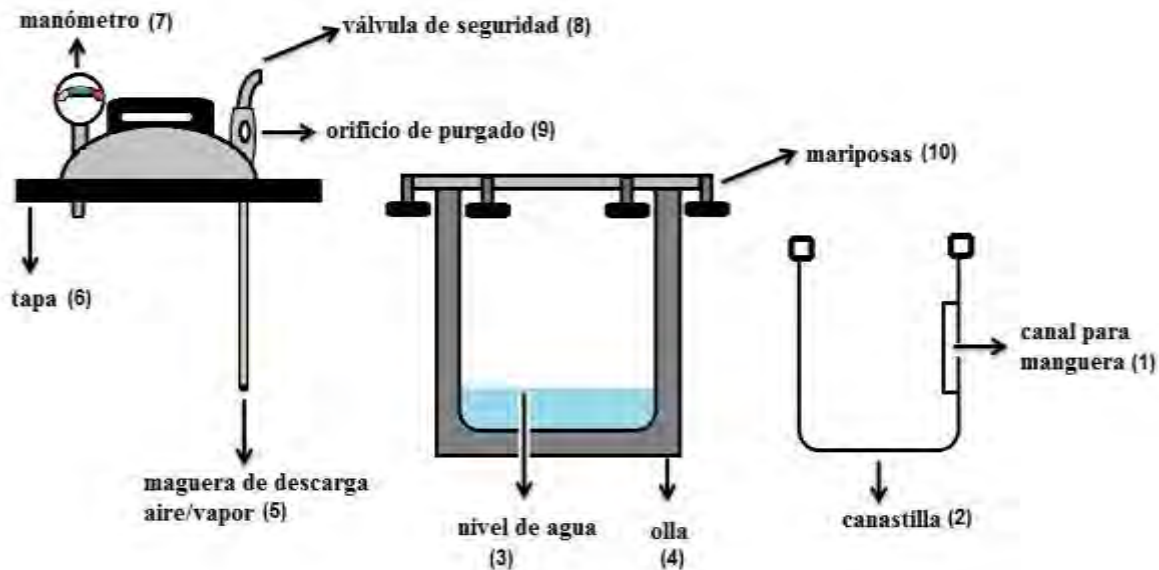


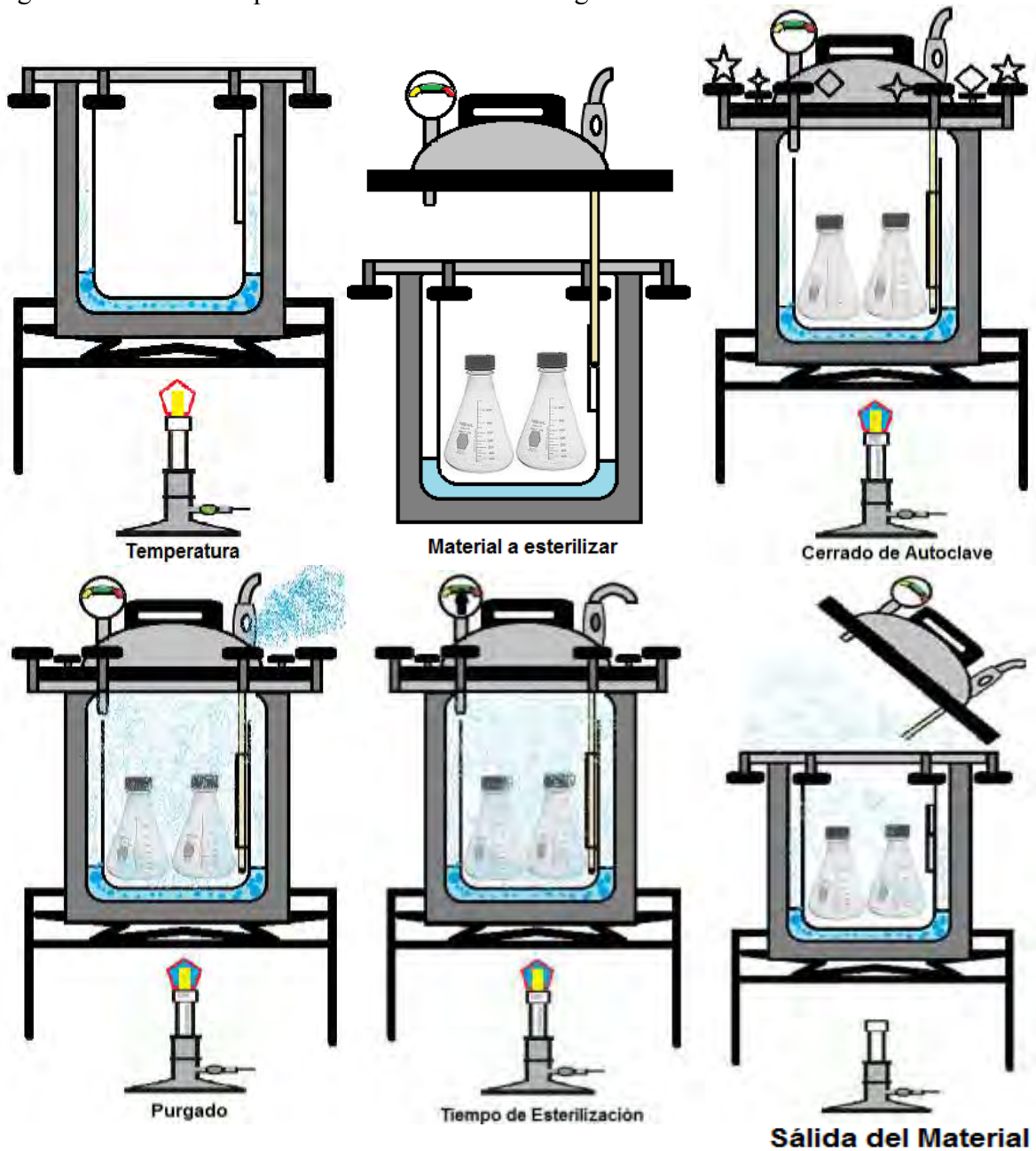
Fig. 41. Partes de una autoclave de gas

- A. **Nivel de agua:** Revisar el nivel de agua conocido por la marca (3) en la autoclave o a nivel de la parrilla si la contiene. En caso de ser necesario agregar agua destilada.
- B. **Temperatura:** Si la autoclave es de gas, encender el mechero de bunsen en su alto nivel de flama. Si la autoclave es eléctrica conectar y colocar la perilla de control en calentamiento alto. Esperar a que comience la ebullición.
- C. **Material a esterilizar:** Introducir medios de cultivo y/o materiales a esterilizar en la canastilla (2), colocar está dentro de la olla (4).
- D. **Cerrado de Autoclave:** Colocar la manguera de descarga aire/vapor (5) en el canal (1) para esta manguera que se encuentra en la canastilla (2). Antes de colocar correctamente la tapa (6). Nivelar la tapa para evitar fugas de vapor. Y proceder a subir las mariposas (10) para comenzar el cierre de la autoclave. Apretar las mariposas de dos en dos en posición encontrada.
- E. **Purgado:** Esperar a que salga el vapor de agua por el orificio de purgado (9), siendo este continuo espere 2 minutos, cierre el orificio de purgado con la válvula de seguridad (8).
- F. **Tiempo de Esterilización:** Dejar que el equipo se caliente hasta alcanzar las condiciones deseadas de esterilización (p.ej.121°C/15lb) revisando continuamente la escala del manómetro (7). Una vez alcanzada la temperatura deberá bajarse el nivel de calentamiento, si es eléctrica la autoclave se moverá la perilla de control al nivel medio o bajo; si es de gas se bajara la intensidad de la flama. De modo que se mantenga la temperatura constante. Mantener el equipo a la temperatura deseada durante el tiempo deseado (p. ej. 15 min. o 10 min.).
- G. **Salida del material:** Apagar la autoclave una vez transcurrido el tiempo deseado y dejar que la presión y temperatura baje al valor "0". Abrir la válvula de seguridad (8) y



con ayuda de guantes de asbesto o una jerga húmeda procedes a aflojar y retirar las mariposas (10). Cuidadosamente retirar la tapa (6) de atrás hacia adelante para evitar quemaduras por la salida de vapor. Puedes retirar la canastilla (2) o únicamente el material esterilizado.

Fig.42. Procedimiento para utilizar la autoclave de gas.





ANEXO 2. PREPARACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE MATERIAL PARA SU ESTERILIZACIÓN.

Fig. 43 Preparación de una caja Petri para esterilización

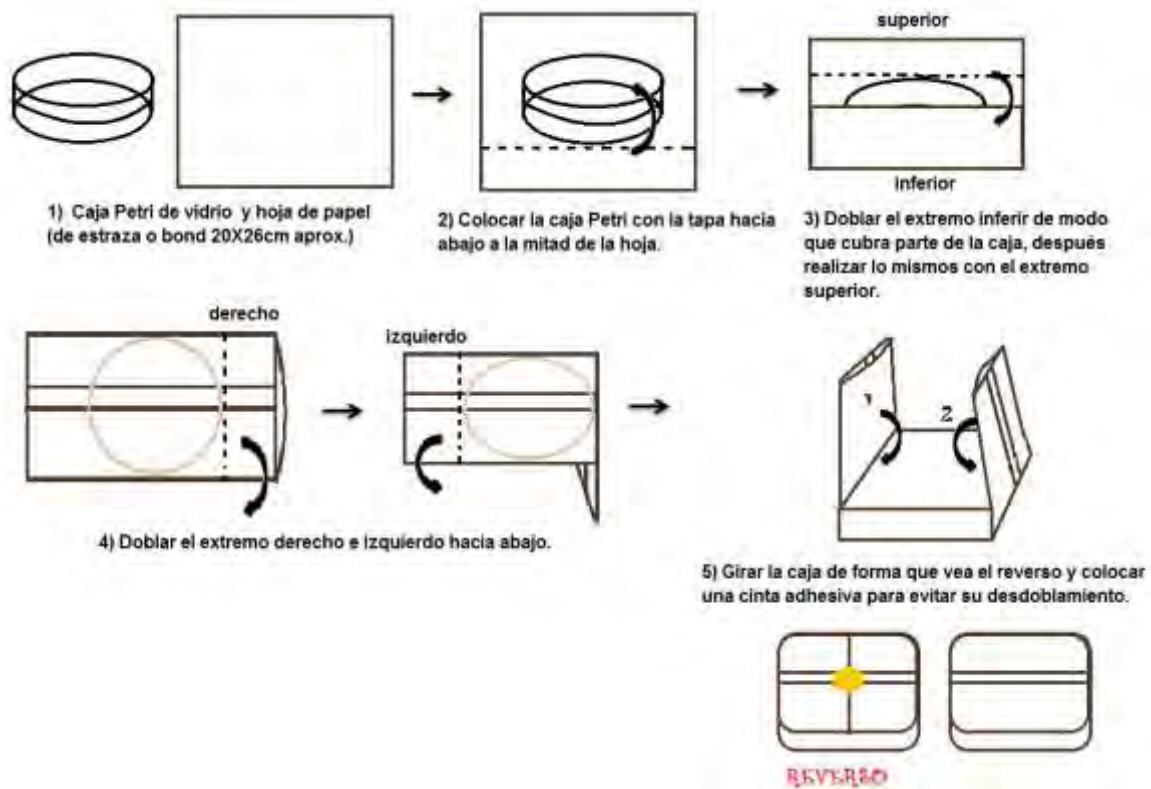


Fig. 44 Preparación de una pipeta para esterilización





Fig. 45. Elaboración de un hisopo.

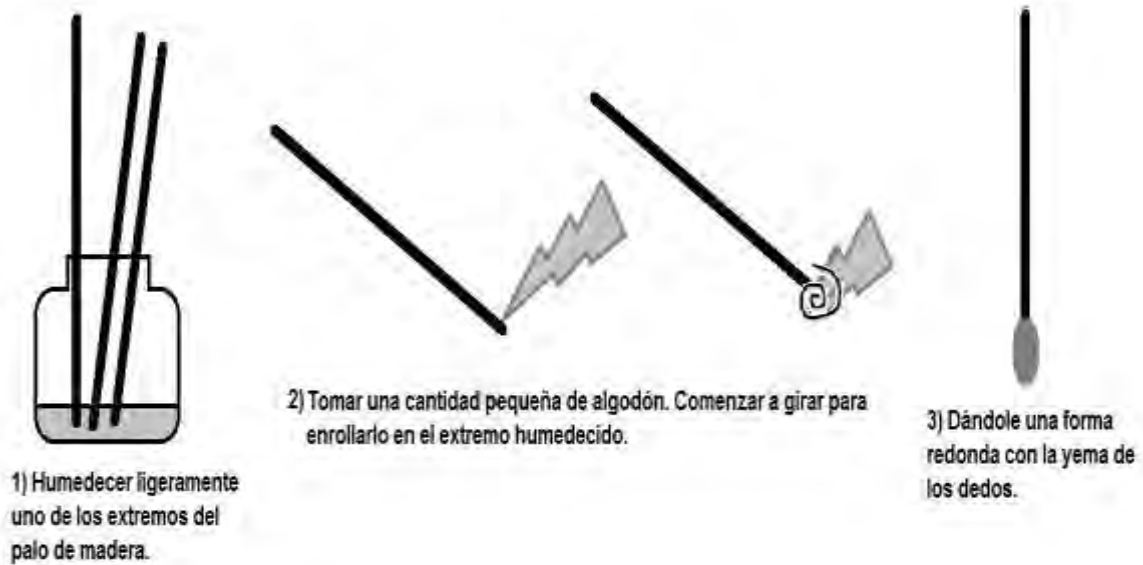


Fig. 46. Preparación de par de hisopos de madera/algodón para esterilización.

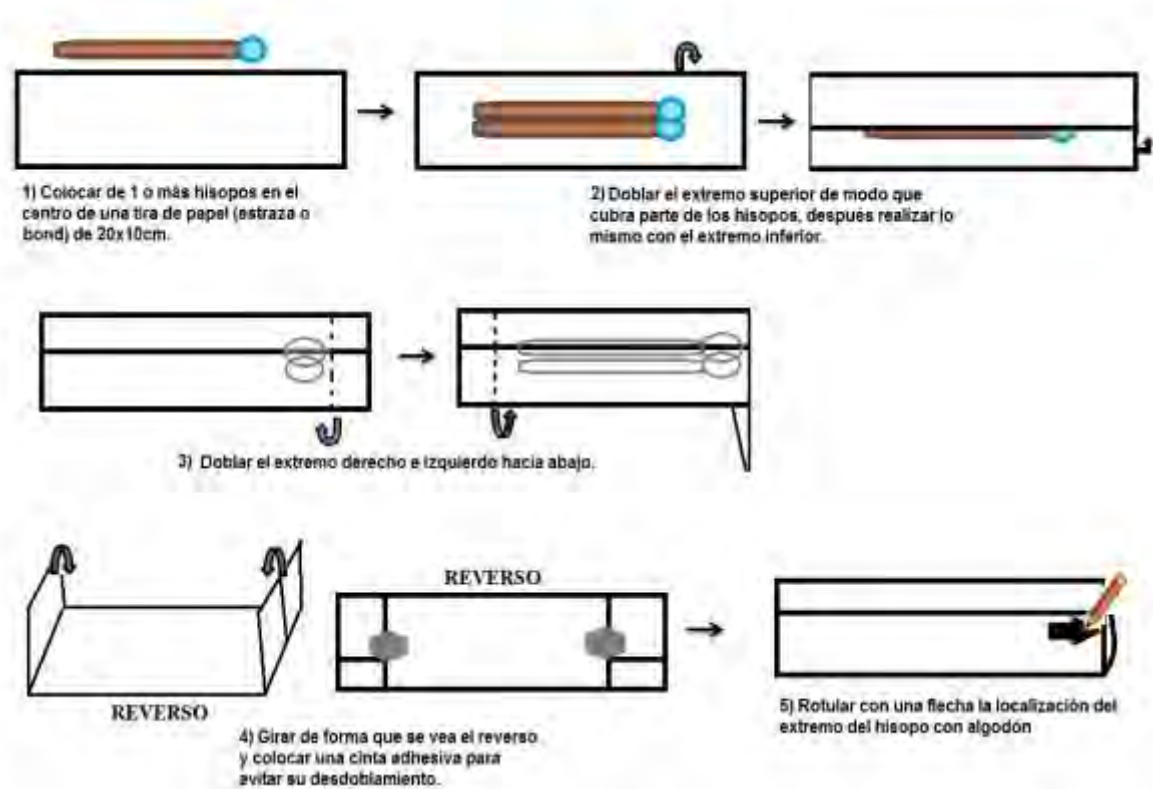




Fig. 47. Elaboración de capuchón para matraz.

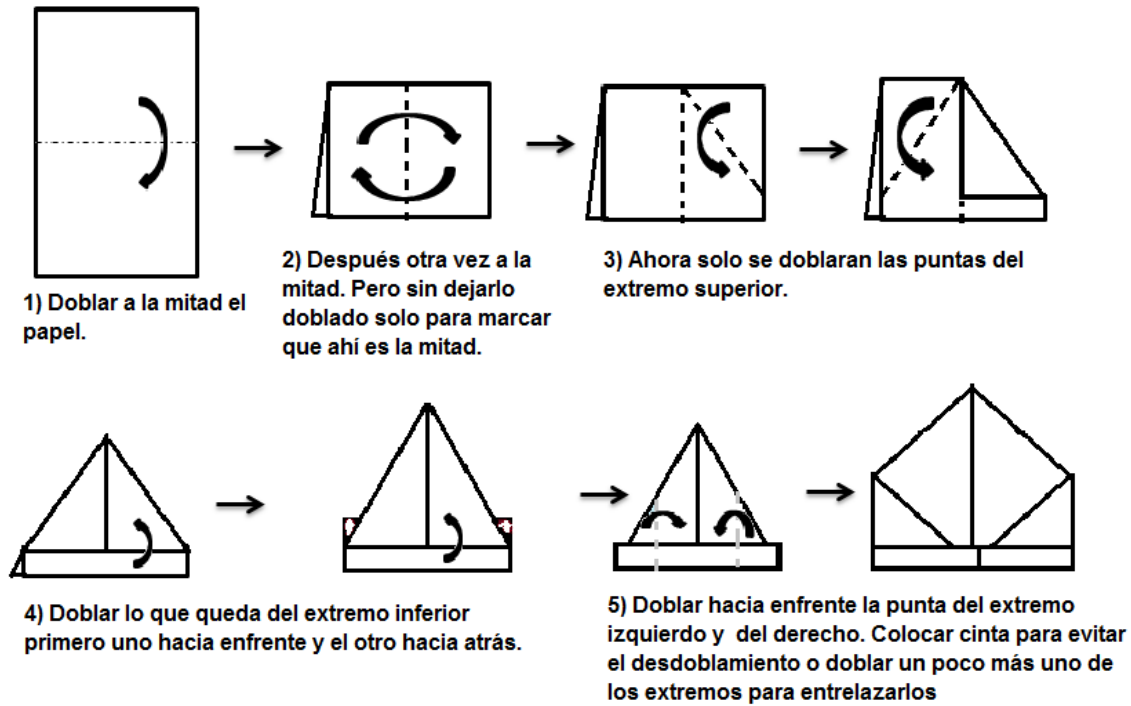


Fig. 48. Elaboración de tapón de algodón para matraz o tubo.





ANEXO 3. CÁLCULO DEL MIC DEL DESINFECTANTE COMERCIAL

El marbete del desinfectante ANTIBENZIL ® Menciona que la solución concentrada contiene por cada 100 ml.: cloruro de benzalconio 1.0 g. nitrito de sodio 0.5 g. vehiculo c.b.p. El agente desinfectante es el cloruro de benzalconio por lo que su concentración es la de importancia; en el caso del nitrito de sodio forma parte de la solución y su importancia radica en prevenir la aparición de óxido de fierro en superficies de metal.

Por lo que en nuestra serie de diluciones en tubo quedarían con las siguientes concentraciones (fila de color azul):

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Dilución	Concentrado	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentración	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625
Tubo	8	9	10	11	12	13	
Dilución	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	
Concentración	0.07812	0.03906	0.01953	0.00651	0.00325	0.00163	

En la Foto 21 podemos observar que nuestra concentración mínima inhibitoria se encuentra en el tubo numero 9, correspondiente al cuadrante 9 del medio de cultivo SDA (foto 21B). La cual se comprobó al sembrar en este medio ya que el color propio del desinfectante y el efecto espumante de este, impidió observar la MIC en los tubos. Concentración correspondiente al tubo nueve es de 0.03906 mg/ml de cloruro de benzalconio.

Por lo que podemos concluir que la menor concentración de cloruro de benzalconio a la que es capaz de inhibir el desarrollo de *Candida albicanses* de 0.03906 mg/ml.



ANEXO 4. MEDIOS DE CULTIVO.

Medio Cooked Meat

Medio Cooked Meat proporciona un entorno favorable para el crecimiento de anaerobios dado que la proteína muscular en los gránulos del tejido cardíaco constituye una fuente de aminoácidos y otros nutrientes. El tejido muscular también proporciona reducción de sustancias, en especial la glutianona. Los grupos sulfhídrico, que ejercen un efecto de reducción, están más disponibles en la proteína desnaturalizada; por consiguiente, las partículas de carne se cocinan para uso en el medio. El crecimiento se indica mediante turbidez y, en el caso de algunos organismos, con la presencia de burbujas de gas en el medio. La fórmula de BBL, el contenido de corazón de res se expresa como el peso de los gránulos secos de tejido cardíaco. La desintegración y oscurecimiento de las partículas de carne indican proteólisis. Deben realizarse tinción de Gram o tinción de esporas para determinar la forma y ubicación de las esporas.

Fórmula aproximada por litro de agua destilada

Gránulos de tejido cardíaco	98.0 g
Digerido péptico de tejido animal	20.0 g
Dextrosa	2.0 g
Cloruro sódico	5.0 g

Técnica de inoculación para la proliferación de anaerobios que se encuentran en la tierra:

1. Se necesita un tubo con medio Cooked Meat estéril.
2. Se localiza la zona donde se va a tomar la muestra de tierra. Con ayuda de una espátula se realizar un agujero de unos 15 a 20 cm de profundidad.
3. Se destapa rápidamente el tubo y con ayuda de espátula se procede a agregar aproximadamente 2 cm de tierra (medida con relación al tamaño del tubo). Se cierra perfectamente el tubo.
4. En un contenedor con agua colocar el tubo o los tubos de forma vertical con las tapas flojas, para dar mejores condiciones anaerobias se dejan hervir durante 10 min. Enfriar.
5. Incubar a temperatura ambiente. Se requiere que las bacterias estén en la etapa de esporulación se deja aproximadamente de 8 a 15 días.
6. Observar el crecimiento (turbidez) en medio de cultivo y apariencia los pellet de carne.
7. Al abrir el tubo realizarlo en dirección contraria a la posición de quien manipula para dejar escapar el gas.
8. Realizar tinción de esporas o Gram para determinar la forma y ubicación de las esporas.



Foto 140. Inoculación e Incubación de medio de cultivo Cooked meat.



AGAR DE SAL Y MANITOL

USO

Medio selectivo empleado para aislamiento de estafilococos a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

La degradación del manitol con producción de ácido cambia el color del medio, de rosado a amarillo. La formación de colonias de estafilococos no patógenos son de tamaño pequeño rodeadas de una zona roja. Los estafilococos patógenos producen ácido del manitol, desarrollan colonias más grandes rodeadas de una zona amarilla. Si se agrega a cada litro de medio, una yema de huevo en condiciones de esterilidad, los estafilococos, que además de fermentar el manitol producen lipasa, darán un precipitado amarillento de ácidos grasos alrededor de la colonia. Este fenómeno comprueba la propiedad de coagular el plasma que presentan los estafilococos patógenos coagulasa positivos. La elevada concentración de cloruro de sodio inhibe a la mayoría de las bacterias que son halo-sensibles y favorecen a los estafilococos halo-resistentes.

Sembrar la muestra en estudio en la superficie del medio de cultivo por estría cerrada. Incubar 24 – 48 h a 35°C.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA			
Agar	15.0	D-Manitol	10.0
Cloruro de sodio	75.0	Peptona especial	10.0
Extracto de carne	1.0	Rojo de fenol	0.025
		pH	7.4 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 111 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

CONTROL DE ACTIVIDAD

MICROORGANISMO	CEPA	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Crecimiento inhibido
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Colonias con pigmento amarillo característico y halo de color amarillo (manitol positivo)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Colonias blancas, sin halo amarillo (manitol negativo)
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453	Inhibición parcial

DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F.



AGAR DE MAC CONKEY

USO

Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de organismos coliformes, *Salmonella* y *Shigella* a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

Las sales biliarias y el cristal violeta inhiben el crecimiento de gérmenes Gram positivos. La lactosa y el indicador de pH rojo neutro, permiten la diferenciación de las bacterias lactosa positiva (colonias rosa intenso con halo de precipitación), de las no fermentadoras (colonias transparentes o ámbar).

Sembrar el medio de cultivo con la muestra problema por estría cruzada. Incubar 24 h a 35°C.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA			
Agar	13.5	Mezcla de sales biliarias	1.5
Cloruro de sodio	5.0	Peptona especial	3.0
Cristal violeta	0.001	Peptona de gelatina	17.0
Lactosa	10.0	Rojo neutro	0.03
		pH	7.1 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 50 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

CONTROL DE ACTIVIDAD

MICROORGANISMO	CEPA	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Colonias grandes, rosa intenso con halo de precipitación
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Colonias medianas, incoloras transparentes
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453	Colonias grandes, incoloras opacas, inhibición total o parcial del swarming
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Inhibición parcial
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Crecimiento inhibido

DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F.



AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA

USO

Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

Las bacterias Gram positivas, algunas especies de *Proteus* y bacilos coliformes son inhibidos por las sales biliares, citrato de sodio y verde brillante. La diferenciación de los microorganismos se logra por la lactosa. Las bacterias que fermentan la lactosa producen ácido, el cual al reaccionar con el indicador rojo neutro, forman colonias rojas a rosa intenso, las no fermentadoras observan incoloras a rosa pálido. El tiosulfato de sodio y el citrato férrico de amonio, facilitan la detección de sulfuro de hidrógeno, manifestándose por colonias con centro negro. Por ser un medio con alto poder de inhibición se recomienda utilizarlo paralelamente a otros medios de cultivo menos inhibidores como Agar Mac Conkey, Agar Eosina Azul de Metileno, Agar Tergitol 7 o Agar XLD. Sembrar por estría cruzada la superficie del medio de cultivo con la muestra problema. Incubar 24 h a 35°C.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Agar	13.5	Peptona especial	5.0
Citrato férrico de amonio	1.0	Rojo neutro	0.025
Citrato de sodio	8.5	Sales biliares	8.5
Extracto de carne	5.0	Tiosulfato de sodio	8.5
Lactosa	10.0	Verde brillante	0.00033
		pH	7.0 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 60 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. **NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE.** Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

MICROORGANISMO	CEPA	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Marcada inhibición o colonias rosa intenso con halo de precipitación
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Colonias medianas, incoloras transparentes con centro negro
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022 o 9199	Colonias pequeñas, incoloras transparentes
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430	Colonias pequeñas, incoloras transparentes con o sin centro negro
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Crecimiento inhibido
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Crecimiento inhibido o colonias puntiformes, rosa opacas

DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F.



AGAR CON EOSINA Y AZUL DE METILENO

USO

Es un medio ligeramente selectivo y diferencial para el aislamiento de microorganismos entéricos a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

El Agar con Eosina y Azul de Metileno es una combinación del medio de Levine y el de Holt-Harris y Teague, contiene una mezcla de peptonas según Levine y presenta dos carbohidratos lactosa y sacarosa.

Este medio de cultivo permite una diferenciación muy clara entre las colonias de organismos fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan; el contenido de eosina y azul de metileno inhiben en cierto grado organismos Gram positivos. La presencia de sacarosa permite para algunos miembros del grupo coliforme fermentarla con más facilidad que la lactosa. Las colonias lactosa positiva son azules a moradas con brillo metálico o poseen centros oscuros con periferias transparentes incoloras y las que son negativas en lactosa o sacarosa, se observan incoloras o rosa pálido transparentes.

Sembrar el medio de cultivo con la muestra de ensayo por estría cruzada. Incubar 24 – 48 h a 35°C.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA			
Agar	13.5	Lactosa	5.0
Azul de metileno	0.065	Peptona especial	10.0
Eosina Y	0.4	Sacarosa	5.0
Fosfato dipotásico	2.0	pH	7.2 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 36 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. **Conservar a temperatura ambiente.**

CONTROL DE ACTIVIDAD

MICROORGANISMO	CEPA	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Colonias azul a moradas, con brillo metálico azul verdoso
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Inhibición parcial
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Colonias incoloras, transparentes
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022 o 9199	Colonias incoloras, transparentes
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Crecimiento parcialmente inhibido o colonias puntiformes (1)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Colonias plumosas, rosa pálido atípicas

DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F.



AGAR VERDE BRILLANTE

USO

Medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de *Salmonella* (excepto *S. typhi* y *Shigella*) a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

La selectividad de este medio se basa en la concentración del verde brillante, que inhibe microorganismos Gram positivos y parcialmente a Gram negativos. La lactosa y la sacarosa permiten diferenciar la flora acompañante que utiliza estos carbohidratos, del género *Salmonella* que no los degrada.

La muestra debe inocularse en Caldo Tetrionato (No. Catálogo 1036), medio de enriquecimiento selectivo para el aislamiento del género *Salmonella*. Los subcultivos, pueden efectuarse sembrando sobre la superficie del medio de cultivo por estría cruzada en Agar de Mac Conkey, Agar Verde Brillante y Agar para *Salmonella* y *Shigella*. Incubar 24 h a 35°C. Las colonias típicas de *Salmonella* son translúcidas, ligeramente rojas a rosa con halo rojo brillante. Los organismos fermentadores de lactosa y/o sacarosa que desarrollan en el medio se diferencian fácilmente por la formación de colonias amarillo verdosas rodeadas de una zona amarilla verdosa intensa.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA			
Agar	20.0	Peptona especial	10.0
Cloruro de sodio	5.0	Rojo de fenol	0.08
Extracto de carne	3.0	Sacarosa	10.0
Lactosa	10.0	Verde brillante	0.0125
		pH	6.9 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 58 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Se puede agregar 3.0 ml de una solución de 2,3,5- Clorhidrato de Trifenil-Tetrazolio estéril al 1%. Vaciar en cajas de Petri estériles. **ES IMPORTANTE PROTEGERLO DE LA LUZ.** Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

CONTROL DE ACTIVIDAD

MICROORGANISMO	CEPA	CRECIMIENTO
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Inhibido o colonias amarillas a verdes
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Buena, colonias rosa a rojas, translúcidas con halo rojo brillante
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453	Inhibido o colonias rosa a rojas, translúcidas, pueden presentar swarming
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Inhibido
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430	Inhibido

DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F.



AGAR DE MÜELLER HINTON

USO: Para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias patógenas de importancia clínica por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer).

PRINCIPIO

La peptona de caseína ácida y la infusión de carne de res proporcionan los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento, estos ingredientes tienen un bajo contenido en timina y timidina que evitan la interferencia en la determinación de la CMI para el sulfametoxazol trimetoprim. El calcio y el magnesio se adicionan para una mejor determinación de la CMI, de acuerdo a la NCCLS M07-A6. Este medio adicionado con sangre de carnero al 5% (Agar Mueller-Hinton con sangre de carnero No. de Catálogo 1225-P), se recomienda para la sensibilidad de *Streptococcus viridans*. Cuando se agrega hemoglobina y enriquecimiento (Agar Mueller Hinton-Chocolate polienriquecido, No. de Catálogo 1221-P), es usado para pruebas de sensibilidad de Neisserias.

El procedimiento se basa en las sustancias antimicrobianas impregnadas en discos de papel que se difunden en el agar produciendo diámetros de inhibición que se correlacionan con un patrón de medición establecido (concentración mínima inhibitoria, CMI). La técnica estándar para la prueba de susceptibilidad de antimicrobianos se establece en el manual de NCCLS.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA			
Agar	17.0	Infusión de carne de res	2.0
Almidón	1.5	Peptona de caseína ácida	17.5

PREPARACION

Rehidratar 38 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Se puede preparar Agar chocolate bajo previa adición de sangre de carnero estéril desfibrinada calentando en baño María a 80°C durante 10 minutos. NO SOBRECALENTAR. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

CONTROL DE ACTIVIDAD

MICROORGANISMO	CEPA	LIMITES	
		MEDIR DIÁMETRO DE ACUERDO A LAS TABLAS DE LA NCCLS, 2003	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1. Ampicilina 10 µg	16 – 22 mm
		2. Cefotaxima 30 µg	29 – 35 mm
		3. Cefalotina 30 µg	15 – 21 mm
		4. Gentamicina 10 µg	19 – 26 mm
		5. Sulfametoxazol Trimetoprim 1.25/23.75 µg	23 – 29 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1. Cefalotina 10 µg	29 – 37 mm
		2. Ciprofloxacina 5µg	22 – 30 mm
		3. Oxacilina 1µg	18 – 24 mm
		4. Vancomicina 30 µg	17 – 21 mm
		5. Gentamicina 10 µg	19 – 27 mm

DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F.



BASE DE AGAR CETRIMIDA

USO

Medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

La cetrimida (Bromuro de cetiltrimetilamonio) inhibe el crecimiento de las bacterias debido a su acción como un compuesto cuaternario de amonio. La base de Agar Cetrimida promueve la producción de piocianina y fluoresceína que se observan con luz ultravioleta en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que puede considerarse como prueba presuntiva para su identificación. Posteriormente se puede realizar la prueba de oxidasa.

Sembrar la muestra de ensayo en la superficie del medio de cultivo por estría cruzada. Incubar 24 – 48 h a 35°C.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA			
Agar	13.6	Peptona de gelatina	20.0
Cetrimida	0.3	Sulfato de potasio	10.0
Cloruro de magnesio	1.4	pH	7.2 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 45.3 g del medio en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Si se requiere el medio para caracterización bioquímica, distribuirlo en tubos de ensayo y después de esterilizar dejar enfriar en posición inclinada. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

CONTROL DE ACTIVIDAD

MICROORGANISMO	CEPA	CRECIMIENTO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bueno
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Inhibido
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Inhibido

DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F.



ANEXO 5. COLORANTES PARA TINCIONES

COLORANTES PARA LA TINCIÓN DE GRAM

A. CRISTAL VIOLETA

Solución A.

Cristal Violeta	10g
Etanol (95%)	100ml

Mezclar y disolver perfectamente. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

Solución B.

Oxalato de amonio al 1% en solución acuosa.

Pesar 1g de oxalato de amonio y llevarlo a 100ml con agua destilada. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

Solución de tinción:

Mezclar 20ml de la solución A con 80ml de la solución B. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

B. SAFRANINA (colorante de contraste).

Safranina al 0.5% en solución acuosa.

Pesar 0.5g y llevarlos a 100ml con agua destilada. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

C. LUGOL (mordiente).

Yodo	5g
Yoduro de potasio	10g
Agua destilada	100ml

Disolver el yoduro de potasio en 100ml de agua destilada. Luego disolvemos los 5g de yodo en la mezcla anterior. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

Solución de tinción:

Disolver 1ml de la mezcla en 5ml de agua destilada.

D. ALCOHOL-ACETONA (decolorante).

Mezclar 50ml de alcohol con 50ml de Acetona. . Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.



COLORANTES PARA LA TINCIÓN DE BACILOS ÁCIDO-ALCOHOL
RESISTENTES (MÉTODO DE ZIEHL-NEELSEN)

A. CARBOL FUCSINA

Solución A.

Fucsina básica	10.0 g
Etanol (95%)	100ml

Mezclar y disolver en un frasco ámbar cerrado y dejarlo a 37°C en la estufa durante 24hrs.

Solución B.

Fenol	5.0g
Agua destilada	100ml

Mezclar hasta disolver perfectamente el fenol

Solución de tinción:

Mezclar 10 ml. de la solución A con 100ml de la solución B. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

B. AZUL DE METILENO (LOEFFLER'S), colorante de contraste.

Solución de Azul de Metileno saturada.

Azul de metileno	1.0g
Etanol (95%)	100ml

Mezclar y disolver en un frasco ámbar cerrado.

Preparación de hidróxido de potasio (KOH) al 1%

Pesar 1g. de KOH y disolverlo en 100ml de agua destilada.

Solución de tinción:

Mezclar 1ml de KOH al 1% en la solución, agua destilada 99ml y 30 ml de Azul de Metileno etanólico. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

NOTA: De los reactivos se requieren pequeñas cantidades, preparar exclusivamente lo necesario.

C. ALCOHOL-ACIDO (Agente descolorante)

Mezclar 3ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl conc.) con 97ml de etanol al 95%. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.



COLORANTES PARA LA TINCIÓN DE ESPORAS (MÉTODO DE SCHAEFFER-FULTON)

A. VERDE DE MALAQUITA.

Verde de malaquita al 5% en solución acuosa.

Pesar 5g. de verde de malaquita y llevarlos a 100ml con agua destilada. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

B. SAFRANINA (colorante de contraste).

Safranina al 0.5% en solución acuosa.

Pesar 0.5g y llevarlos a 100ml con agua destilada. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado a temperatura ambiente.

ANEXO 6. REACTIVOS DE LECTURA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

SOLUCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO (H_2O_2) AL 3% PARA LA PRUEBA DE CATALASA.

Mezclar 3ml de agua oxigenada al 30% con 97ml de agua destilada, guardar esta solución en un frasco de color ámbar y debe de permanecer en refrigeración.

PRUEBA DE OXIDASA

Reactivo N,N,N,N- TETRAMETIL P- FENILENDIAMINA AL 1% . Sensidiscos comerciales llamados “TAXO N” ó “TIPIBACT N” (ver Foto 75).

REACTIVOS PARA LA LECTURA DE PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NO_3 .

A. ÁCIDO SULFÁNILICO.

Ácido sulfánilico al 0.8% en ácido acético 5N.

Pesar 800 mg. de ácido sulfánilico y agregar 100ml de ácido acético 5N, disolver por calentamiento ligero. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración.

B. α - NAFTILAMINA.

α - Naftilamina 0.5% en ácido acético 5N o dimetil- α - Naftilamina al 0.6%.

Pesar 500mg. de α - Naftilamina y agregar 100ml de ácido acético 5N, disolver por calentamiento ligero. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración.

Pesar 600mg. de dimetil- α - Naftilamina y agregar 100ml de ácido acético 5N, disolver por calentamiento ligero. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración.



C. Zinc.

Utilizar granallas de tamaño pequeño o polvo suspendido en 1% de metil celulosa.

REACTIVO PARA LECTURA DE LA PRUEBA DE MR-VP

A. Solución de Rojo de Metilo.

Rojo de Metilo	0.04g
Etanol	40 ml
Agua destilada	Llevar a 100ml

Disolver el rojo de metilo en el etanol y llevarlo a 100 ml. con agua destilada. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración.

B. Solución para la prueba de VP

Solución de α - Naftol.

α - Naftol al 5% en etanol.

Pesar 5 gramos de α - Naftol y disolverlos en 100 ml de etanol absoluto. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración.

Solución de hidróxido de potasio al 40%

Pesar 40 g de KOH y disolverlo en 100ml de agua destilada. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración.

REACTIVOS PARA LECTURA DE LA PRUEBA DE INDOL.

A. REACTIVO DE ERLICH'S.

p-dimetil benzaldehido	5g
Etanol absoluto	95 ml
HCl concentrado	20ml

Disolver el aldehído en el etanol y adicionar el ácido con cuidado. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración, protegerlo de la Luz.

B. REACTIVO DE KOVAC'S.

p-dimetil benzaldehido	5g
Alcohol amílico	75 ml
HCl concentrado	25ml



Disolver el aldehído en el alcohol por calentamiento ligero en baño maria (50-55°C) enfriar y adicionar el ácido lentamente. Almacenarlo en frasco ámbar cerrado y en refrigeración, protegerlo de la Luz.

ANEXO 7. PARTES FUNDAMENTALES DEL MICROSCOPIO COMPUESTO.

El microscopio compuesto (*micro*=pequeño y *scopiens*= objetos), difiere del microscopio simple, en que tiene dos sistemas de lentes, uno conocido como objetivo y el otro como ocular, montado en un tubo o cuerpo del microscopio; la imagen que ve el ojo, tiene un aumento igual al producto de la multiplicación de los aumentos de los dos sistemas de lentes.

Las diferentes partes del microscopio pueden clasificarse en 4 sistemas:

- a) **Sistema de soporte** (pie, brazo, revolver para objetivos, platina, carro)
- b) **Sistema óptico** (lentes: ocular y objetivos).
- c) **Sistema de iluminación** (lámpara de laminación eléctrica, condensador, diafragma).
- d) **Sistema de ajuste** (tornillo de enfoque rápido macrométrico, de enfoque fino micrométrico y tornillo de carro móvil).

Los objetivos constituyen una de las partes más importantes del microscopio. Limita el tamaño de las imágenes y responden de la calidad de está. La mayoría de los microscopios están equipados con tres objetivos de diferente aumento:

Objetivo seco débil o de pequeño aumento. Abarca un campo mayor, es muy útil para examinar protozoarios y otros microorganismos. Esta marcado con “3” o “2/3” (que significa 2/3 de pulgada o 16mm); por ejemplo objetivo de 4x y el de 10x.

Objetivo seco fuerte o de gran aumento. Mayor aumento y útil para estudiar detalles de la estructuras de parásitos. Suele estar marcado con “6”, “1/6” o “4mm”. Objetivo de 43x o 60x.

Objetivo de inmersión. Imagen más definida, indispensable para bacteriólogos y observar frotis o biopsias teñidas. Puede estar grabado con “Oil inmer” u “homog inmer” (significa inmersión homogénea); también con “1/12”, “1.9mm” o “1.8mm”. Objetivo de 91x, 95x o 100x.

Los lentes oculares amplifican la imagen de 50 a 100 veces del objeto formada por el objetivo. Siendo un factor limitante la longitud de onda de los rayos de luz visible utilizada.

El condensador sirve para concentrar los rayos luminosos y dirigirlos hacia la preparación s examinar.



El **diafragma** sirve para disminuir y aumentar la cantidad de luz que pasa por el condensador.

Tornillo de enfoque rápido macrométrico: Se utiliza primero para poner el objeto a la vista; y se gira hasta que la imagen aparece.

Tornillo de enfoque fino micrométrico: tiene un desplazamiento más lento, permite enfocar después del ajuste aproximado.

Tornillo de carro móvil: sirve para desplazar la platina.

El microscopio es un instrumento delicado y de precisión, constituido para realizar un trabajo preciso, que si no se le trata con el cuidado, puede dañarse y darnos un rendimiento limitado.

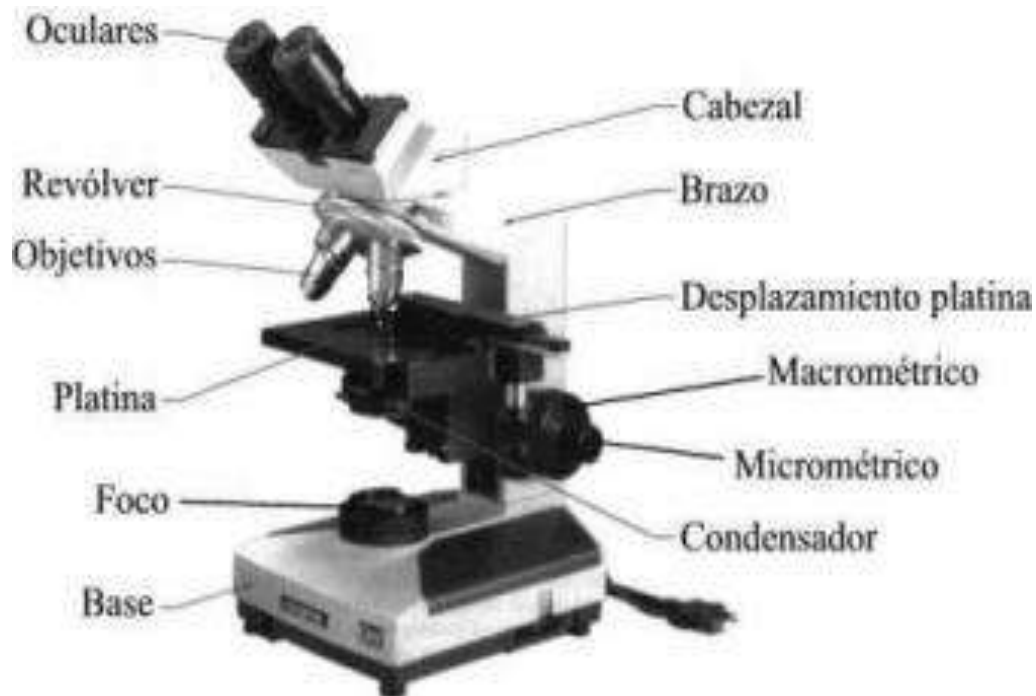


Fig. 49. Partes que conforman un microscopio óptico.



Tabla 5. Consejos para una mejor visualización y manipulación de l microscopio óptico.

Manejo	Cuidados	Factores que lo dañan
Banco y mesa a una altura que permita al observador el uso de este en posición vertical.	Guardarse en un lugar seco y cubierto para evitar el polvo.	El uso de alcohol y xilol en lentes oculares y objetivos.
Encender la fuente luminosa	Al trasladarlo de un lugar a otro tomarlo con una mano de su brazo y con la otra por debajo del soporte y plataforma	Limpiar las lentes interiores y objetivos con tela o papel, debe utilizarse un pincel de pelos finos.
Montar la preparación	Antes de su uso cerciorarse que las lentes estén limpias.	Dejar el microscopio sin oculares.
Separar los binoculares.	Al término de su uso limpiar el aceite de inmersión los objetivos, lentes y preparaciones.	Guardar el microscopio con el aceite de inmersión en el objetivo.
Realizar movimientos suaves y cuidadosos durante el movimiento de los tornillos	Condensador, objetivos y oculares podrán limpiarse con agua destilada, las lentes y parte superior del condensador con xilol en pequeñas cantidades.	Trasportarlo con una sola mano. Arrastrarlo.
Enfoque de imágenes iniciando con el seco débil y terminar con el de inmersión.	Partes de soporte deberán limpiarse con un trapo de algodón.	Dejar la lámpara prendida cuando no se esta usando.
Al terminar limpiar los objetivos y retirar las preparaciones	Las preparaciones deben de estar siempre limpias.	Mojarlo o colocar preparaciones húmedas o con condensaciones.



ANEXO 8. DISCOS PARA PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS (INTERPRETACIÓN)

Zone Diameter Interpretive Chart †											
			Zone Diameter Interpretive Standards (mm)						Zone Diameter Interpretive Standards (mm)		
Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Resistant	Inter-mediate ^a	Susceptible ^b	Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Resistant	Inter-mediate ^a	Susceptible ^b
Amdinocillin ^f Enterobacteriaceae	AMD-10	10 µg	≤15	—	≥16	Cefonidd Enterobacteriaceae and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^{c,k}	CD-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18
Amikacin Enterobacteriaceae, P. aeruginosa Acinetobacter and staphylococci	AM-30	30 µg	≤14	15 – 16	≥17	Cefoperazone Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j	CFP-75	75 µg	≤15	16 – 20	≥21
Amoxicillin Clavulanic Acid ^{g,h,i}	AMC-30	20/10 µg	≤13	14 – 17	≥18	Cefotaxime ^h Enterobacteriaceae, ^{l,x} P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d	CTX-30	30 µg	≤14	15 – 22 ^f	≥23 ^h
Enterobacteriaceae ^j and V. cholerae ^m Staphylococci ^{j,k} Enterococcus spp. ^{n,o,p} Listeria monocytogenes ^f Haemophilus spp. ^{c,k,q} Streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^{r,s,aaa,ccc}	AM-10	10 µg	≤23	14 – 16	≥17	Viridans Streptococci (non-S. pneumoniae) ^{e,l,ccc} Streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}	CTX/CLA	30/10 µg	≤25	26 – 27	≥28
Ampicillin Sulbactam ^{g,h,i}	SAM-20	10/10 µg	≤28	—	≥29	Cefotaxime/Clavulanic Acid ^t	CTX/CLA	30/10 µg	—	—	≥24 ^h
Enterobacteriaceae, P. aeruginosa Acinetobacter ^q and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^{c,k}	AM-20	10 µg	≤28	—	≥29	Cefotetan Enterobacteriaceae and staphylococci ^j N. gonorrhoeae ^d	CTT-30	30 µg	≤12	13 – 15	≥16
Azithromycin Staphylococcus spp. ^f Haemophilus spp. ^c S. pneumoniae and other streptococci ^{r,s}	AZM-15	15 µg	≤11	12 – 14 ^h	≥15 ^h	Cefoxitin Enterobacteriaceae and staphylococci ^{j,aa} N. gonorrhoeae ^d	FOX-30	30 µg	≤19	20 – 25 ^w	≥26
Azlocillin P. aeruginosa	AZ-75	75 µg	≤19	—	≥20	Cefpodoxime ^{h,i} Enterobacteriaceae ^{t,uu} and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d	CPD-10	10 µg	≤14	15 – 17	≥18
Aztreonam Enterobacteriaceae, P. aeruginosa & Acinetobacter Haemophilus spp. ^c	ATM-30	30 µg	≤13	14 – 17	≥18	Cefprozil ^{h,i} Enterobacteriaceae ^{u,v} and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^{c,k}	CPR-30	30 µg	≤23	24 – 27 ^w	≥28
Bacitracin ^f Carbenicillin Enterobacteriaceae and Acinetobacter P. aeruginosa	B-10	10 U	≤13	14 – 17	≥18	Ceftazidime Enterobacteriaceae, ^t P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d	CAZ-30	30 µg	≤17	18 – 20	≥21
Cefadroxil ^{h,i} Enterobacteriaceae ^u and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^{c,k}	CEC-30	30 µg	≤15	16 – 21	≥22	Ceftazidime/Clavulanic Acid ^t	CAZ/CLA	30/10 µg	≤14	15 – 17	≥18
Cefamandole Enterobacteriaceae and staphylococci ^j	MA-30	30 µg	—	—	≥26	Ceftibuten ^{h,i} Enterobacteriaceae ^{z,ii} Haemophilus spp. ^c	CTB-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18
Cefazolin Enterobacteriaceae ^u and staphylococci ^j	CZ-30	30 µg	≤14	15 – 17	≥18	Ceftizoxime ^v Enterobacteriaceae, ^{l,x} P. aeruginosa, ^l Acinetobacter and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d	ZOX-30	30 µg	≤14	15 – 19	≥20
Cefdinir ^h Enterobacteriaceae ^{h,k} and methicillin susceptible staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c	CDR-5	5 µg	≤16	17 – 19	≥20	Ceftriaxone ^h Enterobacteriaceae, ^{l,x} P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d Viridans Streptococci (non-S. pneumoniae) ^{e,l,ccc} Streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}	CRO-30	30 µg	≤17	18 – 20	≥21
Cefepime ^{h,i} Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d	CEP-30	30 µg	≤16	17 – 19	≥20	Streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}			≤24	25 – 26	≥27
Cefixime ^h Enterobacteriaceae ^v Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d	CFM-5	5 µg	≤21 ^h	22 – 23 ^h	≥24 ^h	Ceftriaxone ^h Enterobacteriaceae, ^{l,x} P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j Haemophilus spp. ^c N. gonorrhoeae ^d Viridans Streptococci (non-S. pneumoniae) ^{e,l,ccc} Streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^{aaa,ccc}			≤24	25 – 26	≥27
Cefmetazole Enterobacteriaceae and staphylococci ^j N. gonorrhoeae ^d	CMZ-30	30 µg	≤15	16 – 18	≥19				—	—	≥24 ^h
			—	—	≥21				—	—	≥26
			—	—	≥31				—	—	≥33
			≤12	13 – 15	≥16				≤13	14 – 20 ^l	≥21 ^h
			≤27	28 – 32 ^w	≥33				—	—	≥26



Zone Diameter Interpretive Chart †											
Antimicrobial Agent			Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Antimicrobial Agent			Zone Diameter Interpretive Standards (mm)		
Code	Disc Potency		Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b	Code	Disc Potency		Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b
Cefuroxime (sodium) ^{h,i} CXM-30	30 µg					Kanamycin	K-30	30 µg			
Enterobacteriaceae ^d and staphylococci ^j (parenteral)			≤14	15-17	≥18	Enterobacteriaceae and staphylococci			≤13	14-17	≥18
Haemophilus spp. ^{c,k}			≤16	17-19	≥20	Levofloxacin	LVX-5	5 µg			
N. gonorrhoeae ^d			≤25	26-30 ^W	≥31	Enterobacteriaceae ^{ddd} , P. aeruginosa, Acinetobacter, staphylococci ^{aa} and enterococci			≤13	14-16	≥17
Cephalothin	CF-30	30 µg	≤14	15-17	≥18	Haemophilus spp. ^c			—	—	≥17
Enterobacteriaceae ^u and staphylococci ^j						S. pneumoniae and other streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^e			≤13	14-16	≥17
Chloramphenicol	C-30	30 µg	≤12	13-17	≥18	Linezolid	LZO-30	30 µg			
Enterobacteriaceae ^f , P. aeruginosa ^f , Acinetobacter ^f , staphylococci ^f , enterococci ^{yy} and S. cholerae ^{bb,z}			≤25	26-28	≥29	Staphylococcus spp.			—	—	≥21
Haemophilus spp. ^{4,f}			≤20	—	≥21	Enterococcus spp.			≤20	21-23	≥23
S. pneumoniae ^{4,f}			≤17	18-20	≥21	S. pneumoniae and other streptococci ^e			—	—	≥21
Streptococci (non-S. pneumoniae) ^{4,f}						Lomefloxacin	LOM-10	10 µg			
Cinoxacin	CIN-100	100 µg	≤14	15-18	≥19	Enterobacteriaceae ^{ddd} , P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci			≤18	19-21	≥22
Enterobacteriaceae						Haemophilus spp. ^c			—	—	≥22
Ciprofloxacin	CIP-5	5 µg	≤15	16-20	≥21	N. gonorrhoeae ^d			≤26	27-37	≥38
Enterobacteriaceae ^{aaa} , P. aeruginosa, Acinetobacter, staphylococci and enterococci			—	—	≥21	Loracarbef ^{h,i}	LOR-30	30 µg			
Haemophilus spp. ^c			≤27	28-40 ^W	≥41	Enterobacteriaceae ^{4,k,k} and staphylococci ^j			≤14	15-17	≥18
N. gonorrhoeae ^d						Haemophilus spp. ^{c,k}			≤15	16-18	≥19
Clarithromycin	CLR-15	15 µg	≤13	14-17	≥18	Meropenem ^{h,i}	MEM-10	10 µg			
Staphylococcus spp. ^f			≤10	11-12	≥13	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j			≤13	14-15	≥16
Haemophilus spp. ^c			≤16	17-20	≥21	Haemophilus spp. ^c			—	—	≥20
S. pneumoniae and other streptococci ^{4,4}						Meropenem ^{h,i}	MEM-10	10 µg			
Clindamycin ^f	CC-2	2 µg	≤14	15-20	≥21	Enterobacteriaceae and Acinetobacter			≤17	18-20	≥21
Staphylococcus spp. ^h			≤15	16-18	≥19	P. aeruginosa			≤15	—	≥16
S. pneumoniae and other streptococci ^h						Minocycline ^{ee}	MI-30	30 µg			
Colistin ^{aa,dd}	CL-10	10 µg	≤8	9-10	≥11	Enterobacteriaceae ^{aa} , P. aeruginosa, Acinetobacter ^{aa} , staphylococci and enterococci ^{yy}			≤14	15-18	≥19
Enterobacteriaceae ^{aaa} , P. aeruginosa, Acinetobacter ^{aa} , staphylococci and enterococci ^{yy}			≤12	13-15	≥16	Moxalactam	MOX-30	30 µg			
Doxycycline ^{ee}	D-30	30 µg	≤14	15-17	≥18	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j			≤14	15-22	≥23
Enterobacteriaceae ^{aaa} , P. aeruginosa, Acinetobacter ^{aa} , staphylococci and enterococci ^{yy}			≤31	32-35	≥36	Moxifloxacin	MOX-5	5 µg			
Enoxacin	ENX-10	10 µg	≤14	15-17	≥18	Enterobacteriaceae ^{ddd} and Staphylococcus spp. ^{aa}			≤15	16-18	≥19
Enterobacteriaceae ^{ddd} and staphylococci ^{ff}			≤31	32-35	≥36	H. influenzae ^c and H. parainfluenzae ^c			—	—	≥18
N. gonorrhoeae ^d						S. pneumoniae ^{ee}			≤14	15-17	≥18
Ertapenem ^{h,i}	ETP-10	10 µg	≤15	16-18	≥19	Nafclillin	NF-1	1 µg			
Enterobacteriaceae and Staphylococcus spp. ^j			—	—	≥19	Staphylococcus aureus ^{l,nn}			≤10	11-12	≥13
Haemophilus spp. ^c						Nalidixic Acid	NA-30	30 µg			
Erythromycin	E-15	15 µg	≤13	14-22 ^{ll}	≥23 ^{ll}	Enterobacteriaceae ^z			≤13	14-18	≥19
Staphylococcus spp. ^f and enterococci ^{yy}			≤15	16-20	≥21	Neomycin ^f	N-30	30 µg			
S. pneumoniae and other streptococci ^{4,4}						Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci			≤12	13-16	≥17
Fosfomycin ^z	FOS-200	200 µg	≤12	13-15	≥16	Netilmicin	NET-30	30 µg			
E. coli and E. faecalis only						Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci			≤12	13-14	≥15
Gatifloxacin	GAT-5	5 µg	≤14	15-17	≥18	Nitrofurantoin	NFM-300	300 µg			
Enterobacteriaceae ^{ddd} and Staphylococcus spp. ^{aa}			≤14 ^{ll}	15-17 ^{ll}	≥18 ^{ll}	Enterobacteriaceae, staphylococci and enterococci			≤14	15-16	≥17
P. aeruginosa, Acinetobacter spp. and enterococci ²			—	—	≥18	Norfloxacin ^h	NOR-10	10 µg			
H. influenzae ^c and H. parainfluenzae ^c						Enterobacteriaceae ^{ddd} , P. aeruginosa, Acinetobacter, staphylococci and enterococci			≤12	13-16	≥17
N. gonorrhoeae ^d			≤33	34-37	≥38	Novobiocin ^f	NB-30	30 µg			
S. pneumoniae and other streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^h			≤17 ^{ll}	18-20 ^{ll}	≥21 ^{ll}	(Muller Hinton agar with sheep blood for veterinary use)			≤14	15-16	≥17
Gemifloxacin	GEM-5	5 µg	≤15	16-19	≥20	Oloxacin	OPX-5	5 µg			
Enterobacteriaceae ^{l,ddd}			—	—	≥18	Enterobacteriaceae ^{ddd} , P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^{aa}			≤12	13-15	≥16
H. influenzae ^c and H. parainfluenzae ^c			≤19	20-22	≥23	Haemophilus spp. ^c			—	—	≥16
S. pneumoniae ^h						N. gonorrhoeae ^d			≤24	25-30 ^W	≥31
Gentamicin	GM-120	120 µg	5	7-9 ^{hh}	≥10	S. pneumoniae ^h and other streptococci (non-S. pneumoniae, β-hemolytic only) ^h			≤12	13-15	≥16
Testing enterococci for high level resistance ^{h,0-99}	GM-10	10 µg	≤12	13-14	≥15	Imipenem ^{h,i}	IPM-10	10 µg			
Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci			≤13	14-15	≥16	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci ^j			≤13	14-15	≥16
Imipenem ^{h,i}	IPM-10	10 µg	—	—	≥16	Haemophilus spp. ^c			—	—	≥16



Zone Diameter Interpretive Chart †											
Antimicrobial Agent			Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Antimicrobial Agent			Zone Diameter Interpretive Standards (mm)		
			Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b				Resistant	Intermediate ^a	Susceptible ^b
Code	Disk Potency						Code	Disk Potency			
Oxacillin	OX-1	1 µg	≤10	11 – 12	≥13	Tigecycline	TGC-15	15 µg	≤14	15 – 18	≥19
<i>Staphylococcus aureus</i> J ¹ ,N ¹ ,O ¹			≤17	—	≥18	Enterobacteriaceae ^{1,2}			—	—	≥19
Staphylococci, coagulase-negative J ¹ ,N ¹			—	—	≥20	<i>S. aureus</i> (including MRSA) ¹			—	—	≥19
<i>S. pneumoniae</i> (for penicillin G susceptibility) R, ^h			—	—	≥20	<i>E. faecalis</i> (vancomycin-susceptible isolates only) ¹			—	—	≥19
Oxolinic Acid ^f	OA-2	2 µg	≤10	—	≥11	<i>Streptococcus</i> spp. (other than <i>S. pneumoniae</i>) ^{2,3}			—	—	≥19
Penicillin ^h	P-10	10 U	≤28	—	≥29	Tobramycin	NN-10	10 µg	≤12	13 – 14	≥15
<i>Staphylococcus</i> spp. J,PP			≤14	—	≥15	Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter and staphylococci			—	—	≥16
<i>Enterococcus</i> spp. N,O			≤19	20 – 27	≥28	Trimethoprim	TMP-5	5 µg	≤10	11 – 15	≥16
<i>L. monocytogenes</i> ^f			≤26	27 – 46 ^W	≥47	Enterobacteriaceae and staphylococci			—	—	≥17
<i>N. gonorrhoeae</i> G,GG ^h			—	—	≥24 ^f	Trimethoprim/	SXT	1.25 µg	—	—	≥17
Streptococci (non- <i>S. pneumoniae</i> , β-hemolytic only) R,JT,AAK,CC						Sulfamethoxazole ¹¹		23.75 µg	≤10	11 – 15	≥16
Piperacillin	PIP-100	100 µg	≤17	18 – 20	≥21	Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter, staphylococci and <i>V. cholerae</i> ^m			≥10	11 – 15	≥16
Enterobacteriaceae and Acinetobacter			≤17	—	≥18	<i>Haemophilus</i> spp. S			≤15	16 – 18	≥19
<i>P. aeruginosa</i>						<i>S. pneumoniae</i> ²			—	—	≥17
Piperacillin/						Vancomycin	Va-30	30 µg	—	—	≥15
Tazobactam ⁹	TZP-110	100/10 µg	≤17	18 – 20	≥21	<i>Staphylococcus</i> spp. ^{vv,ii}			≤14	15 – 16	≥17
Enterobacteriaceae and Acinetobacter ¹¹			≤17	—	≥18	<i>Enterococcus</i> spp. N,O,WW			—	—	≥17
<i>Staphylococcus</i> spp. J ¹ and <i>P. aeruginosa</i> ^h						<i>S. pneumoniae</i> ^{2,3} and other streptococci ²					
Polymyxin B ^{aa,dd}	PB-300	300 U	≤8	9 – 11	≥12						
Quinupristin/Dalfopristin SYN-15	4.5/10.5 µg		≤15	16 – 18	≥19						
<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus faecium</i> and <i>S. pyogenes</i> ² only											
Rifampin	RA-5	5 µg	≤16	17 – 19	≥20						
<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Enterococcus</i> spp. W			≤16	17 – 19	≥20						
<i>Haemophilus</i> spp. C			≤16	17 – 18	≥19						
<i>S. pneumoniae</i> ²											
Sparfloxacin	SPX-5	5 µg	≤15	16 – 18	≥19						
<i>Staphylococcus</i> spp.			≤15 ⁱⁱ	16 – 18 ^h	≥19						
<i>S. pneumoniae</i> ²											
Spectinomycin	SPT-100	100 µg	≤14	15 – 17 ^W	≥18						
<i>N. gonorrhoeae</i> ⁱⁱ											
Streptomycin											
Testing enterococci for high level resistance ^{N,O,GG}	S-300	300 µg	6	7 – 9 ^h	≥10						
Enterobacteriaceae	S-10	10 µg	≤11	12 – 14	≥15						
Sulfisoxazole ¹¹	G-.25	250 µg	≤12	13 – 16	≥17						
Enterobacteriaceae, <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter, staphylococci and <i>V. cholerae</i> ^m											
Telithromycin	Tel-15	15 µg	— ^{aa}	— ^{aa}	≥22						
<i>S. aureus</i>			≤11	12 – 14	≥15						
<i>Haemophilus</i> spp. S			≤15	16 – 18	≥19						
<i>S. pneumoniae</i> ²											
Tetracycline ^{ee}	Te-30	30 µg	≤14	15 – 18	≥19						
Enterobacteriaceae ^{aa} , <i>P. aeruginosa</i> , Acinetobacter ^{aa} , staphylococci, enterococci W and <i>V. cholerae</i> ^m			≤25	26 – 28	≥29						
<i>Haemophilus</i> spp. C			≤30	31 – 37 ^W	≥38						
<i>N. gonorrhoeae</i> G,1au			≤18	19 – 22	≥23						
<i>S. pneumoniae</i> and other streptococci ²											
Ticardilin	TIC-75	75 µg	≤14	15 – 19	≥20						
Enterobacteriaceae and Acinetobacter			≤18	—	≥15						
<i>P. aeruginosa</i>											
Ticardilin/											
Clavulanic Acid ⁹	TM-85	75/10 µg	≤14	15 – 19	≥20						
Enterobacteriaceae and Acinetobacter			≤14	—	≥15						
<i>P. aeruginosa</i>			≤22	—	≥23						
<i>Staphylococcus</i> spp. J											

BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs



ANEXO 9 CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada. Su lectura se realiza a las 24 hrs.

Concentración mínima bactericida (CMB) se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de destruir una cepa bacteriana dada. Su lectura se realiza a las 48hrs.

Para explicar el cálculo de la CMI utilizaremos la metodología que se llevo acabo para obtener los resultados de la Foto 99:

Antibiótico comercial Gentamicina 160/2ml
Para el Stock 0.2ml de Gentamicina en 10ml de CMH.
Diluciones dobles: MIC en el tubo 4.
Calculo de la MIC:

$$MIC = \frac{160mg}{2ml} \times \frac{0.2ml}{10ml} \times \frac{1ml}{2ml} \times \frac{1ml}{2ml} \times \frac{1ml}{2ml} \times 0 = 0.1 \text{ mg/ml}$$

Tabla 6. Rango de dilución de antibióticos para la prueba de MIC.

Suggested Antibiotic Dilution Ranges For MIC Testing	
ANTIMICROBIAL AGENT	CONCENTRATION RANGE(µg/ml)
Penicillin G	0.015-32
Methicillin	0.003-64
Naficillin/Oxacillin	0.003-64
Ampicillin(Gram +ve)	0.15-32
Ampicillin(Gram-ve)	0.13-256
Cephalosporin(Gram +ve)	0.015-32
Cephalosporin I generation (Gram -ve)	0.13-256
Cephalosporin II&III generation (Gram-ve)	0.03-64
Cephalosporin III generation	0.13-256
(<i>Pseudomonas</i> sp.)	
Vancomycin	0.015-16
Amikacin	0.06-128
Gentamicin/Tobramycin	0.03-64
Erythromycin	0.015-32
Clindamycin	0.015-32
Rifampicin	0.015-32
Chloramphenicol	0.06-256
Tetracycline	0.06-256
Trimethoprim	0.03-64
Sulphamethoxazole	0.6-1216
Trimethoprim(UTI, Gram - ve)	0.5-64

Source-A guide to sensitivity testing: Report of working party on antibiotic sensitivity testing of the British society for Antimicrobial Chemotherapy.J.Antimicrob Chemotherap 1991;(27):Supplement D.1-50.



Tabla 7. Continuación. Rango de dilución de antibióticos para la prueba de MIC

Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores críticos de CIM para los estafilococos							
Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)		Observaciones
		R	I	S	R	S	
Penicilina ¹	10 U	≤ 28	-	≥ 29	β-lac	≤ 0,12	Halo con borde cortante: R Halo con borde en bisel: S
Oxacilina ^{2,3}	1	≤ 10 ≤ 17	11-12 -	≥ 13 ≥ 18	≥ 4 ≥ 0,5	≤ 2 ≤ 0,25	Para <i>S. aureus</i> Para estafilococo coagulasa neg.
Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10	≤ 19		≥ 20	≥ 8/4	≤ 4/2	
Cefalotina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
Ertapenem	10	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 8	≤ 2	
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	
Vancomicina ⁴	30			≥ 15		≤ 4	Halo < 14 mm, determinar CIM
Eritromicina ⁵	15	≤ 13	14-22	≥ 23	≥ 8	≤ 0,5	
Clindamicina ⁵	2	≤ 14	15-20	≥ 21	≥ 4	≤ 0,5	
Telitromicina	15	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 4	≤ 1	
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1	
Cotrimoxazol	1,25/23,75	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38	
Linezolid	30	-	-	≥ 21	-	≤ 4	
Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4	

¹ Un borde cortante del halo de la penicilina, sea cual sea su tamaño, indica producción de betalactamasa y, por tanto, resistencia a penicilina y aminopenicilinas. El halo en bisel es indicador de que la cepa es no productora de betalactamasa, aunque en este caso es adecuado confirmarlo mediante una prueba específica de detección de la enzima.

² Las cepas oxacilina⁶ son resistentes a todos los betalactámicos, incluyendo los carbapenems. La resistencia a oxacilina puede expresarse como homo o heteroresistencia, en este caso se observan colonias o un ligero velo en el interior del halo (véase detección de resistencia a oxacilina en el texto).

³ La técnica de difusión para oxacilina solo es útil para *S. aureus* y *S. epidermidis*. En el resto de especies, no existe buena correlación entre los halos y la resistencia, por lo que es necesario estudiar directamente la síntesis de PBP 2a.

⁴ Si se realiza la técnica de difusión, confirmar la resistencia por técnica de dilución en toda cepa con halos menores de 14 mm. Se ha sugerido utilizar una placa de agar BHI con 6 µg/ml de vancomicina.

⁵ Eritromicina⁶/clindamicina⁶ sin antagonismo (mecanismo de elujo), informar la clindamicina como sensible. Eritromicina⁶/clindamicina⁶ con antagonismo (fenotipo MLS inducible), la clindamicina se ha de considerar resistente.

β-lac: β-lactamasa. R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado (ver texto).

Guillermo Prats Pastor, Microbiología Clínica. 2005.



Tabla 8. Clasificación de los antibióticos según su estructura química.

PENICILINAS				
Penicilinas Naturales	Penicilina G Sódica Penicilina G Potásica Penicilina G Procaínica Penicilina G Clemizol Penicilina G Benzatínica Penicilina Potásica Fenoximetil Penicilina		Cefmetazol Cefminox Cefotetán	Sisomicina Isepamicina Tobramicina Kanamicina Espectinomicina
Aminopenicilinas	Amoxicilina Ampicilina Hetacilina Bacampicilina Cicloclina Epilina Metampicilina Pivampicilina Talpicilina	Cefalosporinas de Tercera Generación	Cefmanoxima Ceftazidima Cefodizina Ceftizoxima Cefoperazona Ceftriaxona Cefotaxima Maxilactam Cefsulodina Cefetamet Cefixima Cefpodoxima Ceftibuleno	GLUCOPEPTIDOS Vancomicina Teicoplanina
Penicilinas Isoxazólicas	Claxacilina Flucloxacilina Nafcilina Dicloxacilina Meticilina Oxacilina	Cefalosporinas de Cuarta Generación	Cefepima Cefpiroma	OXAZOLIDINONAS Linezolid
Carboxipenicilinas	Carbenicilina Ticarcilina	CARBAPENEMICOS		RIFAMICINAS Rifampicina Rifabulina
Ureidopenicilinas	Apalcilina Azlocilina Furazlocilina Mezlocilina Piperacilina Sulbenicilina	MONOBACTAMICOS		HIDRACIDAS Isoniacida
INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS				POLIPÉPTIDOS Bacitracina Capreomicina Gramicidina Polimixina B y E
I. B. L.	Acido Clavulánico Sulbactam Tazobactam			QUINOLONAS
CEFALOSPORINAS		14 átomos	Clarithromicina Diritromicina Eritromicina Roxitromicina	Primera Generación
Cefalosporina de Primera Generación	Cefadroxilo Cefalexina Cefaloglicina Cefradina Cefapirina Cefazolina Cefaloridina Cefalotina	15 átomos (Azólicos)	Aztreonam	Acido nalidixico Acido oxalínico Acido pipemídico Cinoxacina Rosoxacina
Cefalosporinas de Segunda Generación	Cefuroxima Cefuroxima -Axetil Cefaclor Cefprozil Cefamandol Cefonicid Ceforonida Cefotiam Cefoxitina	16 átomos	Diacetilmidamicina Espiramicina Josamicina	Segunda Generación
		Cetóidos	Telitromicina	Ciprofloxacina Enoxacina Lomefloxacina Norfloxacina Ofloxacina Peфлоxacina Rufloxacina
		ESTREPTOGRAMINAS		Tercera Generación
			Quinupristina-Dalfopristina	Gatifloxacina Espirilofloxacina Grepofloxacina Pasifloxacina Temofloxacina
		AMINOGLUCOSIDOS		Cuarta Generación
			Amikacina Neomicina Estreptomina Netilmicina Gentamicina	Clinafloxacina Moxifloxacina Trovafloxacina
				Sulfonamidas
				Sulfas de uso sistémico
				Sulfadiazina Sulfadoxima Sulfisoxazol Sulfametoxazol
				Sulfas de uso tópico
				Sulfacetamida Sulfadiazina argéntica
				NITROFURANOS
				Furazolidona Nifurtimox Nitrofurantoina Nitrofurazona
				NITROMIDAZOLES
				Metronidazol Secnidazol Tinidazol Ornidazol

Fuente: Dr. Byron Nuñez F.



ANEXO 10. COLORANTES Y MEDIOS DE CULTIVOS PARA HONGOS.

AGAR DEXTROSA SABOURAUD

USO

Para cultivo y conservación de hongos patógenos y no patógenos, particularmente dermatofitos, levaduras y microorganismos acidúricos a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

Las peptonas proporcionan factores de crecimiento y fuente de nitrógeno. La dextrosa es la fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. El pH ácido de 5.6 favorece el crecimiento de hongos, especialmente dermatofitos y ayuda en la inhibición de flora contaminante. Cuando los materiales en estudio presentan abundantes contaminantes, el aislamiento mejora si se adiciona al medio de cultivo sustancias antimicrobianas selectivas, como lo reporta Georg y Col., que recomienda agregar asepticamente cicloheximida, penicilina y estreptomina antes de usarlo, inhibiendo de esta forma la flora contaminante que interfiera en el cultivo de hongos.

La adición de antibióticos de amplio espectro inhibe una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El medio de cultivo se siembra de acuerdo a las indicaciones con la muestra de ensayo. Los hongos desarrollados se examinan micro y macroscópicamente.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Agar	15.0
Dextrosa	40.0
Peptona especial	10.0
	pH 5.6 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 65 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Cuando se requiera el medio en tubo de ensayo, distribuir el volumen requerido antes de esterilizar y posteriormente enfriar en posición inclinada. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.



COLORANTE LACTOFENOL AZUL DE ALGODON

Reactivos:

1. Acido láctico.....20ml
2. Glicerol.....40ml
3. Fenol concentrado.....20ml o 20g
4. Agua destilada.....20ml
5. Azul de algodón.....0.05g

1. En un vaso de precipitados mezclar reactivos 1, 2, y 3.
2. A parte disolver 0.05g de azul de algodón en los 20ml de agua destilada.
3. Una vez que se encuentran completamente disueltos los reactivos; mezclar las soluciones de paso 1 y 2.
4. Mantener en frascos ámbar a temperatura ambiente.

REACTIVO PARA EXAMEN EN FRESCO DE HONGOS HIDRÓXIDO DE POTASIO AL 10% (KOH 10%)

Reactivos:

1. KOH.....10g
2. Glicerol.....10ml
3. Agua destilada.....80ml

Mezclar los 3 reactivos, disolver completamente y guardar la solución en frasco goteros color ámbar. Mantener a temperatura ambiente.



ANEXO 11. Técnicas Parasitoscópicas.

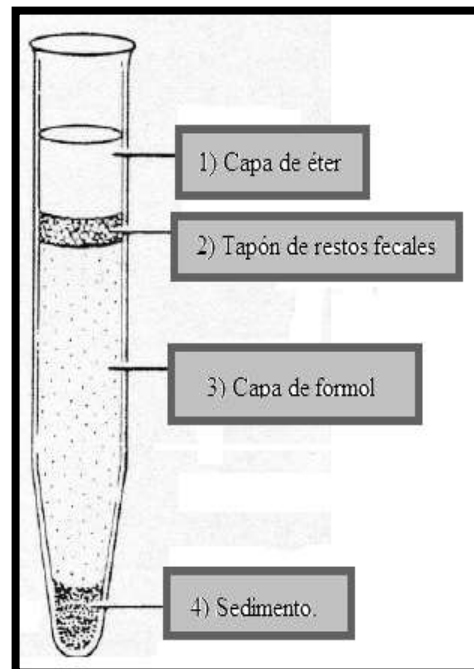
TÉCNICA MICROSCÓPICA DIRECTA

1. En un portaobjetos limpio, desengrasado y seco; se colocar en uno de sus extremos una gota de solución salina fisiológica.
2. En el otro extremo colocar una gota de lugol.
3. Con un aplicador de madera se agrega a cada gota una pequeña cantidad de muestra (heces).
4. Homogenizar y retirar materia gruesa.
5. Colocar cubreobjetos y revisar al microscopio a 10x y 40x.

MÉTODO DE FORMOL- ÉTER O DE RITCHIE

La dilución de una muestra de materia fecal en soluciones cuya baja densidad, permite a las estructuras de mayor peso, sedimentar en el recipiente que las contenga.

- 1- Filtrar 10 ml de suspensión de heces por un embudo con una capa de gasa.
- 2- Recoger 10 ml del filtrado sobre un tubo de centrifuga.
- 3- Centrifugar 5 minutos a 2000-2500 rpm.
- 4- Descartar el sobrenadante y el sedimento se resuspende en SSF.
- 5- Repetir esta operación 3 veces o hasta que el sobrenadante quede límpido o transparente.
- 6- Resuspender el sedimento en 10ml de formol al 10%. Dejar 5 a 10 minutos en reposo.
- 7- Agregar 3-5 ml de éter etílico.
- 8- Tapar con tapón de goma y agitar vigorosamente 30 segundos para extraer las grasas.
- 9- Centrifugar 2 minutos a 2000 rpm.
- 10- Se forman cuatro capas: 1) capa de éter, 2) tapón de restos fecales, 3) capa de formol, 4) sedimento.
- 11- Descartar las 3 capas primeras, conservando el sedimento.
- 12- Tomar con la pipeta Pasteur una muestra del sedimento y colocarla sobre un portaobjetos.
- 13- Agregar una gota de lugol y colocar el cubreobjetos.
- 14- Examinar con microscopio el sedimento.

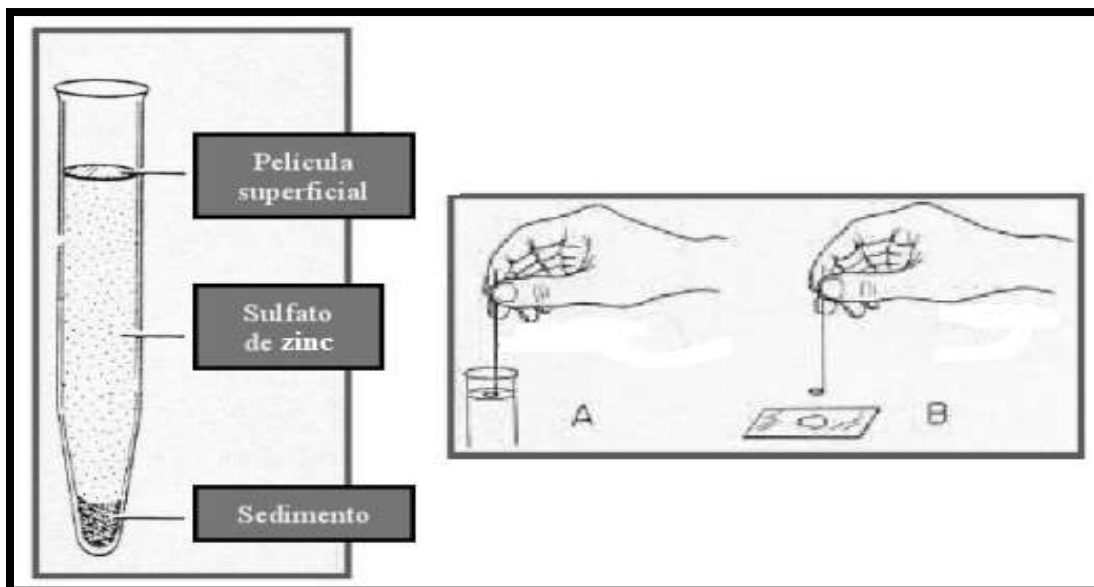




MÉTODO DE FAUST O DE SULFATO DE ZINC AL 33%

La concentración de sulfato de zinc para hacer flotar los elementos parasitarios tiene un peso específico de 1.180. Solución acuosa de sulfato de zinc puro: 333 g. Agua destilada c.s.p.: 1.000 ml

- 1- Mezclar 2-3 gramos de heces con 10 ml de agua. Homogenizar.
- 2- Tamizar a través de un colador metálico o Filtrar sobre gasa en un embudo.
- 3- Recoger 10 ml del filtrado sobre un tubo de centrifuga.
- 4- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
- 5- Descartar el sobrenadante y resuspender nuevamente en agua.
- 6- Repetir esta operación 3 veces o hasta que el sobrenadante quede límpido.
- 7- Agregar al sedimento final 2 o 3 ml de solución de sulfato de zinc al 33% y homogeneizar con varilla.
- 8- Centrifugar 1 o 2 minutos a 1500 rpm.
- 9- Completar con sulfato de zinc el tubo de centrifuga sin volver a homogeneizar hasta la formación de un menisco en la superficie del tubo.
- 10- Dejar reposar durante 10 min.
- 11- Extraer con el asa bacteriológica unas gotas de la película superficial haciéndolo con sumo cuidado para evitar que por agitación se destruya la película.
- 12- Colocar esta muestra en un portaobjetos limpio y seco.
- 13- Agregar una unas gotas de lugol y un cubreobjetos.
- 14- Observar al microscopio.



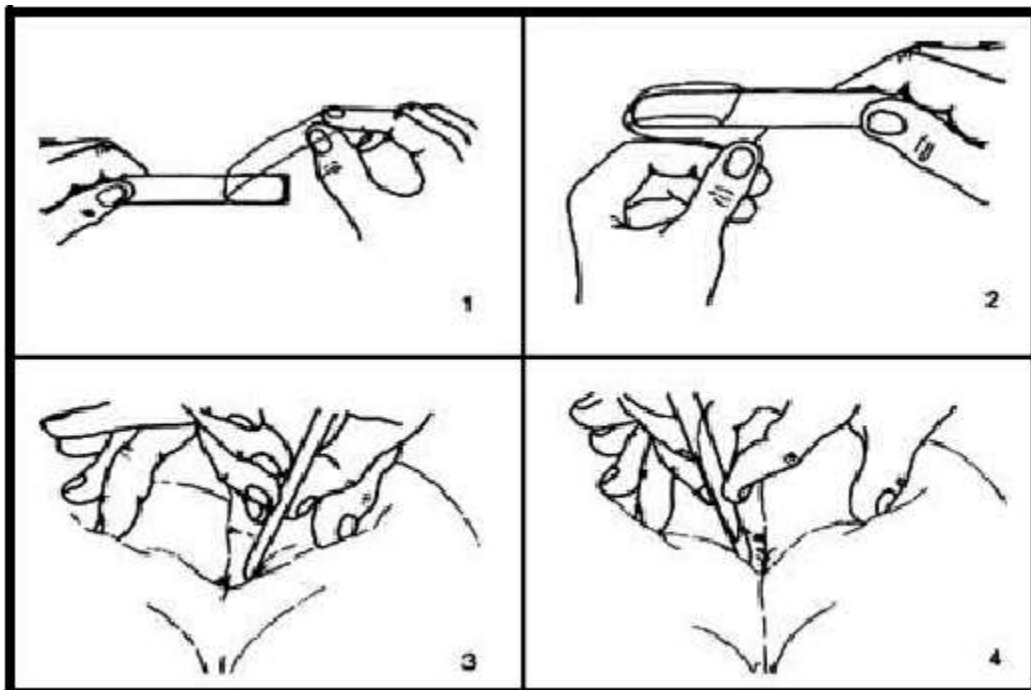


TÉCNICA DE GRAHAM O PRUEBA DEL PARCHE:

La recolección de la muestra se efectúa por la mañana, sin que el paciente haya defecado, efectuando su limpieza personal o cambiada de ropa interior.

La técnica se realizará de la siguiente manera:

1. Se coloca al paciente en posición genupectoral. Exponiendo el esfínter anal.
2. En un abatelenguas se le aplica longitudinalmente un pedazo de cinta adhesiva a todo lo largo de éste, dejando un sobrante para fijar un papel en blanco, donde se anotará el nombre de la persona, edad, sexo.
3. Cuidadosamente separar los glúteos con una mano y con la otra presione la zona perianal con la cinta varias veces, tanto en la zona izquierda como en la derecha de los pliegues.
4. Colocar en un porta objetos limpio y desengrasado dos gotas de alcohol y éter (7:3)
5. Colocar la cinta adhesiva a lo largo de un portaobjetos con la cara adhesiva contra la superficie del mismo la cual.
6. Examinar al microscopio.





**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002, PROTECCION
AMBIENTAL-SALUD AMBIENTAL-RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-
INFECCIOSOS- CLASIFICACION Y ESPECIFICACIONES DE MANEJO**

INDICE

0. Introducción
1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones y terminología
4. Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos
5. Clasificación de los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos
6. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos
7. Grado de concordancia con normas y lineamientos internacionales y con las normas mexicanas tomadas como base para su elaboración

0. Introducción

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas, que representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; mismos que serán manejados en términos de la propia ley, su Reglamento y normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia, correspondiéndole a la citada SEMARNAT su regulación y control.

Con fecha de 7 de noviembre de 1995, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten servicios de atención médica.

Los establecimientos de atención médica son regulados por la Secretaría de Salud por lo que en la revisión de la norma mencionada, se incluye a los representantes del sector.

Esta revisión consideró las características de los diferentes tipos de unidades médicas que prestan atención a poblaciones rurales.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos se han venido manejando en términos de las regulaciones ambientales antes señaladas, sin embargo fue necesario actualizar la NOM-087-ECOL-1995, tomándose en consideración las experiencias y competencias de los sectores involucrados en su cumplimiento, con el fin de que sus disposiciones sean operativas y adecuadas para proteger el medio ambiente y la salud de la población en general.

1. Objetivo y campo de aplicación

La presente Norma Oficial Mexicana establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos así como las especificaciones para su manejo.

Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria para los establecimientos que generen residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios a terceros que tengan relación directa con los mismos.

2. Referencias

Norma Oficial Mexicana NOM-052-ECOL-1993, Que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 22 de octubre de 1993. Esta Norma contiene la nomenclatura en términos del Acuerdo Secretarial publicado el 29 de noviembre de 1994, por el cual se actualiza la nomenclatura de 58 normas oficiales mexicanas.



3. Definiciones y terminología

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana, se consideran las definiciones contenidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, su Reglamento en materia de Residuos Peligrosos, la Ley General de Salud, sus Reglamentos, y las siguientes:

3.1 Agente biológico-infeccioso

Cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades cuando está presente en concentraciones suficientes (inóculo), en un ambiente propicio (supervivencia), en un hospedero susceptible y en presencia de una vía de entrada.

3.2 Agente enteropatógeno

Microorganismo que bajo ciertas circunstancias puede producir enfermedad en el ser humano a nivel del sistema digestivo, se transmite vía oral-fecal.

3.3 Bioterio

Es un área o departamento especializado en la reproducción, mantenimiento y control de diversas especies de animales de laboratorio en óptimas condiciones, los cuales son utilizados para la experimentación, investigación científica y desarrollo tecnológico.

3.4 Carga útil

Es el resultado de la sustracción del peso vehicular al peso bruto vehicular.

3.5 Centro de acopio

Instalación de servicio que tiene por objeto resguardar temporalmente y bajo ciertas condiciones a los residuos peligrosos biológico-infecciosos para su envío a instalaciones autorizadas para su tratamiento o disposición final.

3.6 Cepa

Cultivo de microorganismos procedente de un aislamiento.

3.7 Establecimientos generadores

Son los lugares públicos, sociales o privados, fijos o móviles cualquiera que sea su denominación, que estén relacionados con servicios de salud y que presten servicios de atención médica ya sea ambulatoria o para internamiento de seres humanos y utilización de animales de bioterio, de acuerdo con la tabla 1 del presente instrumento.

3.8 Irreconocible

Pérdida de las características físicas y biológico-infecciosas del objeto para no ser reutilizado.

3.9 Manejo

Conjunto de operaciones que incluyen la identificación, separación, envasado, almacenamiento, acopio, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

3.10 Muestra biológica

Parte anatómica o fracción de órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis.

3.11 Órgano

Entidad morfológica compuesta por la agrupación de tejidos diferentes que concurren al desempeño de un trabajo fisiológico.

3.12 Prestador de servicios



Empresa autorizada para realizar una o varias de las siguientes actividades: recolección, transporte, acopio, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos biológico-infecciosos.

3.13 Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI)

Son aquellos materiales generados durante los servicios de atención médica que contengan agentes biológico-infecciosos según son definidos en esta Norma, y que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

3.14 Sangre

El tejido hemático con todos sus elementos.

3.15 SEMARNAT

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

3.16 SSA

Secretaría de Salud.

3.17 Separación

Segregación de las sustancias, materiales y residuos peligrosos de iguales características cuando presentan un riesgo.

3.18 Tejido

Entidad morfológica compuesta por la agrupación de células de la misma naturaleza, ordenadas con regularidad y que desempeñan una misma función.

3.19 Tratamiento

El método físico o químico que elimina las características infecciosas y hace irreconocibles a los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

4. Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana se consideran residuos peligrosos biológico-infecciosos los siguientes:

4.1 La sangre

4.1.1 La sangre y los componentes de ésta, sólo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras, hematopoyéticas y las fracciones celulares o acelulares de la sangre resultante (hemoderivados).

4.2 Los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos

4.2.1 Los cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico-infecciosos.

4.2.2 Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.

4.3 Los patológicos

4.3.1 Los tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol.

4.3.2 Las muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento.

4.3.3 Los cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.

4.4 Los residuos no anatómicos



Son residuos no anatómicos los siguientes:

4.4.1 Los recipientes desechables que contengan sangre líquida.

4.4.2 Los materiales de curación, empapados, saturados, o goteando sangre o cualquiera de los siguientes fluidos corporales: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido Céfal-Raquídeo o líquido peritoneal.

4.4.3 Los materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener éstos, de pacientes con sospecha o diagnóstico de tuberculosis o de otra enfermedad infecciosa según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.

4.4.4 Los materiales desechables que estén empapados, saturados o goteando sangre, o secreciones de pacientes con sospecha o diagnóstico de fiebres hemorrágicas, así como otras enfermedades infecciosas emergentes según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.

4.4.5 Materiales absorbentes utilizados en las jaulas de animales que hayan sido expuestos a agentes enteropatógenos.

4.5 Los objetos punzocortantes

4.5.1 Los que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.

5. Clasificación de los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos

5.1 Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana, los establecimientos generadores se clasifican como se establece en la tabla 1.

TABLA 1

NIVEL I	NIVEL II	NIVEL III
Unidades hospitalarias de 1 a 5 camas e instituciones de investigación con excepción de los señalados en el Nivel III. Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 1 a 50 muestras al día. Unidades hospitalarias psiquiátricas. Centros de toma de muestras para análisis clínicos.	Unidades hospitalarias de 6 hasta 60 camas; Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 51 a 200 muestras al día; Bioterios que se dediquen a la investigación con agentes biológico-infecciosos, o Establecimientos que generen de 25 a 100 kilogramos al mes de RPBI.	Unidades hospitalarias de más de 60 camas; Centros de producción e investigación experimental en enfermedades infecciosas; Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis a más de 200 muestras al día, o Establecimientos que generen más de 100 kilogramos al mes de RPBI.

5.2 Los establecimientos generadores independientes del Nivel I que se encuentren ubicados en un mismo inmueble, podrán contratar los servicios de un prestador de servicios común, quien será el responsable del manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.



6. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos.

6.1 Los generadores y prestadores de servicios, además de cumplir con las disposiciones legales aplicables, deben:

6.1.1 Cumplir con las disposiciones correspondientes a las siguientes fases de manejo, según el caso:

- a) Identificación de los residuos.
- b) Envasado de los residuos generados.
- c) Almacenamiento temporal.
- d) Recolección y transporte externo.
- e) Tratamiento.
- f) Disposición final.

6.2 Identificación y envasado

6.2.1 En las áreas de generación de los establecimientos generadores, se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme a la tabla 2 de esta Norma Oficial Mexicana. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

TABLA 2

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	COLOR
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

- a) Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (Apéndice Normativo), deberán cumplir los valores mínimos de los parámetros indicados en la tabla 3 de esta Norma Oficial Mexicana.

Las bolsas se llenarán al 80 por ciento (80%) de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas.



TABLA 3

PARAMETRO	UNIDADES	ESPECIFICACIONES
Resistencia a la tensión	Kg/cm ²	SL: 140 ST: 120
Elongación	%	SL: 150 ST: 400
Resistencia al rasgado	G	SL: 90 ST: 150

SL: Sistema longitudinal.

ST: Sistema transversal.

6.2.2 Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique “RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLOGICO-INFECIOSOS” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Apéndice Normativo).

- La resistencia mínima de penetración para los recipientes tanto para punzocortantes como para líquidos, debe ser de 12.5 N (doce punto cinco Newtons) en todas sus partes y será determinada por la medición de la fuerza requerida para penetrar los lados y la base con una aguja hipodérmica calibre 21 x 32 mm mediante calibrador de fuerza o tensiómetro.
- Los recipientes para los residuos peligrosos punzocortantes y líquidos se llenarán hasta el 80% (ochenta por ciento) de su capacidad, asegurándose los dispositivos de cierre y no deberán ser abiertos o vaciados.
- Las unidades médicas que presten atención a poblaciones rurales, con menos de 2,500 habitantes y ubicadas en zonas geográficas de difícil acceso, podrán utilizar latas con tapa removible o botes de plástico con tapa de rosca, con capacidad mínima de uno hasta dos litros, que deberán marcar previamente con la leyenda de “RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLOGICO-INFECIOSOS”.

6.2.3 Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructible por métodos físicos, deberá contar con la leyenda que indique “RESIDUOS PELIGROSOS LIQUIDOS BIOLOGICO-INFECIOSOS” y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Apéndice Normativo)

En caso de que los residuos líquidos no sean tratados dentro de las instalaciones del establecimiento generador, deberán ser envasados como se indica en la tabla 2 de esta Norma Oficial Mexicana.

6.3 Almacenamiento

6.3.1 Se deberá destinar un área para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infeciosos.



Los establecimientos generadores incluidos en el Nivel I de la tabla 1 de esta Norma Oficial Mexicana, quedan exentos del cumplimiento del punto 6.3.5 y podrán ubicar los contenedores a que se refiere el punto 6.3.2 en el lugar más apropiado dentro de sus instalaciones, de manera tal que no obstruyan las vías de acceso.

6.3.2 Los residuos peligrosos biológico-infecciosos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico con tapa y ser rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, con la leyenda “RESIDUOS PELIGROSOS BIOLOGICO-INFECCIOSOS”.

6.3.3 El periodo de almacenamiento temporal estará sujeto al tipo de establecimiento generador, como sigue:

- (a) Nivel I: Máximo 30 días.
- (b) Nivel II: Máximo 15 días.
- (c) Nivel III: Máximo 7 días.

6.3.4 Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C (cuatro grados Celsius), en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

6.3.5 El área de almacenamiento temporal de residuos peligrosos biológico-infecciosos debe:

- a) Estar separada de las áreas de pacientes, almacén de medicamentos y materiales para la atención de los mismos, cocinas, comedores, instalaciones sanitarias, sitios de reunión, áreas de esparcimiento, oficinas, talleres y lavanderías.
- b) Estar techada, ser de fácil acceso, para la recolección y transporte, sin riesgos de inundación e ingreso de animales.
- c) Contar con señalamientos y letreros alusivos a la peligrosidad de los mismos, en lugares y formas visibles, el acceso a esta área sólo se permitirá al personal responsable de estas actividades.
- d) El diseño, construcción y ubicación de las áreas de almacenamiento temporal destinadas al manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos en las empresas prestadoras de servicios, deberán ajustarse a las disposiciones señaladas y contar con la autorización correspondiente por parte de la SEMARNAT.
- e) Los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos que no cuenten con espacios disponibles para construir un almacenamiento temporal, podrán utilizar contenedores plásticos o metálicos para tal fin, siempre y cuando cumplan con los requisitos mencionados en los incisos a), b) y c) de este numeral.

6.3.6 Los residuos peligrosos biológico-infecciosos podrán ser almacenados en centros de acopio, previamente autorizados por la SEMARNAT. Dichos centros de acopio deberán operar sistemas de refrigeración para mantener los residuos peligrosos biológico-infecciosos a una temperatura máxima de 4°C (cuatro grados Celsius) y llevar una bitácora de conformidad con el artículo 21 del Reglamento en materia de Residuos Peligrosos de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. El tiempo de estancia de los residuos en un centro de acopio podrá ser de hasta treinta días.

6.4 Recolección y transporte externo

6.4.1 La recolección y el transporte de los residuos peligrosos biológico-infecciosos referidos en esta Norma Oficial Mexicana, deberá realizarse conforme a lo dispuesto en los ordenamientos jurídicos aplicables y cumplir lo siguiente:



a) Sólo podrán recolectarse los residuos que cumplan con el envasado, embalado y etiquetado o rotulado como se establece en el punto 6.2 de esta Norma Oficial Mexicana.

b) Los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deben ser compactados durante su recolección y transporte.

c) Los contenedores referidos en el punto 6.3.2 deben ser desinfectados y lavados después de cada ciclo de recolección.

d) Los vehículos recolectores deben ser de caja cerrada y hermética, contar con sistemas de captación de escurrimientos, y operar con sistemas de enfriamiento para mantener los residuos a una temperatura máxima de 4°C (cuatro grados Celsius).

Además, los vehículos con capacidad de carga útil de 1,000 kg o más deben operar con sistemas mecanizados de carga y descarga.

e) Durante su transporte, los residuos peligrosos biológico-infecciosos sin tratamiento no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o de origen industrial.

6.4.2 Para la recolección y transporte de residuos peligrosos biológico-infecciosos se requiere la autorización por parte de la SEMARNAT. Dicho transporte deberá dar cumplimiento con los incisos a), b), d) y e) del numeral 6.4.1 de esta Norma Oficial Mexicana.

6.5 Tratamiento

6.5.1 Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final en los sitios autorizados.

6.5.2 La operación de sistemas de tratamiento que apliquen tanto a establecimientos generadores como prestadores de servicios dentro o fuera de la instalación del generador, requieren autorización previa de la SEMARNAT, sin perjuicio de los procedimientos que competan a la SSA de conformidad con las disposiciones aplicables en la materia.

6.5.3 Los residuos patológicos deben ser incinerados o inhumados, excepto aquellos que estén destinados a fines terapéuticos, de investigación y los que se mencionan en el inciso 4.3.2 de esta Norma Oficial Mexicana. En caso de ser inhumados debe realizarse en sitios autorizados por la SSA.

6.6. Disposición final

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos tratados e irreconocibles, podrán disponerse como residuos no peligrosos en sitios autorizados por las autoridades competentes.

6.7 Programa de contingencias

Los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios deberán contar con un programa de contingencias en caso de derrames, fugas o accidentes relacionados con el manejo de estos residuos

7. Grado de concordancia con normas y lineamientos internacionales y con las normas mexicanas tomadas como base para su elaboración.

7.1 Esta Norma Oficial Mexicana no concuerda con ninguna Norma Internacional por no existir referencia en el momento de su elaboración, ni existen normas mexicanas que hayan servido de base para su elaboración.



REFERENCIAS POR TEMA

Bioseguridad

- Ω **GAMAZO**, Carlos; Ignacio López; Goñi Ramón Díaz. (2005). *Manual práctico de microbiología*, 3ª ed. Barcelona, España: Masson. 235 págs.
- Ω **Organización Mundial de la Salud**. (2005). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ª edición, Ginebra Suiza: OMS. 223 págs.
- Ω **AQUIAHUATL** Ramos, María de los Ángeles: María de Lourdes Pérez Chabela. (2004). *Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, D.F. 9-10 págs.
- Ω **SECRETARÍA DE SALUD**. (2003). *Guía para el manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos en unidades de salud*. México. 31 págs.
- Ω **NORMA OFICIAL MEXICANA.NOM-087-ECOL-SSA1-2002: Clasificación y especificaciones de manejo de los residuos peligrosos biológicos infecciosos**. Protección ambiental y Salud ambiental. México.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

Esterilización

- Ω **SUSPENSIÓN BACTERIANA**(5/06/12):
http://virus.usal.es/web/demo_fundacua/demo1/shigella.html
- Ω **AQUIAHUATL** Ramos, María de los Ángeles: María de Lourdes Pérez Chabela. (2004). *Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General*,. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, D.F. 13-17 págs.
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana.6ed.1969 págs.
- Ω **TORTORA**, Gerard J.; Berdell R. Funke, Christine L. Case. (2007). *Introducción a la microbiología*.9ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 187-197 pág.
- Ω **INDICADORES FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA LA ESTERILIZACIÓN** (08/10/12):<http://es.scribd.com/doc/15558603/Indicadores-biologicos-y-esterilizacion>



Desinfección

- Ω **ROMERO** Cabello, Raúl. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3ª ed. México: Médica Panamericana. 41-46 págs.
- Ω **FORBES**, Betty. Daniel Sahn. (2004). *Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico*. 11ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 19-21 págs.
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana. 6ed. 1969 págs.
- Ω Benzal (10/10/20): <http://www.farmalta.com/blog/?p=24> ó <http://www.ecured.cu/index.php/Benzalconio>
- Ω Nitrito de sodio (10/10/12): http://www.sertox.com.ar/img/item_full/NITRITO%20Revista.pdf

Medios de cultivo

- Ω **FORBES**, Betty. Daniel Sahn. (2004). *Bailey & Scott.: Diagnóstico Microbiológico*. 11ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 137- 153 págs.
- Ω **GARCÍA** Martos, Pedro. Fernando Paredes Salido, María Teresa Fernández del Barrio. (1994). *Microbiología Clínica Práctica*. 2ª ed. Servicio Publicaciones UCA. 482 págs.
- Ω Tipos de hemolisis (04/06/12): <http://www.losmicrobios.com.ar/microbios/clasificaciones.cfm?CLASI=1>
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana. 6ed. 1969 págs.
- Ω MEDIO DE CULTIVO. Bacteriología General. Catálogo 1001.DIBICO S.A. DE C.V. MEXICO, D.F. <http://www.dibico.com/productos.php?t=med&m=d&IdCat=1>

Técnicas de sembrado

- Ω **GARCÍA** Martos, Pedro. Fernando Paredes Salido, María Teresa Fernández del Barrio. (1994). *Microbiología Clínica Práctica*. 2ª ed. Servicio Publicaciones UCA. 73 – 82 págs.
- Ω **AQUIAHUATL** Ramos, María de los Ángeles: María de Lourdes Pérez Chabela. (2004). *Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, D.F. 37-40 págs.



Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana. 6ed. 1969 págs.

Tinciones

Ω **GARCÍA** Martos, Pedro. Fernando Paredes Salido, María Teresa Fernández del Barrio. (1994). *Microbiología Clínica Práctica*. 2ª ed. Servicio Publicaciones UCA. 33 - 48 págs.

Ω **GRANADOS** Pérez, Raquel; Ma. Carmen Villaverde Peris. (2003). *Microbiología: Bacteriología, características y clasificación de bacteriana. Virología. Características y técnicas bioquímicas*. Tomo II. España: Thomson. 223- 248 págs.

Ω **AQUIAHUATL** Ramos, María de los Ángeles; María de Lourdes Pérez Chabela. (2004). *Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, D.F. 21-24 págs.

Ω **TORTORA**, Gerard J., Berdell R. Funke, Christine L. Case. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 87 págs.

Ω Técnicas Básicas en el Laboratorio de Microbiología. Tinciones (04/05/12)
<http://www.youtube.com/watch?v=1Zu6HHcEXSA&feature=related>

Ω M. en C. Guadalupe Guedea Fernández. Tinción de Gram (27/02/2012)
<http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EElpZEVkykPMncqcmd.php>

Ω Técnicas de tinción (12/03/12):
<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>

Ω Tipos de Microorganismos. Carmen Eugenia Piña López. (06/09/2011):
http://www.unad.edu.co/fac_ingenieria/pages/Microbiologia_mutimedia/bact_verda_dera.htm

Pruebas Bioquímicas Primarias y Secundarias

Ω **BAILÓN** Lira, Lucia; Roberto Cruz González Meléndez y Armando Cervantes Sandoval. (2003). *Atlas de Pruebas bioquímicas para Identificar Bacterias*. México, D.F.: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 175 págs.

Ω **FORBES**, Betty. Daniel Sahn. (2004). *Bailey & Scott.: Diagnóstico Microbiológico*. 11ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 154-163 págs.



-
- Ω **MAC FADDIN**, J.F. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia Médica*. Traductor S. Rondidone, O. Glovahello. (3ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. 850págs.
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Médica Panamericana. 6ed. 1969 págs.

Antimicrobianos

- Ω **GARCÍA** Martos, Pedro. Fernando Paredes Salido, María Teresa Fernández del Barrio. (1994). *Microbiología Clínica Práctica*. 2ª ed. Servicio Publicaciones UCA. 125 - 151 págs.
- Ω **FORBES**, Betty. Daniel Sahn. (2004). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico*. 11ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 236 - 258 págs.
- Ω **MEDINA** Asensio, Jesús. (2000). *Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones*. 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos. 142 págs.
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana. 6ed. 1969 págs.
- Ω **BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs**. 2007/11. 11- 14 págs.
- Ω **COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOL.** Edition de Janvier. 2010.
- Ω **EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING.** *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Versión 2.0, 2012. 73 págs.
- Ω Clasificación de los Antibióticos según su estructura química (13/11/12):
<http://enfermito.blogspot.es/img/TablaATB.pdf>

Parásitos

- Ω **TAY** Zavala, Jorge. Et. al. (2010). *Parasitología Médica de Tay*. 8ª ed. México: Méndez. 510 págs.
- Ω Imagen de *Giardia lamblia* (03/03/12):
<http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSPd06GBK0ExL9d31q-9GJdJf2NamFCgTspk9zKoEZCLHrRp6Y7P7soqmlm>



-
- Ω *Trypanosoma cruzi* (04/03/12)
<http://cesaron-tiempolibre.blogspot.com/2008/12/trypanosoma-cruzi.html>
- Ω **GÁLLEGO** Berenguer, Jaime. (2006). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Barcelona: Universidad de Barcelona. 188 – 191 págs.
- Ω **ROMERO** Cabello, Raúl. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3ª ed. México: Médica Panamericana. 1455-1459 págs.
- Ω **LÓPEZ** Páez, Myriam Consuelo; Augusto corredor Arjona; et. al. (2006). *Atlas de Parasitología*. Colombia: El Manual Moderno y Universidad Nacional de Colombia. 138 págs.
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana. 6ed. 1969 págs.
- Ω **OLIVAS** E. M. C. Evangelina. (2001). *Manual De Laboratorio De Microbiología Básica*. Ciudad Juárez, Chihuahua: Universidad Nacional Autónoma de Ciudad Juárez. 49–59 págs.
- Ω **ROMERO**, Héctor Quiroz. (2005). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México D.F.: Limusa. 151-155 págs.
- Ω Imagen de *Toxoplasma gondii* (11/03/12):
http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/SZ/Toxoplasmosis/body_Toxoplasmosis_il3.htm
- Ω Técnicas Parasitoscópicas (08/02/12):
<http://www.saberdeciencias.com.ar/index.php/apuntes-de-parasitologia/159-diagnostico-de-laboratorio-de-las-parasitosis>

Hongos

- Ω **BONIFAZ**, Alejandro. (1994). *Micología Medica Básica*. México: Méndez. 459 págs.
- Ω **LURÁ** de Calafell María Cristinas, et. al. (1997). *Introducción al estudio de la Micología*. Argentina: UNL. 9- 20 págs.
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana. 6ed. 1969 págs.



Virus

- Ω **HERRERO** Uribe, Libia. **et. al. (2004)**. Procedimientos en virología médica. San José. C. R.: Editorial de la Universidad de Costa Rica. 178 págs.
- Ω Virología diagnóstica. (24/04/12)
<http://www.saberdeciencias.com.ar/index.php/apuntes-de-virologia/180-virologia-diagnostico-virologico-metodos-directos>
- Ω Introducción a los cultivos celulares. (27/04/12)
http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/Biologia_General/cultivos_celulares.pdf.
- Ω **KONEMAN** W. Elmer, Washington C. Winn, et al. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color*. Medica panamericana. 6ed. 1969 págs.