



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DEL MANUAL
DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA GENERAL PARA LA
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

VÍCTOR MANUEL VILLALBA DÍAZ

ASESORES:

M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ
M. EN C. PAOLA EDITH BRISEÑO LUGO



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
SUPERIORES CUAUTITLÁN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Revisión y actualización del Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General para la Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica.

Que presenta el pasante: Víctor Manuel Villalba Díaz

Con número de cuenta: 307717630 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Dra. Alma Lucila Núñez del Arco	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Heidi Johanna Amezcua Hempel	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicado a Sophie

ÍNDICE GENERAL

BIENVENIDO AL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	7
ATENCIÓN	7
PROCEDIMIENTOS DE SEGURIDAD	
REGLAMENTO INTERNO DE LABORATORIOS	8
INDICACIONES ADICIONALES PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	9
MATERIALES, APARATOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO	10
BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	11
ROPA Y EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL	12
MANEJO DE DERRAMES	12
VIDRIOS ROTOS	12
SALPICADURAS EN LA ROPA Y EN LA PIEL	12
AEROSOL	12
MICROSCOPIO COMPUESTO	13
MANEJO DEL MICROSCOPIO COMPUESTO	13
TÉCNICA DE ILUMINACIÓN DE KÖHLER	14
CUIDADO DEL MICROSCOPIO	14
DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	15
INOCULACIÓN	15
MANEJO DEL ASA MICROBIOLÓGICA	15
PROCEDIMIENTO DE FLAMEADO DEL ASA MICROBIOLÓGICA	15
TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE CAJAS PETRI	16
MANEJO DE PIPETAS DE VIDRIO	16
MANEJO DE MICROPIPETAS	16
FLAMEADO DEL CUELLO DE BOTELLAS Y TUBOS DE ENSAYO	16
USO DE LOS ESTÁNDARES DE TURBIDEZ DE MCFARLAND (NEFELÓMETRO)	17
PROCEDIMIENTO DE ESTANDARIZACIÓN	17
IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL	18
INCUBACIÓN	18
LIMPIEZA AL TERMINAR	18
PRÁCTICA I BIOSEGURIDAD	20
PRÁCTICA II ESTERILIZACIÓN	26
PRÁCTICA III DESINFECCIÓN	33
PRÁCTICA IV MEDIOS DE CULTIVO	40
PRÁCTICA V TÉCNICAS DE SEMBRADO	47

PRÁCTICA VI	TINCIONES	54
PRÁCTICA VII	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PRIMARIA	60
PRÁCTICA VIII	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN SECUNDARIA	67
PRÁCTICA IX	ANTIBIOGRAMA	77
PRÁCTICA X	HONGOS	84
PRÁCTICA XI	PROTOZOARIOS	91
PRÁCTICA XII	VIRUS	95

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla I. Material, equipo y aparatos del laboratorio de microbiología.</i>	10
<i>Tabla II. Equipo de protección personal utilizado en el laboratorio de Microbiología.</i>	12
<i>Tabla III. Problemas más comunes en el uso del microscopio óptico compuesto.</i>	14
<i>Tabla IV. Equivalencias y preparación de los estándares de McFarland.</i>	17
<i>Tabla 1. 1. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos</i>	21
<i>Tabla 2. 1. Algunos métodos de esterilización empleados en el laboratorio.</i>	26
<i>Tabla 4. 1. Algunos de los medios de cultivo más utilizados en microbiología.</i>	40
<i>Tabla 5. 1. Morfologías coloniales visibles sobre la superficie de medios de cultivo.</i>	47
<i>Tabla 5. 2. Cepas control para prueba de promoción de crecimiento en medios de cultivo.</i>	51
<i>Tabla 7. 1. Interpretación de la prueba de OF.</i>	62
<i>Tabla 8. 1. Color y rango de vire de los indicadores de pH más utilizados en microbiología.</i>	68
<i>Tabla 8. 2. Resultados de las pruebas IMViC para algunas enterobacterias.</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura I Área de trabajo personal</i>	11
<i>Figura II Estándares de McFarland 0.5, 1 y 2</i>	17
<i>Figura III Plantilla para ajustar la turbidez</i>	18
<i>Figura 1. 1. Técnica de desinfección de manos utilizando solución alcoholada.</i>	22
<i>Figura 1. 2. Técnica de lavado de manos usando agua y jabón.</i>	23
<i>Figura 5. 1. Siembra por dilución americana.</i>	50
<i>Figura 5. 2. Siembra por dilución europea.</i>	50
<i>Figura 5. 3 Siembra por agotamiento.</i>	50

Figura 5. 4 Siembra en rejilla	50
Figura 5. 5 Sembrado masivo.....	50
Figura 6. 1 Tinción negativa de <i>Cryptococcus neoformans</i>	55
Figura 6. 2 Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	56
Figura 6. 3 Tinción de Ziehl-Neelsen para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	56
Figura 6. 4 Tinción de Schaeffer-Fulton para <i>Bacillus subtilis</i>	57
Figura 7. 1. Prueba de catalasa.	61
Figura 7. 2. Prueba de oxidasa.....	61
Figura 7. 3. Prueba de OF.....	62
Figura 7. 4 Motilidad en medio SIM.....	63
Figura 8. 1 Algunas actividades enzimáticas bacterianas útiles para su identificación	68
Figura 9. 1 Método de Kirby-Bauer.....	79
Figura 9. 2 Prueba de E-Test	79
Figura 12. 1 Vías de inoculación de virus en huevos embrionados.....	95
Figura 12. 2 Formación de placas líticas.....	101
Figura 12. 3 Formación de placas líticas.....	101

ÍNDICE DE ENLACES WEB QR

QR 1. Imágenes de equipo y aparatos.....	10
QR 2 Técnica de gota suspendida.....	60
QR 3 Sistema de microcultivo.....	86
QR 4 Imágenes microscópicas de protozoarios.....	92
QR 5 Resultados de la inoculación de embriones.....	97
QR 6 Microscopías de fagos T4.....	99

Siglas y abreviaturas utilizadas en este manual

ACh	Agar Chocolate	LIA	Agar Lisina Hierro	SIM	Sulfuro Indol Motilidad
AS	Agar Sangre	MC	Agar MacConkey	SM	Agar sales y manitol
CMB	Concentración Mínima Bactericida	MH	Mueller-Hinton	spp.	Especies (todas las especies de un género)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria	MIO	Motilidad Indol Ornitina	SSF	Solución Salina Fisiológica
EMB	Eosina Azul de Metileno	MR-VP	Rojo de Metilo-Voges Proskauer	TSI	Triple Azúcar Hierro
KIA	Agar Hierro de Kligler	OF	Oxidación Fermentación	UFC	Unidad Formadora de Colonia
LB	Lysogeny broth: Caldo de Lisogenia	SDA	Agar Dextrosa Sabouraud	UFP	Unidad Formadora de Placa

Bienvenido al Laboratorio de Microbiología

Atención

Algunos de los experimentos de laboratorio incluidos en este manual pueden ser peligrosos si los materiales se utilizan incorrectamente o se procede de manera inadecuada. Hay que tener precaución al trabajar con cualquier microorganismo, productos químicos, equipo de vidrio, flamas expuestas, baños de agua caliente, instrumentos afilados y materiales similares.

Procedimientos de seguridad

El laboratorio de microbiología es el lugar donde se manipulan y examinan cultivos de microorganismos. Esta actividad debe llevarse a cabo con buenas técnicas asépticas y en un espacio limpio y bien organizado. Para trabajar en un ambiente aséptico se requiere que todos los materiales a utilizar estén esterilizados y así inactivar cualquier microorganismo que contengan. Aun cuando el microorganismo en estudio no sea considerado patógeno, usualmente cualquier cultivo de cualquier organismo debe de manipularse como si fuera un patógeno potencial ya que en circunstancias adecuadas podría causar enfermedad.

Cada estudiante debe de aprender y practicar continuamente técnicas de manejo adecuadas para prevenir la contaminación de manos, cabello y ropa con material de cultivo y también proteger a los compañeros de trabajo para evitar fuentes de infección.

En general los procedimientos de seguridad y precauciones que deben de seguirse en el laboratorio de microbiología están diseñados para:

- Mantener a los microorganismos que se van a estudiar dentro de sus contenedores.
- Evitar que los microorganismos ambientales entren en contacto con los cultivos e interfieran con los resultados de los estudios.

Las superficies de trabajo deben de mantenerse limpias con desinfectantes, debe de usarse bata, amarrar el cabello largo y mantener las áreas de trabajo libres de objetos innecesarios.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS

Fecha de revisión: 30/06/2014

Nº Revisión: 03

- 1) Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
- 2) Para todo trabajo realizado en el laboratorio deberá utilizarse bata blanca con manga larga.
- 3) La tolerancia para el inicio de la sesión de laboratorio será hasta de 10 minutos a partir de la hora señalada.
- 4) Por seguridad, no deben cerrarse las puertas del laboratorio con llave durante las prácticas.
- 5) En todo momento deberá mostrarse una conducta adecuada en el área de trabajo.
- 6) Queda prohibido en los laboratorios:
 - a) Tirar basura fuera del cesto.
 - b) Ingerir alimentos y/o bebidas.
 - c) Fumar.
 - d) Recibir visitas.
 - e) La entrada a los inter-laboratorios a toda persona ajena a los mismos.
 - f) Realizar reuniones o convivios en los laboratorios.
 - g) Salir del laboratorio en el horario asignado para la sesión experimental.
 - h) Sentarse sobre las mesas de trabajo.
 - i) Mover el mobiliario de su lugar.
 - j) Utilizar las gavetas para guardar material que no corresponda a la asignatura.
- 7) Los residuos peligrosos deben depositarse en los contenedores destinados para tal fin, entendiendo por residuo peligroso: elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representan un riesgo para el ambiente, la salud o los recursos naturales, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas (Art. 3º de la Ley General del Equilibrio y Protección del Ambiente).
- 8) Dentro del laboratorio no se permite el uso de teléfonos celulares, reproductores de sonido o cualquier medio electrónico de entretenimiento. El uso de las computadoras portátiles queda restringido a temáticas relacionadas con la asignatura.
- 9) El acceso al laboratorio se permitirá únicamente cuando esté presente uno de los profesores del grupo.
- 10) El uso del laboratorio para trabajo extraordinario, deberá programarse con el profesor responsable en un horario que no interfiera con aquel destinado para el desarrollo de las prácticas.
- 11) Para solicitar material y equipo, es requisito indispensable que el alumno llene debidamente el vale de material (FPE-CB-DEX-01-09) y lo entregue a la persona responsable, dejando como depósito la credencial vigente de la UNAM.
- 12) El alumno deberá revisar el material y/o equipo al momento de recibirlo indicando cualquier anomalía (faltante o material dañado) y será devuelto en las condiciones en que se recibió, de no hacerlo, se hará acreedor a las sanciones establecidas en cada laboratorio.
- 13) Es obligación de todos mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo y todo el laboratorio.

Vo. Bo. Comité de Calidad del Departamento de Ciencias Biológicas	
Jefe del Comité de Calidad: Dr. Juan Carlos del Río García 	
Jefes de Sección	Responsables de Calidad
QFB Rosalba Bonilla Sánchez 	QFB Gabriela Escalante Reynoso 
Dr. Salvador Fonseca Coronado 	QFB Ladislao Palomar Morales 
MC Javier Froylán Lazcano Reyes 	QFB Juana Alicia Alquicira Camacho 
MVZ Olivia Adams Vázquez 	MVZ Esp Hugo César López Fariás 
MC Juan Carlos Valladares de la Cruz 	MVZ Graciela Castañeda Aceves 

Indicaciones adicionales para trabajar en el laboratorio de microbiología

1. Leer siempre la práctica antes del comienzo de la sesión de laboratorio. Tener el conocimiento previo de cómo se realizará el trabajo ayudará a prevenir accidentes.
2. Al comienzo y final de cada sesión de laboratorio los estudiantes deben de limpiar la mesa de trabajo con una solución desinfectante, dejándola actuar el tiempo suficiente para la desinfección. Posteriormente limpiar el desinfectante con toallas de papel absorbente y desecharlas en el bote de basura común.
3. Mantener el espacio de trabajo ordenado, limpio y despejado durante la sesión. No colocar objetos innecesarios sobre el área de trabajo como: cuadernos, lápices, celulares, manual de prácticas, etc.
4. Practica buenos hábitos personales desde el comienzo:
 - Rotular adecuadamente el material a utilizar.
 - Sujetar bien el cabello lejos de los hombros.
 - No utilizar joyería dentro laboratorio.
 - Mantener los dedos, plumas y objetos fuera de la boca.
 - Notificar cualquier lesión o herida abierta en las manos.
 - No deambular en el laboratorio; la actividad innecesaria puede causar accidentes y distracciones y favorece la contaminación de los cultivos.
 - No hablar mientras estés trabajando con medios de cultivo estériles.
5. Cada estudiante necesitará:
 - Marcador indeleble de punto fino.
 - Encendedor o cerillos.
 - Toallas de papel absorbente.
 - Rociador con desinfectante.
 - Jabón líquido para manos.
 - Pinzas metálicas de laboratorio.
 - Masking tape.
 - Papel seda para microscopio o microfibra limpia.
6. Si se derrama o tira un cultivo u ocurre algún accidente llamar al profesor inmediatamente. Colocar una toalla de papel sobre el derrame y vaciar desinfectante sobre la toalla. Mantener el desinfectante por 15 minutos, después limpiar el derrame con toallas de papel limpias y desechar las toallas de papel absorbente en el contenedor apropiado. Lavarse las manos.
7. Desechar todos los cultivos y material utilizado en el contenedor (palangana) señalado como “contaminado”, para que después sean esterilizados. Nunca desechar material contaminado en el bote de basura. Nunca desechar líquidos contaminados o cultivos en la tarja.
8. Antes de abandonar el laboratorio lavarse cuidadosamente las manos.

Materiales, aparatos y equipos utilizados en el laboratorio

A continuación se enlistan los equipos, aparatos y materiales básicos para el trabajo de laboratorio en microbiología (Tabla I).



Tabla I. Material, equipo y aparatos del laboratorio de microbiología.

QR 1. Imágenes de equipo y aparatos

Equipo	Uso
Asa bacteriológica en argolla no calibrada (platino/nicromo/plástico)	Sembrado por estrías e inoculaciones en general.
Asa calibrada	Transferencia para inoculación de un volumen exacto (10 y 100 μ L).
Asa recta	Inoculación a partir de colonias muy pequeñas. Sembrado en tubos con medio sólido.
Asa en "L"	Se utiliza principalmente para cultivos de hongos.
Pinzas (metal/plástico)	Manipulación de papel estéril/discos de antibióticos.
Pipeta	Transferencia de volumen exacto de líquidos (a las pipetas serológicas se les coloca en el cuello un tapón de algodón no absorbente y seco para prevenir la contaminación).
Propipeta	Llenado y vaciado de pipetas seguro (nunca pipetear con la boca).
Tubo de ensayo	Pequeños volúmenes (5-10 mL) de medio líquido/agar inclinado o recto/soluciones estériles para inoculación (se colocan en una gradilla).
Matraz Erlenmeyer	Grandes volúmenes de medio líquido para inoculación y almacenaje breve (un tapón de algodón no absorbente previene la contaminación).
Caja Petri (plástico/vidrio)	Plástico: desechable, pre-esterilizada para realizar cultivos sólidos de microorganismos. Vidrio: reutilizable.
Marcador indeleble	Rotulado de cajas Petri, tubos de ensayo, laminillas de microscopio.
Equipo de protección personal	Bata de laboratorio limpia: protección de la ropa y contención del polvo. Lentes de seguridad: previenen salpicaduras en los ojos.
Aparato	Uso
Mechero Bunsen	Proporciona área estéril en un radio de 15 cm. Esterilización de asas metálicas y (con alcohol) pinzas de metal. Flameado de cuellos de tubos.
Autoclave	Esterilización de medios, soluciones y equipos antes y después de usarlos (contaminados).
Horno Pasteur	Esterilización y secado de material de vidrio y metal.
Balanza granataria	Pesar cantidades exactas de sólidos: medios de cultivo deshidratados, sales, entre otros
Incubadora (Estufa bacteriológica)	Mantiene condiciones óptimas y estables de temperatura y humedad para el desarrollo de cultivos. Habitualmente a 37°C
Baño María	Conserva el agar líquido para su uso (50°C).

Termómetro	Revisión de temperaturas de incubadora/baño María.
Frasco para desechos (contiene desinfectante)	Disposición de pipetas usadas y laminillas.
Refrigerador	Almacenaje de materiales termolábiles.
Microscopio, laminillas, cubreobjetos, colorantes, rack de tinción, aceite de inmersión	Observaciones microscópicas.
<hr/>	
Material	Uso
Biológico	Microorganismos, sangre y fluidos corporales a los que se les realizan pruebas bajo medidas de contención apropiadas.
Medios de cultivo	Disponibles como medios completos o ingredientes separados. Proporcionan los nutrimentos necesarios para la proliferación de microorganismos
Desinfectantes	Tratamiento de las superficies de trabajo antes y después de usarse y en derrames accidentales.
Alcohol 70% desnaturalizado	Esterilización de pinzas metálicas y equipo de vidrio por ignición.
Cinta testigo	Cambia de color en respuesta al calor para distinguir los artículos que han recibido tratamiento térmico.
Ampolletas de control biológico de esterilidad	Cambia de color cuando la temperatura correcta se ha aplicado y se mantuvo durante el período de tiempo requerido para efectuar la esterilización.
Algodón no absorbente	Taponos para tubos de ensayo, matraces y pipetas.
Kit de derrames (guantes desechables, desinfectante, toallas absorbentes)	Manejo seguro y disposición de cultivos derramados.

Buenas prácticas de laboratorio de microbiología

Las buenas prácticas de laboratorio son los procedimientos cuyo objetivo se enfoca en:

- Desarrollar habilidades para contener la propagación de los microorganismos y proteger el trabajo práctico de la contaminación con microorganismos de fuentes externas para asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados.
- Resguardar a los estudiantes, maestros y técnicos de cualquier posibilidad de infección.



Figura 1 Área de trabajo personal

Es importante ordenar el área de trabajo cuidadosamente para realizar los procedimientos con seguridad y eficiencia (Fig. 1).

Ropa y equipo de protección personal

La vestimenta y el equipo de protección personal pueden actuar como barrera para reducir al mínimo el riesgo de exposición a aerosoles, salpicaduras e inoculación accidental. Las prendas de vestir y el equipo que se seleccionen dependen de la naturaleza del trabajo que se realice. En el laboratorio los trabajadores llevarán ropa protectora. Antes de abandonar el laboratorio, tendrán que quitarse las prendas protectoras y lavarse las manos. En la Tabla II se muestran algunos elementos de protección personal utilizados en el laboratorio y la protección que ofrecen.

Tabla II. Equipo de protección personal utilizado en el laboratorio de Microbiología.

EQUIPO	PELIGRO EVITADO	CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD
Bata de laboratorio	Contaminación de la ropa	Algodón grueso, manga larga
Delantales de plástico	Contaminación de la ropa	Impermeables
Calzado	Impactos y salpicaduras	Puntera cerrada
Gafas de seguridad	Impactos	Protección lateral
Viseras	Impactos y salpicaduras	Protegen todo el rostro. Se retiran fácilmente en caso de accidente
Mascarillas respiratorias	Inhalación de aerosoles	Desechables
Guantes	Contacto directo con microorganismos Punciones o cortes	De látex, vinilo o nitrilo, aprobados para uso microbiológico

(Fuente: OMS, 2005)

Manejo de derrames

1. Reportar inmediatamente al profesor el derrame de cultivos.
2. El cultivo derramado y los residuos circundantes no deben de ser tocados con las manos sin protección.
3. Utilizando guantes desechables, desinfectar el área cubriendo el derrame con varias capas de papel absorbente; mójalo con un desinfectante apropiado y déjalo actuar por 15 a 30 minutos.
4. Limpia los residuos con un recogedor y colócalos en un contenedor apropiado como una bolsa para autoclave; el recogedor debe de ser descontaminado en autoclave o sumergido en hipoclorito de sodio por 24 horas.

Vidrios rotos

1. Recoger cuidadosamente en un contenedor apropiado.
2. Ingresar al autoclave a 121 °C, 15 lb, 30 minutos.
3. Desecharlo en un contenedor de residuos punzocortantes.

Salpicaduras en la ropa y en la piel

La ropa contaminada debe remojarse en desinfectante. Las salpicaduras en la piel deben tratarse tan pronto como sea posible. Deberán lavarse cuidadosamente con abundante agua y jabón.

Aerosoles

Los derrames también conllevan el riesgo de generar aerosoles (neblina invisible de pequeñas gotas de humedad) que pueden contener microbios y pueden ser inhalados. El riesgo de que

ocurran derrames puede ser disminuido utilizando cultivos en agar en lugar de medios líquidos, cuando sea posible. Debe tenerse cuidado para evitar generar aerosoles durante la práctica. El riesgo es minimizado apegándose con especial atención al uso correcto de las pipetas y la esterilización cuidadosa del asa en el mechero.

Microscopio Compuesto

Un buen microscopio es una herramienta esencial para cualquier laboratorio de microbiología. Existen muchos tipos de microscopios pero el más útil en el trabajo de diagnóstico es el microscopio compuesto; por medio de una serie de lentes y una fuente de luz brillante, magnifica e ilumina objetos diminutos como las bacterias y otros microorganismos que de otra forma serían invisibles. Éste tipo de microscopio será utilizado durante el curso de laboratorio; mientras más lo utilices, comprenderás cuán preciso e indispensable es para estudiar microorganismos presentes en especímenes clínicos y en cultivos.

Los componentes básicos son: una fuente de luz, un condensador que enfoca la luz y dos sistemas de lentes (los objetivos y los oculares) que se utilizan para magnificar la imagen. La limitación de este microscopio es el poder de resolución de la imagen (habilidad para distinguir dos objetos que están separados y no como uno solo). El poder de resolución del microscopio está determinado por la longitud de onda de la luz utilizada para iluminar el sujeto y el ángulo de luz que entra en el lente del objetivo. El poder de resolución es mayor cuando se coloca aceite de inmersión entre el lente del objetivo y la laminilla (típicamente el objetivo de 100 X) debido a que el aceite reduce la dispersión de la luz. Los mejores microscopios tienen un poder de resolución de aproximadamente 0.2 μm que permite observar la mayoría de las bacterias pero no los virus. El índice refractivo de estos organismos y del fondo es similar por lo que deben de teñirse con un colorante para que se puedan observar (Murray, 2012).

Manejo del Microscopio Compuesto

1. Coloca la laminilla a observar y asegúrala en la platina verificando que no se deslice o mueva de posición, de tal forma que la luz que proviene a través del condensador pase a través del centro del área teñida.
2. Coloca el objetivo de bajo poder en posición vertical; mira a través del ocular, si tienes un microscopio binocular, ajusta los dos oculares horizontalmente al ancho entre tus ojos hasta que tengas un campo de visión único y circular. Ahora acerca la platina hacia el objetivo lentamente con el tornillo de ajuste macrométrico hasta que puedas ver pequeños objetos en el campo; asegúrate que el condensador está totalmente levantado y ajusta la luz a una intensidad confortable con el diafragma.
3. Usa el tornillo micrométrico para obtener una imagen tan nítida como sea posible; ahora mueve la laminilla lentamente alrededor del objetivo de bajo poder para observar un panorama de la preparación y seleccionar un área interesante para una observación más cercana en la siguiente magnificación.
4. Cuando has seleccionado el área que deseas observar gira el revólver para utilizar el objetivo seco alto; si ya tenías un enfoque nítido ahora realiza tus ajustes con el tornillo micrométrico y si la laminilla está muy fuera de foco con el nuevo objetivo en su lugar, observa la distancia entre la laminilla y el objetivo y acércalos, pero sin que se toquen. Ahora observando a través del ocular ajusta lentamente primero con el tornillo macrométrico y después con el micrométrico hasta que tengas un buen enfoque.
5. Sin mover la laminilla ni cambiar el enfoque espera al instructor para que demuestre el uso del objetivo de inmersión.

6. Mueve el objetivo seco un poco hacia un lado y coloca una pequeña gota de aceite en la laminilla justo encima de la apertura del condensador, ahora coloca con cuidado el objetivo de inmersión llevándolo con cuidado a su posición y verificando que no toque la laminilla; ahora acércalo hasta que la punta del lente esté sumergida en el aceite pero no esté en contacto con la laminilla, observa a través del ocular y muy lentamente enfoca hacia arriba con el tornillo micrométrico hasta obtener una imagen nítida.
7. Registra tus observaciones.
8. Cuando has terminado tus observaciones baja la platina y remueve la laminilla. Suavemente limpia el aceite del objetivo de inmersión con un trozo de papel seda.

Técnica de iluminación de Köhler

1. Subir el condensador hasta el tope, introduciendo la lente abatible del condensador para lograr la máxima concentración de luz sobre la muestra a observar
2. Enfocar el objeto con un objetivo de poca amplificación, generalmente de 10x
3. Cerrar el diafragma de campo de la lámpara colectora, con lo que se verá proyectado éste sobre la muestra.
4. Bajar el condensador para enfocar el diafragma, de manera que su imagen se proyecte bien definida sobre la muestra.
5. Centrar la imagen del diafragma de campo con los tornillos para centrado del condensador.
6. Abrir el diafragma de campo, de manera que la imagen de sus bordes se abra y se ilumine todo el campo visual.
7. Ajustar el diafragma de apertura del condensador para lograr mejor contraste, profundidad de campo y poder de resolución.
8. A cada cambio de lente objetivo, volver a enfocar la imagen con el tornillo micrométrico y ajustar el diafragma del condensador para mejorar el contraste.

Cuidado del microscopio

1. Siempre utiliza ambas manos para transportar el microscopio, una sujetando el brazo y otra bajo la base.
2. Antes de usarlo examina el microscopio con cuidado y reporta cualquier condición inusual o daños.
3. Mantén los oculares, objetivos y condensador limpios, utilizando papel de seda solamente.
4. Cuando termines de usarlo remueve la laminilla de la platina, limpia el aceite del objetivo de inmersión y coloca el objetivo de bajo poder en posición vertical.
5. Coloca el cubre polvo si es que tiene y regresa el microscopio a su gaveta.

La Tabla III sugiere posibles correcciones a problemas comunes al usar un microscopio.

Tabla III. Problemas más comunes en el uso del microscopio óptico compuesto.

Problema	Solución
Luz insuficiente pasando a través del ocular	<ul style="list-style-type: none"> • Elevar el condensador • Abrir el diafragma • Revisar que el objetivo esté bien colocado en su lugar
Partículas interfiriendo con la vista en el campo	<ul style="list-style-type: none"> • Limpiar el ocular y el objetivo suavemente con papel de seda o microfibra limpia.
Partículas que se mueven en el campo de visión	<ul style="list-style-type: none"> • Causado por burbujas en el aceite de inmersión, revisar el objetivo • Asegurarse que el objetivo de inmersión está en contacto con el aceite

Descripción de las técnicas más empleadas en el laboratorio de microbiología

Inoculación

Hay varias precauciones esenciales que deberán seguirse durante la inoculación para controlar la contaminación de cultivos, personas o el ambiente.

- Los procedimientos comenzarán a realizarse hasta que todo lo necesario esté al alcance y deben de completarse tan rápido como sea posible.
- Los recipientes deben de abrirse el mínimo tiempo posible y mientras están abiertos todo el trabajo se realizará cerca del mechero (en un radio de 15 cm), en donde las corrientes de aire son movidas hacia arriba (área de trabajo en esterilidad).
- Al abrir un tubo de ensayo, botella o matraz, el cuello debe de ser inmediatamente flameado para que cualquier movimiento de aire que ocurra, sea hacia afuera del recipiente.
- Durante la manipulación de una caja Petri, la exposición a la contaminación por aire de las superficies estériles internas debe de ser limitada al mínimo.
- Las partes de las pipetas estériles que se colocarán dentro de los cultivos o recipientes estériles no deben de ser tocadas o permitirse el contacto con otras superficies no estériles, como la ropa, la superficie del área de trabajo y el exterior de tubos o botellas.

En el procedimiento de la práctica 5 “Técnicas de sembrado” se explica con mayor detalle la transferencia del inóculo en distintos tipos de medios.

Manejo del asa microbiológica

Las asas de alambre se esterilizan en la flama del mechero. Antes y después del uso deben de ser calentadas hasta el rojo vivo para asegurarse de que cualquier contaminante como esporas bacterianas, sean destruidos. El mango del asa se sostiene hacia arriba como si sostuvieras un lápiz casi verticalmente; esto deja el dedo meñique libre para tomar tapones o tapas de tubos.

Procedimiento de flameado del asa microbiológica

Está diseñado para calentar el asa gradualmente, porque después del uso contendrá cultivo que puede salpicar al calentarse rápido y con la posibilidad de liberar pequeñas partículas de éste y formar aerosoles.

1. Coloca la parte del alambre que se une al mango en el cono azul brillante de la flama (área fría).
2. Eleva el resto del alambre lentamente hacia la región más caliente de la flama inmediatamente arriba del cono azul claro.
3. Mantenla hasta que se torne roja, en posición casi vertical. Ten cuidado de no quemarte.
4. Asegúrate de que toda la longitud del alambre reciba un calentamiento adecuado.
5. Permite que se enfríe y úsala inmediatamente.
6. No coloques el asa en la mesa o la agites para enfriarla.
7. Re-esteriliza el asa inmediatamente después de cada uso.

Si el asa no sostiene nada de líquido, es porque no forma un círculo completo. Para corregirlo, primero asegúrate de que ha sido esterilizada y después dale forma con unas pinzas. No uses tus dedos por la posibilidad de dañar tu piel.

Técnicas de manipulación de cajas Petri

Existen tres formas de manipular la caja Petri:

- La base (la mitad de la caja que contiene el medio) se coloca en la superficie de trabajo. Levanta la tapa verticalmente la cantidad mínima necesaria para permitir el acceso del asa.
 - Con la tapa colocada en la superficie de trabajo levanta la base y voltéala para que la superficie del agar quede hacia arriba.
 - Con la mano izquierda toma la caja con la tapa en la parte superior. Usando el dedo índice y pulgar abre la tapa lo suficiente para que entre el asa.
- La manipulación siempre debe realizarse cerca del mechero, en un radio no mayor a 15 centímetros.
- Las cajas se colocan en la mesa con la base hacia arriba para mantener visibles los datos rotulados y evitar condensación en la tapa.

Manejo de pipetas de vidrio

Las pipetas estériles graduadas o de goteo (Pasteur), se utilizan para transferir cultivos, medios estériles y soluciones estériles.

1. Remueve la pipeta de su contenedor o empaque por el extremo que contiene el tapón de algodón, teniendo cuidado de no tocar más de lo que es necesario para sujetarla firmemente.
2. Coloca la propipeta o el chupón.
3. Sostén la pipeta como lo harías con un lápiz. El dedo meñique queda libre para sostener el tapón de un tubo o botella y con el pulgar se controla el chupón.
4. Presiona el chupón con cuidado y toma la cantidad de fluido adecuada pero sin que toque el tapón de algodón.
5. Regresa cualquier exceso suavemente si es que se requiere un volumen exacto.
6. La punta de la pipeta debe permanecer bajo la superficie del líquido al tomarlo, para evitar la introducción de burbujas de aire que pueden causar la formación de aerosoles cuando el líquido se dispense.
7. Inmediatamente después del uso coloca la pipeta, ahora contaminada, dentro de la jarra de desechos con desinfectante. No remover el chupón hasta que la pipeta este dentro del contenedor, para evitar goteos.

Manejo de micropipetas

1. Ajustar la pipeta al volumen deseado.
2. Colocar la punta de plástico.
3. Presionar el émbolo suavemente hasta el primer tope.
4. Sumergir la punta en el líquido.
5. Soltar el émbolo suavemente para aspirar, sin generar burbujas y manteniendo la pipeta verticalmente.
6. Para vaciar el contenido, presionar el émbolo hasta el segundo tope.
7. Descartar la punta utilizando el eyector, en un frasco con desinfectante si se pipeteó un medio contaminado.

Flameado del cuello de botellas y tubos de ensayo

1. Aflojar la tapa para que pueda ser removida con facilidad
2. Sostener la botella/tubo con la mano izquierda.
3. Remover la tapa con el dedo meñique de la mano derecha girando la botella/tubo, no la tapa.
4. No colocar la tapa en la mesa.

5. Flamear el cuello de la botella/tubo haciéndolo pasar hacia adelante y atrás a través de la flama del mechero.
6. Después de realizar el procedimiento requerido, colocar la tapa de la botella/tubo usando el dedo meñique. Girando la botella/tubo, no la tapa.

Uso de los estándares de turbidez de McFarland (nefelómetro)

Los estándares nefelométricos de McFarland fueron propuestos en 1907 por J. McFarland como un instrumento para estimar el número de bacterias en suspensión, utilizadas para calcular el índice opsónico bacteriano y para la preparación de vacunas. El procedimiento para preparar el estándar número 1 de McFarland consiste en colocar en un tubo de ensayo grande 0.1 mL de una solución al 1% de cloruro de bario anhidro y mezclar con 9.9 mL de una solución fría de ácido sulfúrico de pureza grado químico. Ésta se mantiene en el refrigerador hasta que aparece un precipitado fino blanco de sulfato de bario. Después se agita vigorosamente. Este tubo tiene una densidad aproximada de 3×10^8 bacterias por mililitro de suspensión. (McFarland, 1907), (Bollela, 1999).

Tabla IV. Equivalencias y preparación de los estándares de McFarland.

Estándar McFarland	0.5	1	2	3	4
Densidad celular aprox. (1×10^8 UFC/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
Cloruro de Bario al 1.0% (mL)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Ácido Sulfúrico al 1.0% (mL)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6

UFC= Unidad Formadora de Colonias

(Fuente: Bollela, 1999)

Procedimiento de estandarización

1. Tomar el tubo estándar de McFarland y agitarlo.
2. Colocar el tubo estándar frente a una tira de papel con franjas alternadas negras y blancas que faciliten la visualización de la turbidez (Fig. III). Mantener en posición el tubo estándar para referencia posterior.
3. Tomar con el asa un inóculo bacteriano, el cual se agregará a un tubo con solución salina fisiológica (SSF) o algún caldo de cultivo.
4. Disgregar el inóculo frotándolo en la pared interna, con el tubo inclinado para que el inóculo quede sumergido al colocar el tubo verticalmente.
5. Flamear el tubo y taponarlo.
6. Agitar el tubo sosteniéndolo en una mano y golpeándolo con un dedo de la otra mano, evitando que el líquido salpique hasta el tapón.
7. Repetir la adición de inóculo hasta alcanzar el mismo grado de turbidez que el tubo de McFarland, visualizando con la ayuda de la tira de papel con franjas oscuras o fondo oscuro y teniendo cuidado de no exceder la turbidez.



Figura II Estándares de McFarland 0.5, 1 y 2

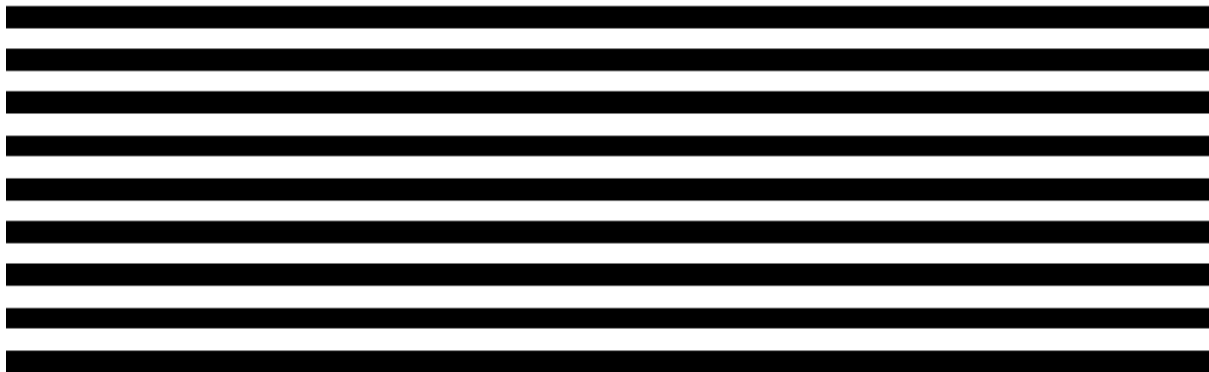


Figura III Plantilla para ajustar la turbidez

Identificación del material

Hay que asegurarse de tener siempre todo el material utilizado debidamente identificado con el nombre del microorganismo abreviado, fecha y grupo para evitar confusiones a la hora de trabajar y riesgos de seguridad. Tener siempre a la mano un marcador indeleble de punta fina.

- Cajas Petri: rotular con un marcador indeleble la mitad de la caja que contiene el medio utilizando abreviaciones y letra pequeña, manteniéndolas en la orilla para que no interfieran con la observación de las colonias.
- Tubos: rotular los tubos y botellas en una posición que no se pueda borrar durante la manipulación. Se puede utilizar marcador indeleble o etiquetas auto adheribles que no se desprendan fácilmente con calor pues se incubarán en estufa y pueden perderse.

Incubación

- Cajas Petri: la tapa y la base de la caja se unen con dos a cuatro tiras cortas de cinta adhesiva para proteger la apertura accidental durante la incubación. Las cajas se incuban con la base hacia arriba para evitar que ocurra condensación en la tapa y gotee en el cultivo. Esto puede causar que las colonias se mezclen entre ellas y también se corre el riesgo de derramar el líquido contaminado.
- Tubos: los tubos a incubar se colocan en un recipiente metálico debidamente identificado.

Limpieza al terminar

- Las superficies de trabajo se limpian después del uso. Si se utilizaron cultivos, las mesas se cubren con desinfectante el tiempo suficiente para desinfectarlas y después se limpian con toallas de papel.
- Los cultivos desechados y todo el material contaminado se colocan en contenedores etiquetados adecuadamente (palanganas). La pila de cajas Petri nunca debe de rebasar la altura del contenedor.
- Los cultivos y toallas de papel contaminado, guantes, etc. se esterilizan en el autoclave a 121°C por 15 minutos antes de ser desechados.
- Las pipetas y portaobjetos se colocan en frascos de vidrio con hipoclorito de sodio o benzal y deben dejarse al menos 24 horas antes de desecharse.
- Después de la esterilización los materiales se pueden desechar en la basura normal.
- Antes de abandonar el laboratorio quitarse la bata y lavarse las manos con agua y jabón.

Referencias

1. Bollela, V.R., Sato, D.N., & Fonseca, B.A.L.. (1999). McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(9), 1073-1076.
2. Organización Mundial de la Salud. (2005). Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3a ed. Pág. 71
3. McFarland J (1907). Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14: 1176-1178.

Bioseguridad

La bioseguridad es la disciplina que se encarga del manejo seguro y la contención de los microorganismos infecciosos, así como de los materiales que han entrado en contacto con éstos y son considerados biológicamente peligrosos. De acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI), son aquellos materiales generados durante los servicios de atención médica que contengan agentes que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente, se clasifican en la Tabla 1.1.

Recientemente han emergido nuevos agentes infecciosos y enfermedades, y con ello los trabajos de investigación en el sector público y privado y en los laboratorios de diagnóstico se han expandido. (Pike, 1965) Es por ello que los trabajadores que manipulan los microorganismos patógenos deben entender claramente las condiciones ideales bajo las cuales se pueden manipular de forma segura, y así prevenir la exposición personal a agentes potencialmente infecciosos por riesgos biológicos innecesarios en el laboratorio. Las bases de la contención de los agentes infecciosos incluyen las prácticas microbiológicas, el equipo de seguridad personal y las instalaciones. Son medidas que protegen a los trabajadores de laboratorio, al medio ambiente y a la población de la exposición a los microorganismos infecciosos que son manipulados y resguardados en el laboratorio.

El criterio principal utilizado para definir los cuatro niveles de contención referidos como niveles de bioseguridad son: infectividad, severidad de la enfermedad, transmisibilidad y la naturaleza del trabajo que se realiza. Otros factores de riesgo importantes de estos agentes que causan enfermedades moderadas a severas son el origen del agente, o si es nativo o exótico. (NIH, 2016)

Cada nivel de bioseguridad describe las prácticas microbiológicas, el equipo de seguridad y las instalaciones que corresponden al nivel de riesgo asociado con la manipulación de un agente en particular. Las prácticas de rutina y el equipo básico que se encuentra en la mayoría de los laboratorios clínicos y de investigación se resumen en la Tabla 1.2.

Tabla 1. 1. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FISICO	ENVASADO	COLOR
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
Patológicos	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Residuos no anatómicos	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

Tabla 1.2. 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 de 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.

(OMS, 2005)

En microbiología es muy importante trabajar con cultivos puros para poder identificarlos, pero desafortunadamente esto es difícil, el mundo que nos rodea está cubierto con microorganismos que incluso son transportados en partículas de polvo en el aire. Un ejemplo de este problema es que una caja de Petri estéril se puede contaminar tan sólo con remover la tapa. Para mantener estériles los caldos, cajas, tubos y cultivos puros de los microbios que nos rodean, debemos

practicar técnicas asépticas. Esto significa simplemente que los medios estériles deben de ser protegidos de la contaminación por microbios en el aire o de superficies no estériles, como la mesa o las manos, por lo que es de suma importancia lavarse adecuadamente las manos antes y después de manipular a los microorganismos. Las técnicas para el lavado y desinfección de manos que se utilizarán en el laboratorio las describe la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las figuras 1.1 y 1.2.



Figura 1. 1. Técnica de desinfección de manos utilizando solución alcoholada.
(OMS, 2010)



Figura 1. 2. Técnica de lavado de manos usando agua y jabón.
(OMS, 2010)

Objetivo Conocer los procedimientos de bioseguridad en el laboratorio, evaluando la técnica de lavado de manos descrita por la OMS como medida de protección para aplicarla en cada práctica y prevenir riesgos biológicos.

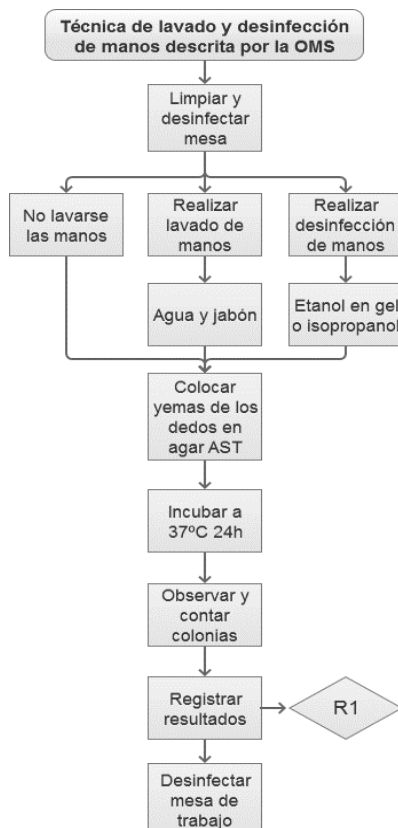
Materiales Jabón de manos
Etanol en gel o isopropanol
Mechero Bunsen
Cajas de agar AST o BHI de 100 ó 150 mm
Marcador indeleble fino

Procedimiento

Evaluación de la efectividad de la técnica de lavado y desinfección de manos.
Se realizarán tres evaluaciones por equipo:

- Lavado de manos con jabón
 - Desinfección de manos con alcohol
 - Sin lavar (Control positivo de crecimiento de microorganismo o basal)
1. Limpiar y desinfectar la mesa de trabajo.
 2. Conectar y encender el mechero Bunsen.
 3. Colocar las cajas a utilizar cerradas y boca abajo cerca del mechero.
 4. Lavarse las manos como lo indica la figura 1.1 y 1.2 con jabón para manos y etanol o isopropanol en gel respectivamente.
 5. Trabajando en un radio de 15 cm del mechero levantar la tapa de la caja Petri y colocar las yemas de los dedos dentro de la caja, con una presión suave y sin movimientos.
 6. Retirar la mano y colocar la tapa de la caja Petri.
 7. Voltear la caja y rotular la base con: fecha, equipo y técnica utilizada jabón (lavado) o etanol o isopropanol (desinfección).
 8. Colocar la caja dentro de la incubadora de manera que la mitad de la caja que contiene el agar quede hacia arriba. Con esto se evita la condensación de agua en la tapa.
 9. Incubar a 37°C de 18 a 24 h.
 10. Retirar la caja y colocarla en la mesa de trabajo previamente limpia y desinfectada, con el mechero encendido y las manos limpias para realizar el conteo.
 11. Realizar el conteo colonial cerca del mechero.
 12. Registrar el número de colonias y comparar los dos métodos de lavado que se utilizaron.
 13. Registrar la morfología colonial observada con la ayuda de la tabla de resultados.
 14. Una vez terminado el registro, colocar la caja dentro de la palangana de desechos para su posterior inactivación y desecho.
 15. Limpiar y desinfectar la mesa de trabajo.

Diagrama de flujo



Disposición de residuos

R1: Cajas Petri contaminadas, inactivar en autoclave y desechar

Resultados

LAVADO	CANTIDAD DE COLONIAS	OBSERVACIONES (Apariencia de las colonias, olor, color del medio)
Agua y jabón		
Etanol en gel o isopropanol		
Sin lavar		

Referencias

1. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. (Febrero 17, 2003). Consultado septiembre 17, 2016, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
2. NIH guidelines for research involving recombinant DNA molecules. (Abril, 2016). The National Institutes of Health (USA), Department of Health and Human Services.
3. Organización Mundial de la Salud. (2010). Cómo desinfectarse las manos. Consultado noviembre 17, 2017, de http://www.who.int/gpsc/information_centre/gpsc_desinfectmanos_poster_es.pdf?ua=1
4. Organización Mundial de la Salud. (2010). Cómo lavarse las manos. Consultado noviembre 17, 2017, de http://www.who.int/entity/gpsc/information_centre/gpsc_lavarse_manos_poster_es.pdf
5. Organización Mundial de la Salud. (2005). Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3a ed.
6. Pike, R.M., Sulkin, S.E., & Schulze, M.L. (1965). Continuing Importance of Laboratory-Acquired Infections. American Journal of Public Health and the Nations Health, 55(2), 190–199.

Esterilización

El término esterilización es absoluto y significa la total e irreversible destrucción de las células vivas. Podemos estar seguros que todas las formas de vida microbiana están completamente destruidas sólo cuando se utilizan técnicas de esterilización (Dai, 2016).

Algunos agentes físicos como la radiación ultravioleta o ionizante, el ultrasonido, o la desecación total, ejercen estrés en los microorganismos y pueden matarlos, pero no pueden destruir grandes concentraciones de microorganismos en un cultivo de laboratorio. Incluso pequeños números de microorganismos pueden no ser totalmente destruidos cuando son expuestos a rayos ultravioleta o calor seco si están protegidos por materiales como tela o papel, contenidos en un paquete quirúrgico, por ejemplo. Los métodos comúnmente empleados en el laboratorio se incluyen en la Tabla 2.1.

De todos los agentes físicos que ejercen efectos antimicrobianos el calor es el más efectivo. Es un excelente agente esterilizante cuando se aplica a temperaturas lo suficientemente altas por un periodo adecuado de tiempo porque detiene efectivamente la actividad celular. Dependiendo si es seco o húmedo, el calor puede coagular las proteínas u oxidar los componentes celulares. El calor no es selectivo en sus efectos sobre los microorganismos o cualquier otra célula viva, pero es muy útil en la esterilización de grandes cantidades de material y medios de cultivo (Erika, 2013).

Tabla 2. 1. Algunos métodos de esterilización empleados en el laboratorio.

TIPO DE MÉTODO	ESTADO FÍSICO	EJEMPLO
Físico	Calor húmedo	<ul style="list-style-type: none">• Ebullición• Pasteurización• Vapor a presión (Autoclave)
	Calor seco	<ul style="list-style-type: none">• Incineración (Flameado)• Horno Pasteur
	Radiación	<ul style="list-style-type: none">• No ionizante (UV, IR)• Ionizante (Rayos X, Gamma)
	Mecánico	<ul style="list-style-type: none">• Filtración (poros de 0.22 µm hasta 8 µm)
Químico	Líquido	<ul style="list-style-type: none">• Aldehídos• Alcoholes
	Gaseoso	<ul style="list-style-type: none">• Óxido de etileno

Objetivo

Utilizar métodos físicos de esterilización evaluando distintas condiciones y técnicas para conocer sus fundamentos y empleo en el laboratorio

Materiales

Hisopos de algodón estériles
Solución salina fisiológica estéril (SSF)
Cajas de agar AST o BHI de 100 mm
Cajas Petri de vidrio de 150mm
Agar nutritivo esterilizado en un matraz
Filtro de 0.22 μ m desechable
Cinta testigo para calor húmedo
Ampolletas para control biológico de esterilización
Jeringas de 1, 3 y 10 mL de capacidad
Marcador indeleble fino

Equipo

Autoclave
Horno Pasteur
Mechero Bunsen
Lámpara UV
Baño María

Procedimiento

- Antes de la práctica se realizará la inoculación con bacterias a botellas con 50 mL de caldo nutritivo o BHI, y se incubará a 37°C por 24h. Este medio será utilizado para las pruebas de esterilización, rotular como: (A).
 - Por equipos se evaluarán distintas condiciones de temperatura y tiempo de cuatro métodos de esterilización.
- Autoclave (Calor húmedo)
 1. Usando un marcador indeleble dividir en 3 partes iguales la base de una placa Petri con agar nutritivo. Rotular como: A, D₈₀ y D₁₂₁.
 2. Tomar una asada de la botella (A) utilizando el asa de 10 μ L y sembrar en la zona A de la caja realizando estrías (ver procedimiento en la práctica 5 "Técnicas de sembrado" siembra de medio líquido a sólido).
 3. Rotular 2 botellas (A) como D₈₀ y D₁₂₁ y colocar una tira de cinta testigo.
 4. Ingresar al autoclave 1 botella (A) a 121°C por 15min y posteriormente otra botella (A) a 80°C por 10min.
 - a. Rotular 2 ampolletas de control biológico como: D₈₀ y D₁₂₁
 - b. Ingresar en cada uno de los dos ciclos de esterilización una ampolleta. Posterior al ciclo incubar las 2 ampolletas a 60°C por 48h.
 5. Dejar enfriar las botellas a temperatura ambiente.
 6. Sembrar en las zonas D₈₀ y D₁₂₁.
 7. Incubar la caja en la estufa a 37°C por 24h.
 8. Retirar la caja, observar y comparar el crecimiento bacteriano.
 9. Registrar los resultados.

- Horno Pasteur (Calor seco)

1. Colocar 1 mL de cultivo de la botella A dentro de la base de una caja Petri de vidrio.
2. Poner la tapa de la caja e inclinarla ligeramente para que el líquido se distribuya uniformemente en la base.

Esterilización en horno Pasteur

1. Ingresar la caja cerrada al horno Pasteur a 180°C por 10, 20, 30, 40 o 60 min.

Vaciado del medio

1. Mantener en baño María a 45°C un matraz con agar nutritivo estéril.
2. En condiciones de esterilidad, levantar la tapa de la caja Petri un poco y vaciar unos 25mL de agar estéril hasta que cubra la superficie, y que tenga un grosor de 5 mm.
3. Colocar la tapa y suavemente rotar la caja para asegurarse de que el medio cubre uniformemente la superficie.
4. Deja enfriar y solidificar el medio en la caja Petri.
5. La base de la caja debe de ser cubierta por completo, el agar no debe de tocar la tapa y la superficie debe de ser lisa y sin burbujas. (Se puede flamear el medio con el mechero mientras esté líquido, para reventar las burbujas que pueda presentar).
6. Cuando las cajas se han enfriado y el agar solidificado, invertirlas para prevenir que la condensación del vapor se acumule en la superficie del agar.
7. Rotular la base de la caja, utilizando abreviaciones: tiempo en horno Pasteur, grupo, equipo y fecha.
8. Incubar las cajas a 37°C por 24h.
9. Observar el crecimiento bacteriano y registrar la cantidad de colonias para cada tiempo

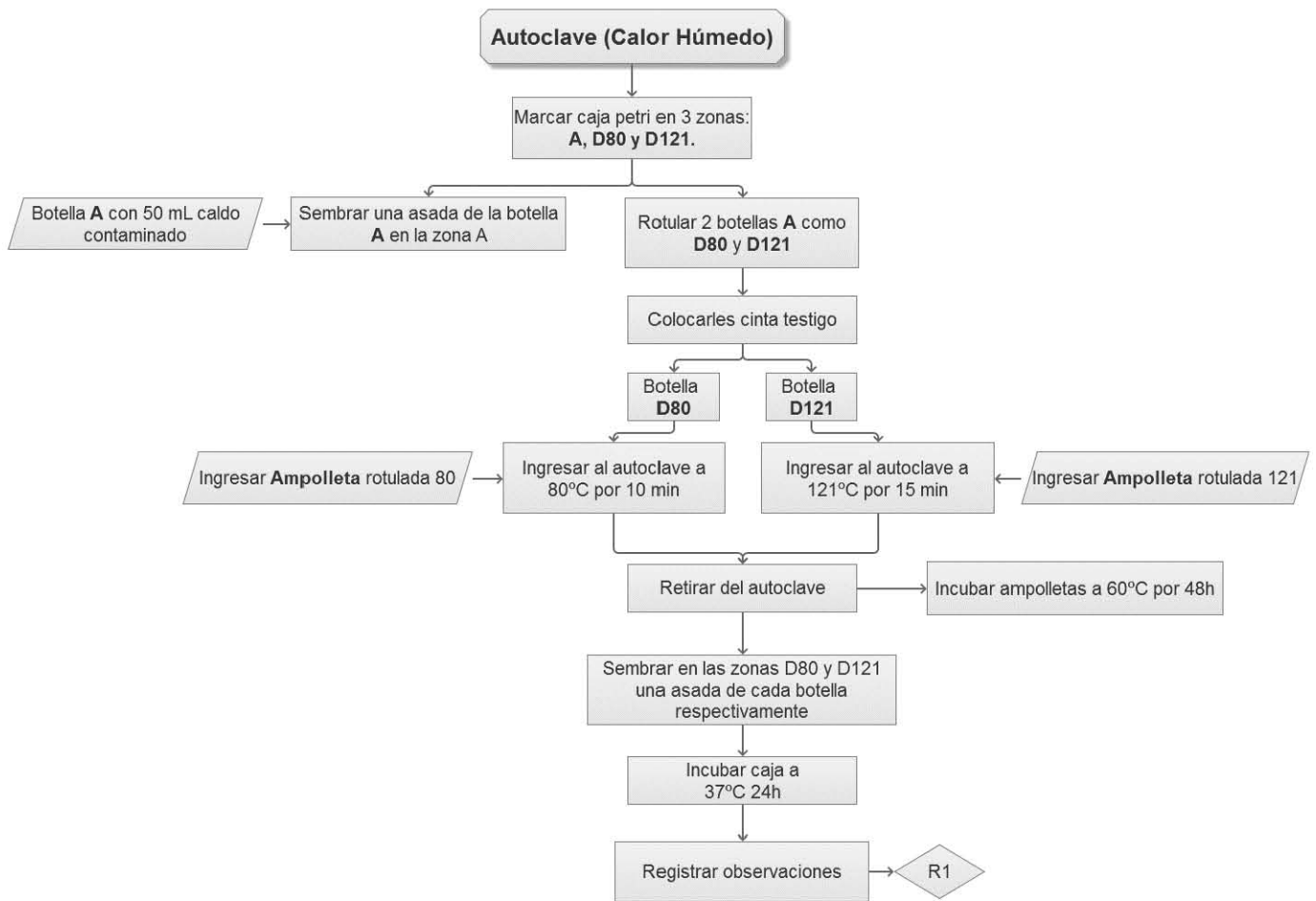
- Filtración

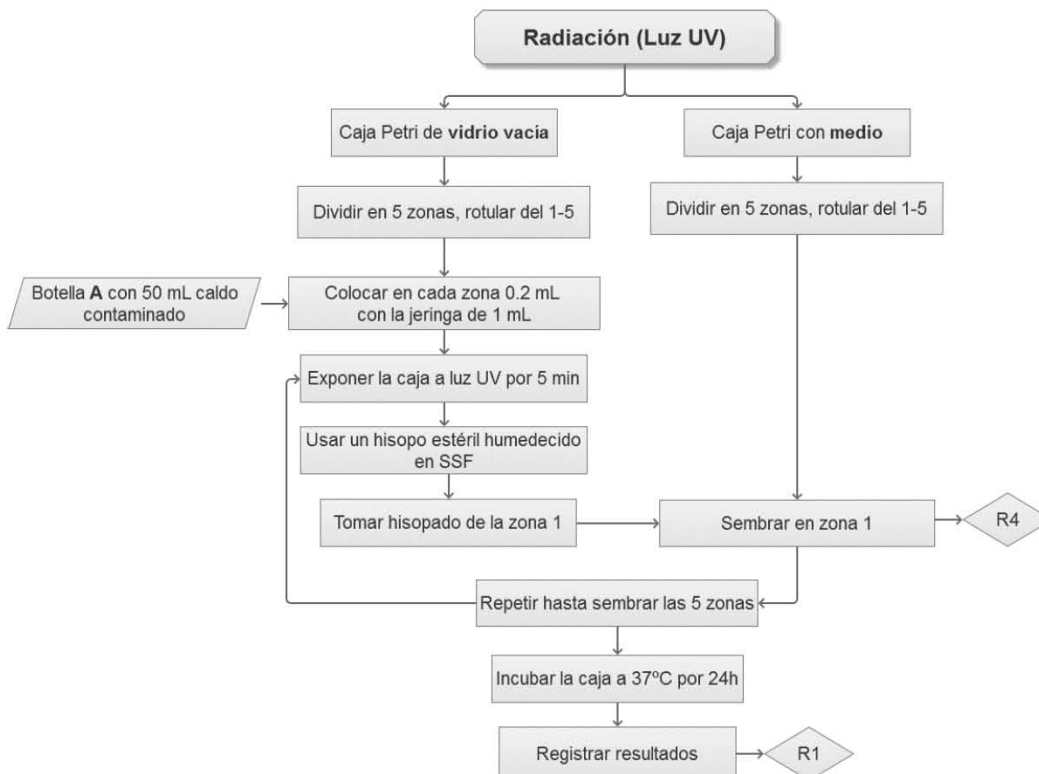
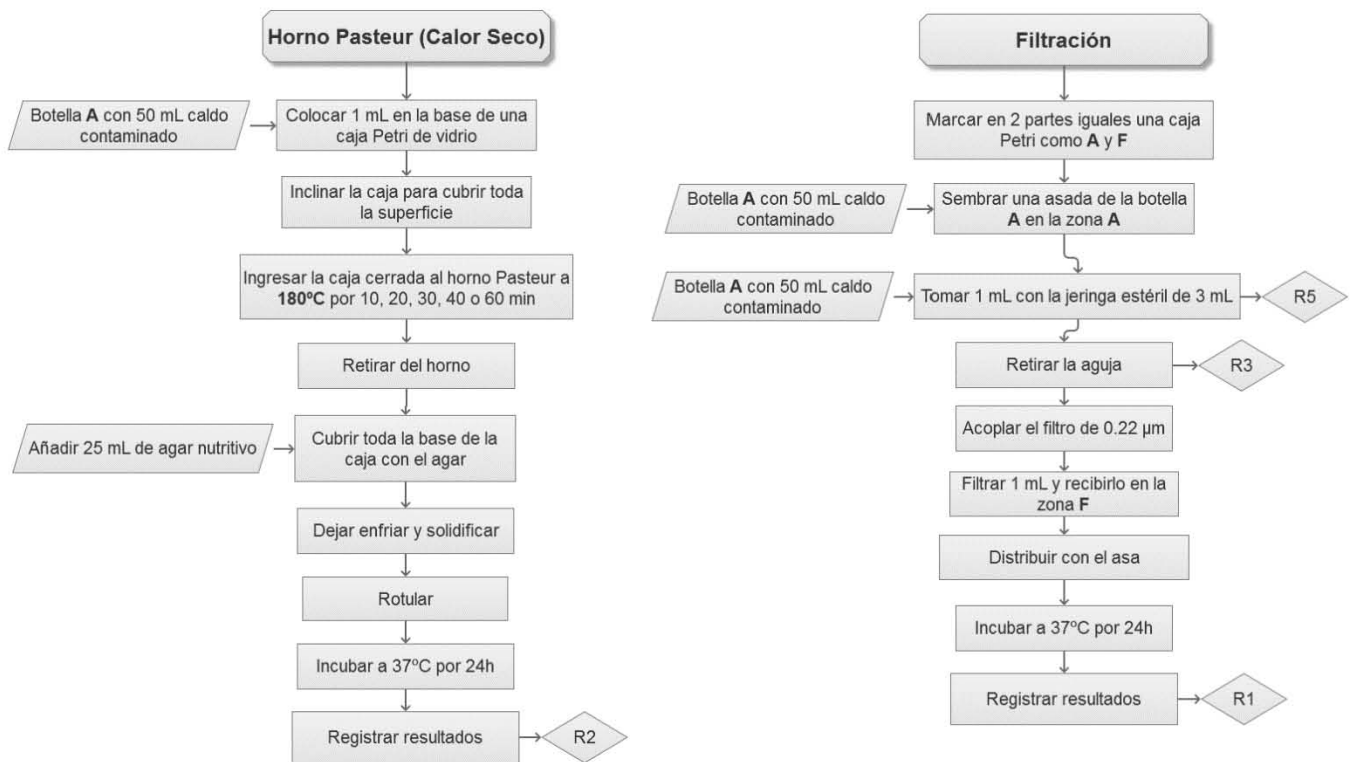
1. Dividir en 2 partes iguales la base de una placa Petri. Rotular como: A y F
2. Tomar una asada de la botella (A) utilizando el asa de 10 µL y sembrar en la zona A de la caja realizando estrías.
3. Tomar 1 mL de la botella (A) con la jeringa estéril de 3 mL.
4. Colocar la tapa de la aguja en la mesa y ensartarla con la aguja de la jeringa para evitar pincharse el dedo, embonar y girar para retirarla y desechar en el contenedor de punzocortantes.
5. Acoplar el filtro de 0.22 µm a la jeringa.
6. Filtrar 1 mL del medio y recibirlo directamente en la placa Petri en la zona F.
7. Distribuir con el asa estéril en toda la zona F.
8. Tapar e Incubar la caja a 37°C por 24h.
9. Comparar y registrar los resultados del crecimiento.

- Radiación (Luz ultravioleta)

1. Dividir una placa Petri de vidrio vacía y una con medio de cultivo en 5 zonas. Rotular del 1-5.
2. Usando la jeringa de 1 mL tomar 1 mL de la botella (A).
3. Colocar en cada zona 200 µL (0.2 mL) distribuyendo con la aguja.
4. Exponer la caja a luz UV por 5 min.
5. Humedecer un hisopo en SSF y tomar una muestra de la zona 1. Sembrarla en la zona 1 de la caja con medio. Desechar hisopo en contenedor con desinfectante.
6. Repetir la exposición UV por 5 min y tomar muestra de la zona 2 y sembrar en la zona 2 de la caja.
7. Repetir hasta sembrar las 5 zonas.
8. Incubar la caja a 37°C por 24h.
9. Observar y comparar la cantidad de colonias presentes para cada tiempo de exposición. Registrar resultados.

Diagramas de flujo





Disposición de residuos

- R1: Cajas Petri de plástico contaminadas: inactivar en autoclave y desechar.
- R2: Cajas Petri de vidrio contaminadas: inactivar en autoclave para uso posterior.
- R3: Aguja de jeringa contaminada: desechar en recipiente de punzocortantes.
- R4: Hisopos contaminados: colocar en recipiente con desinfectante.
- R5: Botellas con medio contaminado: inactivar en autoclave y desechar.
- R6. Ampolletas de control biológico de esterilización: inactivar en autoclave y desechar

Resultados

Reportar crecimiento bacteriano en las placas como: +, ++, +++

Moderado + 1-30 colonias

Abundante ++ 30-300 colonias

Muy abundante +++ Mas de 300 colonias

Autoclave Microorganismo: _____

TIEMPO	TEMPE-RATURA	PRESIÓN	OBSERVACIONES DEL CULTIVO	OBSERVACIONES DE LA AMPOLLETA	OBSERVACIONES DE LA CINTA

Horno Pasteur Microorganismo: _____

TIEMPO	TEMPE-RATURA	CRECIMIENTO BACTERIANO	OBSERVACIONES DEL CULTIVO

Filtración

Microorganismo: _____

CONDICIÓN	CRECIMIENTO BACTERIANO	OBSERVACIONES DEL CULTIVO
Filtrado		
Sin filtrar		

Radiación

Microorganismo: _____

TIEMPO	CRECIMIENTO BACTERIANO	OBSERVACIONES DEL CULTIVO

Referencias

1. Cappuccino, J; Sherman, N. (1999). Microbiology a laboratory manual. 5a ed. Addison Wesley Longman Inc. EE.UU.
2. Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*,
3. Erika, M., et al. (2013). Practical Microbiology: based on the Hungarian practical notes entitled "Mikrobiológiai Laboratórium Gyakorlatok" Department of Microbiology, Institute of Biology, Faculty of Science, Eötvös Loránd University, Budapest.

Desinfección

La desinfección y la higiene son conceptos que se han aplicado por miles de años. La desinfección química se practicaba en el tiempo del imperio persa cerca del año 450 a.C. cuando el agua se almacenaba en recipientes de cobre o plata para mantenerla potable. Mientras la ciencia se desarrollaba, nuevos y mejores desinfectantes químicos se comenzaron a utilizar; tal es el caso de los fenoles, que eran el estándar de referencia para las evaluaciones de los desinfectantes a finales del siglo XIX. Actualmente tienen una aplicación limitada en la medicina pero se pueden utilizar como preservativos en algunos otros productos. En bajas concentraciones los fenoles interactúan con las enzimas bacterianas que son necesarias para la síntesis de la pared celular, lo cual provoca una lisis celular. En altas concentraciones, los fenoles causan una coagulación general del citoplasma y adicionalmente pueden afectar la membrana citoplásmica, lo que resulta en una fuga de iones potasio y después del citosol. (Adam, 2012).

En los últimos 50 años nuestro conocimiento de los microbicidas se ha incrementado, pero también las preocupaciones sobre su uso extensivo en ambientes hospitalarios y domésticos; por lo que existe un gran interés en entender los mecanismos de acción e interacción con la materia orgánica y también los mecanismos de resistencia, para diseñar nuevos y mejores microbicidas que pueden emplear efectos sinérgicos o utilizar moléculas que permeen la membrana celular. (Adam, 2012).

Al igual que los desinfectantes, los agentes antimicrobianos tienen modos químicos específicos de acción pero el rango de actividad de los agentes antimicrobianos es más estrecho como veremos más adelante en la práctica 9 (antibiograma).

Mecanismos de acción de los desinfectantes

- Desnaturalización de proteínas
- Procesos de óxido-reducción
- Reacciones ácido-base
- Inactivación enzimática
- Modificación de la permeabilidad de la membrana celular (Romero, 2007)

Clasificación de los desinfectantes

- Grado alto: destruyen toda clase de microorganismos con excepción de esporas bacterianas.
- Grado medio: destruyen micobacterias, bacterias y la mayoría de virus y hongos.
- Grado bajo: destruyen la mayor parte de bacterias, algunos hongos y algunos virus. (Romero, 2007).

Características del desinfectante ideal

- Espectro de actividad amplio a bajas concentraciones.
- Inocuidad: no debe de ser tóxico para otras especies, afectando el medio ambiente.
- Estabilidad: debe conservar su actividad germicida durante el almacenamiento prolongado.
- Acción microbicida rápida.
- Capacidad de penetración en diversas superficies.
- Acción residual después de su aplicación para seguir ejerciendo acción desinfectante.
- Homogeneidad: la preparación debe tener una composición uniforme.
- No corrosivo
- Soluble en agua.
- Económico.

(Adaptado de Rodríguez, 2011)

Es importante rotar el uso de los desinfectantes para evitar el fenómeno de resistencia muy común en las bacterias.

Objetivo	Evaluar la efectividad de cinco desinfectantes, utilizando distintas concentraciones, tiempos de exposición y superficies, para conocer las condiciones de su uso y su importancia en el laboratorio.
-----------------	---

Materiales

Hisopos de algodón estériles
Estándares de turbidez de McFarland
Tubos con solución salina fisiológica
Tubo estéril grande
Pipetas graduadas
Cajas de agar Mueller Hinton
Cloruro de benzalconio concentrado
Hipoclorito de Sodio al 5%
Etanol al 96%
Fenol al 5%
Desinfectante comercial como: pinol

Procedimiento

Por equipos se evaluarán distintas concentraciones y tiempo de los desinfectantes.

Preparación de la solución bacteriana

1. Tomar el tubo estándar de McFarland 0.5 y agitarlo.
2. Colocar detrás del tubo una tira de papel con franjas alternadas negras y blancas que faciliten la visualización de la turbidez.
3. Tomar con el asa un inóculo bacteriano de la caja que contiene el cultivo.
4. Frotar el inóculo en la pared interna del tubo con SSF para disolver el inóculo.
5. Repetir la adición de inóculo hasta alcanzar el mismo grado de turbidez que el tubo 0.5

Técnica de sembrado masivo

1. Se realizará para 2 placas Petri con agar MH.
2. Sumergir un hisopo en la suspensión bacteriana previamente ajustada al 0.5.
3. Oprimir el hisopo contra la pared interna del tubo para remover el exceso de líquido.

4. Frotar suavemente el hisopo en la placa Petri de agar MH, realizando asadas lineales de un extremo a otro y sin espacios de manera vertical, horizontal y diagonal de manera que se cubra toda la caja uniformemente del inóculo. (Ver imagen 5.3 pág. 50).

Concentración mínima inhibitoria (CMI) y efecto bactericida y bacteriostático

1. En 10 tubos que contengan 2 mL de caldo de cultivo, diluir el desinfectante (Alcohol, Benzal, Cloro, Formaldehído y Pinol), realizando diluciones dobles seriadas de la siguiente manera:
 - a) Al primer tubo añadir 2 mL del desinfectante y homogeneizar.
 - b) Tomar 2 mL del primer tubo ya mezclado y transferirlos al segundo tubo.
 - c) Homogeneizar.
 - d) Repetir el procedimiento hasta el décimo tubo y desechar los últimos 2 mL en la tarja.
2. Adicionar 0.2 mL de suspensión bacteriana estandarizada al 0.5 a cada uno de los tubos.
3. Incubar a 37°C por 24h y sembrar el tubo donde se vea la CMI, además uno antes y uno después.

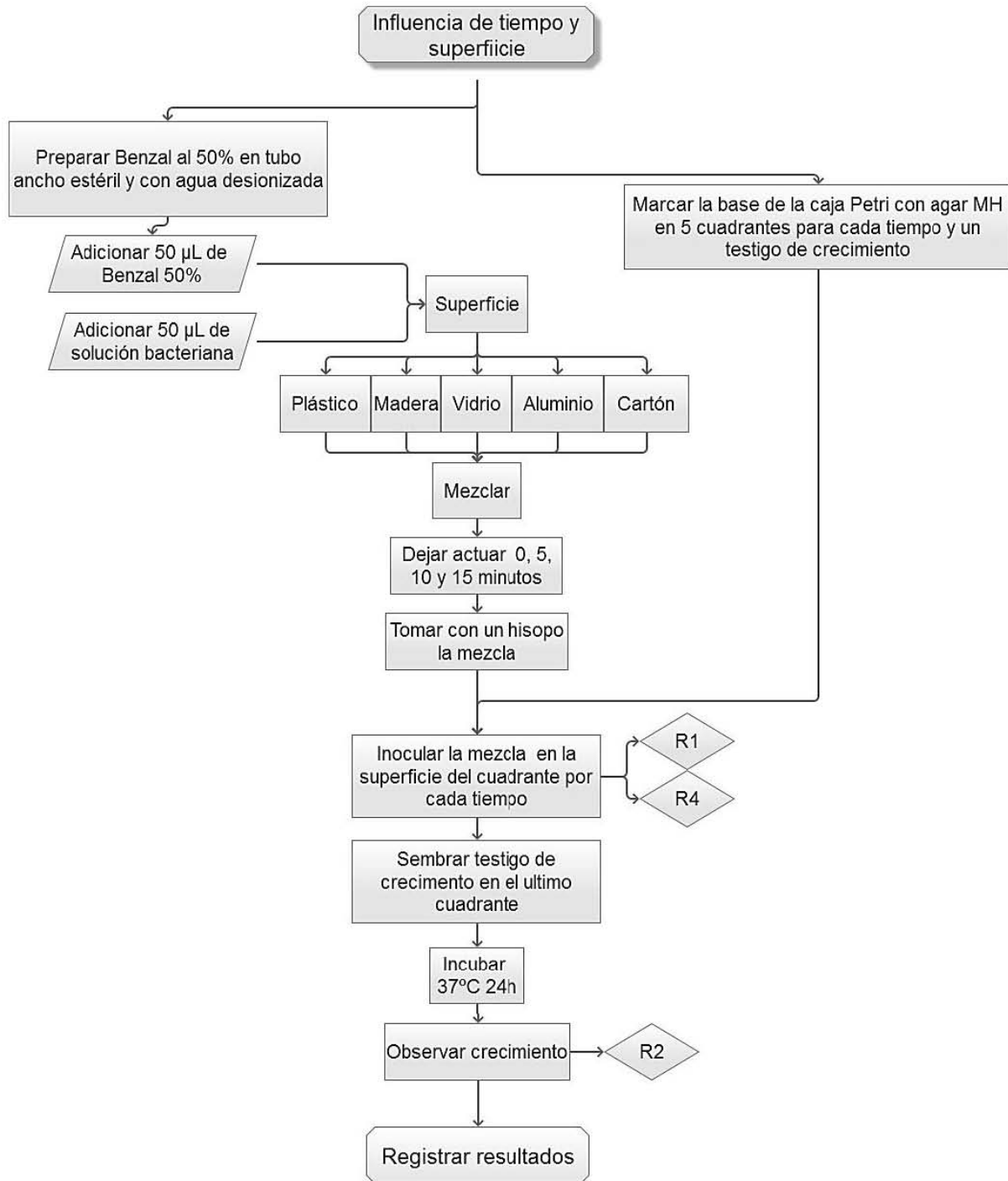
Concentración óptima del desinfectante

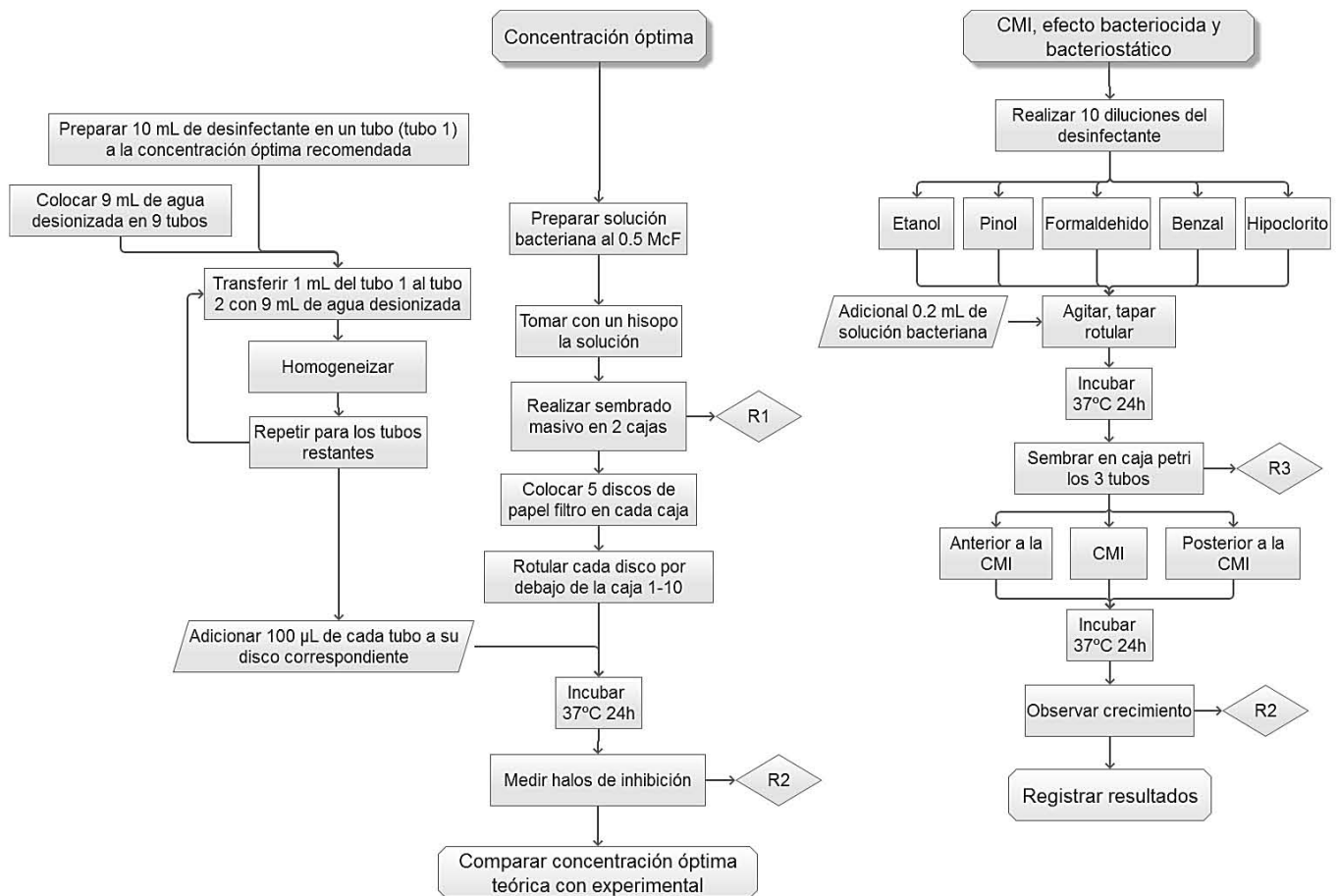
1. Adicionar a 9 tubos estériles 9 mL de agua desionizada.
2. Preparar en un tubo estéril 10 mL de un desinfectante, de acuerdo a la concentración recomendada por el fabricante.
3. Hacer 10 diluciones decrecientes del desinfectante, tomando 1mL del tubo preparado y transfiriéndolo al segundo tubo que contiene 9mL de agua desionizada.
4. Homogeneizar el tubo golpeándolo con el dedo y transferir 1 mL del segundo tubo al tercero.
5. Repetir hasta completar los 9 tubos.
6. Colocar con pinzas estériles 5 papeles filtro separados equidistantemente en cada una de las 2 cajas previamente sembradas masivamente.
7. Adicionar sobre los discos de papel filtro 50-100µL de cada una de las 10 diluciones, utilizando una micropipeta. Hacerlo en orden y uno a la vez, para rotular cada uno en la parte inferior de la caja. Utilizar un número de 1-10 donde 1 sea el primer tubo del cual se hicieron las demás diluciones.
8. Incubar a 37°C por 24h
9. Observar los halos de inhibición del crecimiento y medir el diámetro con una regla.
10. Registrar las medidas.
11. Comparar los diámetros de todos los desinfectantes.

Influencia del tiempo y tipo de superficie

1. Preparar una solución de Benzal al 50 % en un tubo estéril grande y ancho, usando agua desionizada y estéril. Rotular.
2. Preparar una suspensión bacteriana en solución salina fisiológica (SSF) y ajustar al 0.5 de McFarland.
3. Sobre la superficie seleccionada (Madera, Vidrio, Aluminio, Plástico o Cartón): Colocar 50-100 µL de desinfectante y después 50-100 µL de suspensión bacteriana, y homogeneizar la mezcla.
4. Con un plumón marcar la base de la caja de agar MH en 5 partes iguales.
5. Con un hisopo estéril tomar una muestra de la mezcla previa y sembrarla en un espacio de la caja con medio de cultivo.
6. Hacer esta operación a los tiempos: 0, 5, 10 y 15 minutos de exposición. Para cada espacio, y en el último espacio sembrar un control positivo de crecimiento con un hisopo (suspensión bacteriana).
7. Rotular e incubar la caja a 37°C por 24h
8. Observar el crecimiento y registrar.

Diagrama de flujo





Disposición de residuos

R1: Hisopos contaminados: colocar en recipiente con desinfectante y desechar.

R2: Cajas Petri contaminadas: inactivar en autoclave y desechar.

R3: Tubos con cultivo: inactivar en autoclave y desechar.

R4: Superficies contaminadas, inactivar en autoclave y desechar.

Resultados

Crecimiento colonial en superficies

Reportar crecimiento bacteriano en las placas como: +, ++, +++

Moderado + 1-30 colonias

Abundante ++ 30-300 colonias

Muy abundante +++ Mas de 300 colonias

Superficie	Tiempo				
	0	5 min	10 min	15 min	Control +
Plástico					
Madera					
Vidrio					
Aluminio					
Cartón					

Concentración óptima del desinfectante

Calcular la concentración que contiene cada tubo

Desinfectante	Dilución									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Diámetro del halo de inhibición (mm)									
Benzal										
Concentración										
Alcohol										
Concentración										
Cloro										
Concentración										
Formaldehído										
Concentración										
Pinol										
Concentración										

Comparación de la concentración óptima teórica y experimental

Desinfectante	Concentración óptima	
	Teórica	Experimental
Benzal		
Alcohol		
Cloro		
Formaldehído		
Pinol		

Referencias

1. Adam, P; Jean-Yves, M; Syed, S. (2012) Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 5ª ed. John Wiley & Sons
2. Rodríguez, S. (2011). Manual de Laboratorio. Microbiología General. Cuautitlán Izcalli, Estado de México: FESC Cuautitlán. 185 pp
3. Romero, R. (2007). 3a ed. Microbiología y parasitología humana. Ed Médica Panamericana

Medios de cultivo

Desde 1881 cuando el primer medio de cultivo sólido que contenía agar fue desarrollado por Fanny Hesse y propuesto a Robert Koch para la aislación y cultivo de bacterias, han surgido numerosos medios sólidos líquidos y semisólidos. En general la elección de los nutrimentos, atmósfera, temperatura y tiempo de incubación son los cuatro principales elementos que determinan el crecimiento de las bacterias, por lo que deben de ser lo más parecidos al ambiente natural del microorganismo (Lagier,2015).

La composición de estos medios depende enteramente de los requerimientos nutrimentales específicos de los microorganismos a aislar o cultivar, sean bacterias, hongos, protozoarios e incluso virus en los que se requieren células vivas adecuadas para su replicación (Tabla 4.1).

Algunos medios se adaptan para crecer el máximo número posible de diferentes organismos sin favorecer alguno en particular (no selectivos), otros medios son altamente selectivos y permiten el desarrollo de sólo un grupo muy limitado de organismos.

La mayoría de los medios diseñados para el crecimiento inicial y el aislamiento de microorganismos son ricos en compuestos proteicos derivados de carne animal, pero muchas bacterias son incapaces de degradarlas a formas utilizables y deben de ser provistos con materiales proteicos parcialmente degradados (péptidos peptonas, aminoácidos). Los extractos o carne parcialmente cocida son nutrimentos básicos de muchos medios de cultivo así como algunos carbohidratos y sales minerales que se añaden usualmente. Éstos medios básicos se pueden suplementar o enriquecer con sangre, suero, vitaminas, azúcares y sales minerales o aminoácidos particulares según se necesite.

Tabla 4. 1. Algunos de los medios de cultivo utilizados en microbiología.

Tipo	Medio (ejemplos)	Propósito
No selectivo	Agar Sangre	Recuperación de bacterias y hongos
	Agar Chocolate	Recuperación de cocos G+ como <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>Haemophilus</i>

	Agar Mueller-Hinton	Medio ideal para probar la susceptibilidad a antibióticos
	Caldo Tioglicolato	Caldo de enriquecimiento para bacterias anaeróbicas
	Agar Saboraud dextrosa	Recuperación de hongos
Selectivo, diferencial	Agar MacConkey	Selectivo para bacterias Gram (-); diferencial para especies fermentadoras de lactosa
	Agar Sales y manitol	Selectivo para <i>Staphylococcus</i> ; diferencial para <i>Staphylococcus aureus</i>
	Medio Lowenstein-Jensen	Selectivo para <i>Mycobacterium</i>
	CHROMagar	Genera colonias de distintos colores
Especializados	Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa)	Recuperación de especies de <i>Vibrio</i>

Objetivo Preparar medios de cultivo sólidos, semisólidos y líquidos, conociendo sus condiciones de elaboración, esterilización y pruebas de control de calidad para emplearse posteriormente en el aislamiento e identificación de bacterias.

Materiales

Medios de cultivo deshidratados:
 Base agar sangre, MacConkey, Sales y manitol, etc.
 Caldos deshidratados:
 Nutritivo, nitratos, urea, etc.
 Sangre de carnero desfibrinada estéril
 Agua destilada
 Matraz Erlenmeyer de 1 L con tapón de algodón
 Matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón
 Probeta de 1L
 Varilla de vidrio
 Pipeta de 10 mL
 10 Tubos con tapón de rosca
 10 Cajas Petri estériles de 100mm

Equipo

Parrilla eléctrica con agitador magnético
 Soporte universal o tripié, Tela de asbesto
 Baño María, Termómetro, Mechero Bunsen

Procedimiento

Por mesa se prepararán 30 cajas de medio de cultivo y 30 tubos para pruebas bioquímicas de diferentes medios seleccionados.

Normalmente se utilizan de 20-25 mL por cada caja Petri y 3-5 mL por cada tubo.

Preparación del medio de cultivo en cajas Petri

1. Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado. Allí se especifica la cantidad de polvo que se requiere para preparar un litro de medio.
2. Calcular la cantidad necesaria para preparar 30 cajas y pesar el medio en polvo en la balanza. (Considerar que cada caja lleva de 20-25 mL, así que el volumen total a preparar será de 600-750 mL)
3. Colocar la mitad del volumen de agua destilada en el matraz Erlenmeyer. Añadir el polvo ya pesado mientras se agita con la varilla de vidrio para evitar que se formen grumos. Esperar a que se hidrate el agar y añadir el agua restante.
4. Colocar el matraz en un tripié sobre una tela de asbesto y tapar con el tapón de algodón. Utilizando el mechero Bunsen, lentamente llevar el medio de cultivo rehidratado hasta ebullición, agitando constantemente para evitar derrames.
5. Cuando el agar se haya disuelto completamente, retirar de la flama. Rotular el matraz.
6. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.
7. Cuando termine la esterilización del agar, permitir que se enfríe a 45-50°C. El agar debe de estar caliente y líquido pero no tan caliente para poder manipularlo y también evitar la condensación excesiva de agua.

Indicaciones para preparar Agar Sangre, Agar Chocolate y Agar Cetrimida

- Al agar sangre se le agrega de 5 a 10% de sangre de carnero desfibrinada posterior a la esterilización, cuando el agar se haya enfriado a una temperatura de 45°C.
- Para preparar el agar chocolate se realiza el mismo procedimiento pero el agar debe de estar a 80°C.
- El volumen añadido de sangre se le debe de restar al volumen total de agua requerido para preparar el medio.
- Disolver el agar cetrimida en agua destilada con 1% de glicerol.

Preparación de tubos para pruebas bioquímicas (medio sólido, semisólido y líquido)

1. Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado. Allí se especifica la cantidad de polvo que se requiere para preparar un litro de medio.
2. Calcular la cantidad necesaria para preparar 30 tubos y pesar el medio en polvo en la balanza. (Considerar que cada tubo lleva de 3-5 mL de medio preparado, así que el volumen total a preparar será de 90-150 mL).
3. Añadir la cantidad de polvo necesaria en la mitad de volumen de agua, en el matraz Erlenmeyer, para reconstituirlo y disolverlo agitando con la varilla de vidrio. Esperar a que se hidrate el agar y añadir el agua restante.
4. Llevarlo a ebullición lentamente y cuando se haya disuelto completamente retirarlo de la flama y dejarlo enfriar.
5. Trabajando en esterilidad y utilizando una pipeta colocar en tubos de vidrio alícuotas de 3-5 mL del medio en los tubos de ensayo con tapón de rosca.
6. Colocar el tapón de los tubos pero dejarlo un poco flojo o a medio cerrar para que pueda esterilizarse correctamente.

7. Rotular adecuadamente los tubos y colocarlos en un contenedor.
8. Esterilizar en autoclave.
9. Cuando termine la esterilización de los medios, colocar los tubos de medio líquido y semisólido en una gradilla en posición vertical. Los tubos con medio sólido se colocan inclinados hasta que el agar se enfríe y solidifique en esa forma.
10. Rotular la parte superior utilizando abreviaciones: medio de cultivo, y grupo.

Vaciado en cajas

1. Colocar en un baño maría a 45°C el matraz con el agar estéril para que se mantenga líquido.
2. Tomar el matraz, remover el tapón frente al mechero y flamear el cuello.
3. En condiciones de esterilidad, levantar la tapa de la caja Petri un poco y vaciar unos 25 mL de agar hasta que cubra la superficie, y que tenga un grosor adecuado (5mm).
4. Colocar la tapa y suavemente rotar la caja para asegurarse de que el medio cubre uniformemente la superficie.
5. Deja enfriar y solidificar el medio en la caja.
6. La base de la caja debe de ser cubierta por completo, el agar no debe de tocar la tapa y la superficie debe de ser lisa y sin burbujas. (Se puede flamear el medio con el mechero mientras esté líquido para reventar las burbujas que se hayan formado)
7. Cuando las cajas se han enfriado y el agar solidificado, invertirlas para prevenir que la condensación del vapor se acumule en la superficie del agar.
8. Rotular la base de la caja, utilizando abreviaciones: medio de cultivo, fecha, y grupo.

Pruebas de Control de calidad de medios de cultivo

Prueba de esterilidad

1. Colocar en la incubadora el 10% de las cajas y tubos esterilizados que se prepararon.
2. Incubar por lo menos 24h y hasta 72h si se sospecha de contaminación por levaduras.
3. Retirar y revisar las cajas sin abrirlas para asegurarse de que sean estériles y libres de bacterias contaminantes
4. Si presentan crecimiento se rechaza todo el lote.

Prueba de promoción de crecimiento

Después de comprobar que la prueba de esterilidad fue exitosa, se evaluará cada medio en la siguiente práctica y también se podrá desarrollar habilidad en las técnicas de sembrado.

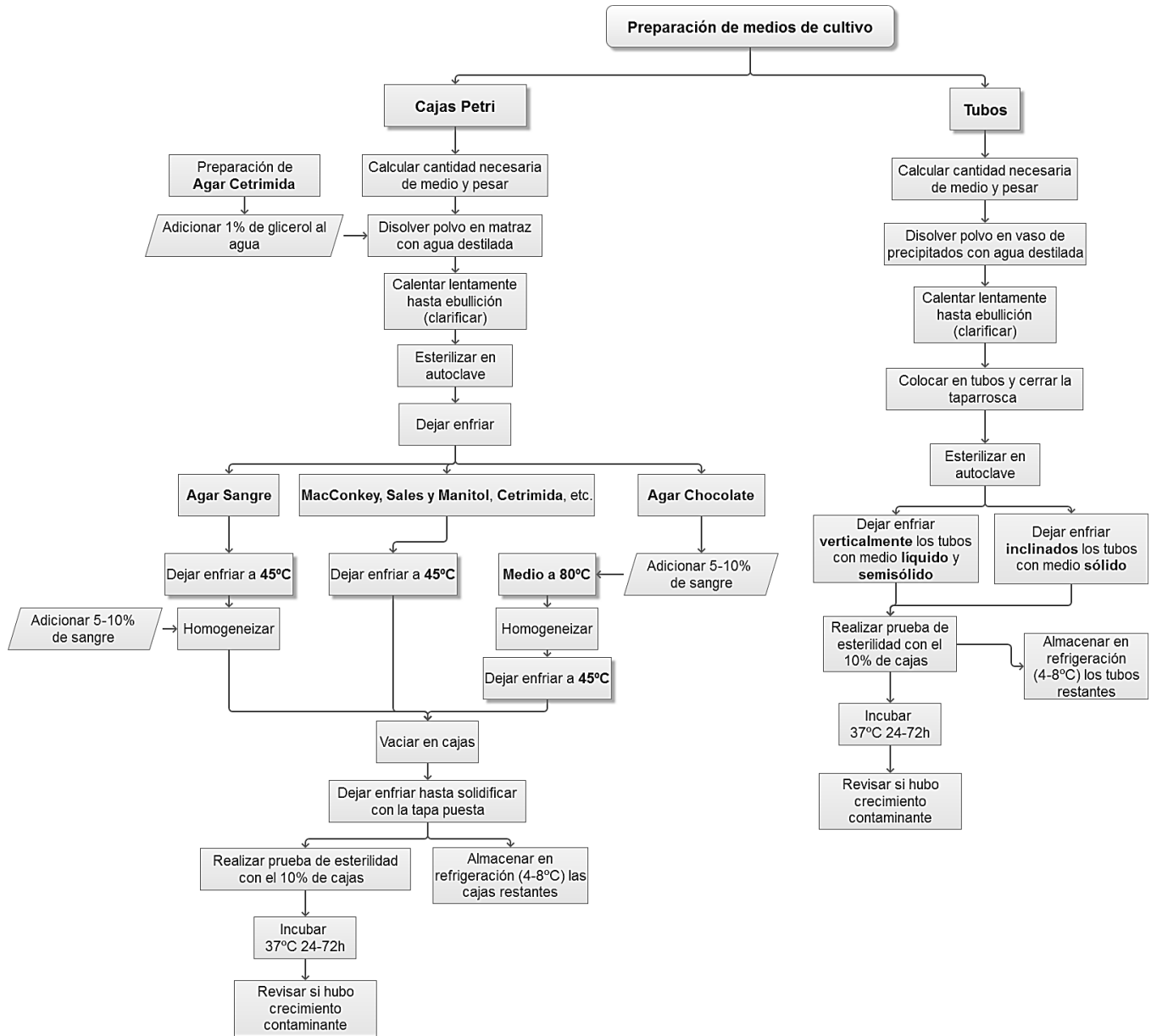
Esta prueba sirve para evidenciar la capacidad del medio para cumplir con todas las exigencias nutrimentales que demandan el desarrollo de los microorganismos, se utilizan cepas control cuyas características de crecimiento son conocidas.

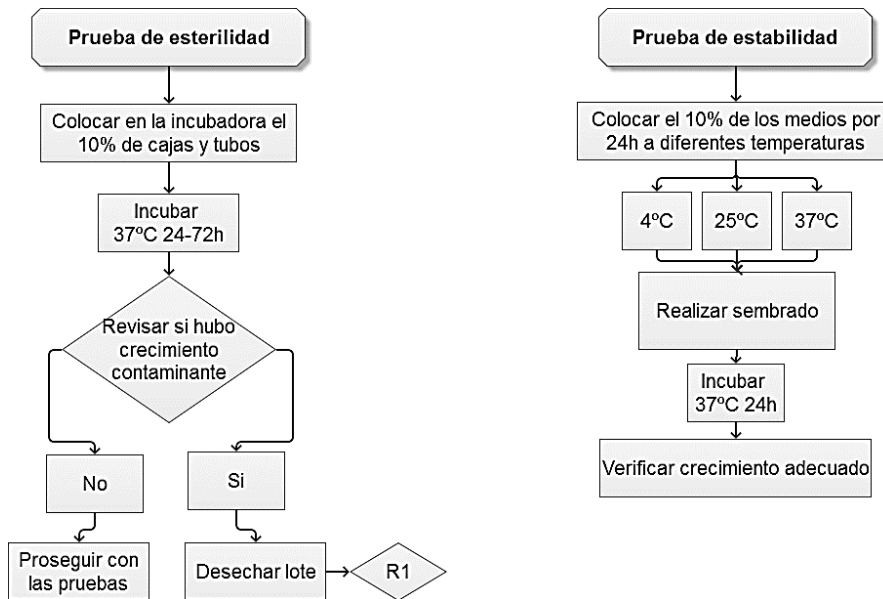
Prueba de estabilidad

Esta prueba demuestra la efectividad de los medios al someterlos a distintas condiciones de temperatura y humedad.

1. Colocar el 10% de las cajas cerradas a 37, 25 y 4°C por 24h.
2. Realizar el sembrado y verificar que se desarrollen e inhiban adecuadamente los microorganismos para cada medio.

Diagramas de flujo





Disposición de residuos

R1: Cajas Petri contaminadas: inactivar en autoclave y desechar

Resultados

Cálculos para la preparación de medios en placa Petri (25mL / caja, aprox.)

Medio		Cálculos
Cantidad de cajas		Gramos de medio deshidratado necesarios: _____
Volumen total de medio		

Cálculos para la preparación de medios en tubos (3-5mL / tubo, aprox.)

Medio		Cálculos
Cantidad de tubos		Gramos de medio deshidratado necesarios: _____
Volumen total de medio		

Prueba de esterilidad

Medio	Tiempo de incubación	Crecimiento	Sin crecimiento	Observaciones

Prueba de estabilidad

Medio	Temperatura	Crecimiento	Sin crecimiento	Observaciones

Referencias

1. Basu, S., et al. (2005). Quality control of culture media in a microbiology laboratory. *Indian J Med Microbiol.* 23(3), 159-63.
2. BD Diagnostics, (2009). *DIFCO & BBL Manual of Microbiological Culture Media.* 2a ed., Sparks Maryland, 686 pp.
3. Lagier, J.-C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 208–236.
4. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-065-SSA1-1993, QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES SANITARIAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO. GENERALIDADES. (Febrero 27, 1995). Consultado: Septiembre 22, 2016, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/065ssa13.html>
5. Visvesvara, G. S., & Garcia, L. S. (2002). Culture of Protozoan Parasites . *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 327–328.




Técnicas de sembrado










Como propuso Robert Koch, un cultivo puro es el fundamento de toda la investigación en las enfermedades infecciosas. Un cultivo bacteriano también permite el estudio de la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos y es el primer paso para el establecimiento de un tratamiento efectivo. (Koch, 1882)(Brock, 1999).

En el agua, el suelo, la piel y muchas superficies mucosas del cuerpo humano, existe una gran diversidad de microorganismos que componen la microbiota normal. Las bacterias frecuentemente se encuentran en poblaciones mixtas, por lo que para poder estudiar las características morfológicas y fisiológicas de una especie individual es vital que la bacteria sea separada de las otras especies utilizando los medios de cultivo.

Al recolectar y cultivar estos especímenes a partir de muestras biológicas, cualquier microorganismo patógeno debe ser reconocido y aislado de otros que no causan daño. Las colonias de estas especies patógenas se toman del cultivo mixto, se aíslan y se hacen crecer en un cultivo puro, por lo que una adecuada técnica de aislamiento y purificación es crítica para una identificación exacta de los microorganismos. Uno de los primeros pasos que realiza el microbiólogo para la identificación además de las tinciones, es la observación directa del crecimiento colonial en las superficies de los medios, mostrando diversas morfologías (Tabla 5.1) y también cambios visibles en el medio, por lo que en esta etapa se puede comenzar a determinar los pasos posteriores para su identificación, como veremos en las siguientes prácticas.

Tabla 5. 1. Morfologías coloniales visibles sobre la superficie de medios de cultivo.

Forma	 Circular	 Rizoide	 Irregular	 Filamentosa	
Borde	 Entero	 Ondulado	 Lobulado	 Rizoide	 Filamentoso

Elevación	 Plano	 Elevado	 Convexo	 Umbonado	 Crateriforme
Tamaño	 Puntiforme	 Pequeña	 Moderada	 Grande	
Textura	Lisa			Rugosa	
Apariencia	Brillante			Mate	
Consistencia	Mucoide	Butiroide	Viscosa	Seca	
Pigmentación	Sin pigmentación: (crema, marrón, blanco)			Pigmentada: (rojo, amarillo, morado)	
Propiedad óptica	Opaca	Translúcida	Transparente	Iridiscente	
Olor	Heces	Fermentos	Pescado	Dulce	Tortilla húmeda Tierra húmeda

Objetivo

Realizar el sembrado de cepas puras en medios de cultivo sólidos, semisólidos y líquidos, mediante diferentes técnicas para reconocer su utilidad en el aislamiento e identificación de microorganismos.

Materiales

Cajas Petri con medios selectivos y diferenciales
Tubos con agar sólido y semisólido
Tubos con caldo de cultivo
Cultivos bacterianos en cajas y tubos

Procedimiento

Siembra de medio sólido a medio líquido

1. Esterilizar el asa de 10 μ L y dejarla enfriar.
2. Seleccionar una colonia bacteriana aislada y tocarla con el asa para tomar el inóculo.
3. Destapar y, flamear la boca del tubo con el mechero
4. Inclinar el tubo e introducir el asa sin tocar las paredes.
5. Frotar el asa en la pared del tubo por debajo del nivel del caldo para disgregar y transferir todo el inóculo.
6. Retirar el asa, flamear la boca del tubo y tapar.
7. Esterilizar el asa en el mechero después de usarla.
8. Agitar el tubo golpeándolo con el dedo y evitando que el líquido salpique hasta la tapa.
9. Incubar los tubos a 37°C por 24 horas.
10. Observar el crecimiento obtenido. Si no hay crecimiento el caldo quedará translúcido.

Siembra de medio líquido a medio líquido.

1. Esterilizar el asa calibrada de 1µL y dejarla enfriar.
2. Tomar el tubo que contiene la muestra a sembrar, retirar la tapa del tubo, flamear la boca del tubo.
3. Introducir el asa en el tubo sin tocar las paredes y tomar un poco de suspensión, flamear nuevamente la boca del tubo, taponarlo y dejarlo en una gradilla.
4. Tomar el tubo de caldo estéril en el cual se va a colocar la muestra, destaponarlo, flameando la boca del tubo con el mechero e introducir el asa con la muestra obtenida.
5. Realizar movimientos de rotación con el asa para dispersar el inóculo en el caldo.
6. Retirar el asa, flamear la boca del tubo y taponarlo.
7. Esterilizar el asa en el mechero después de usarla.
8. Incubar los tubos a 37°C por 24 horas.
9. Observar el crecimiento obtenido. Si no hay crecimiento el caldo queda transparente.

Siembra de medio sólido a sólido.

1. Esterilizar el asa de 10 µL y dejarla enfriar.
2. Seleccionar una colonia bacteriana y tocarla con el asa para tomar el inóculo.
3. Transferir el inóculo con el asa de forma plana, contra la superficie del agar, realizando alguna de las técnicas que se describen más adelante para cajas Petri y tubos con agar sólido y semisólido.
4. Esterilizar el asa después de usarla.
5. Incubar la caja invertida, o tubo a 37°C por 24 horas.
6. Observar el crecimiento obtenido.

Siembra de medio líquido a sólido

1. Esterilizar el asa calibrada de 1µL y dejarla enfriar.
2. Tomar el tubo que contiene la muestra a sembrar, retirar la tapa del tubo, flamear la boca del tubo.
3. Introducir el asa en el tubo sin tocar las paredes y tomar un poco de suspensión, flamear nuevamente la boca del tubo, taponarlo y dejarlo en una gradilla.
4. Transferir el inóculo con el asa de forma plana, contra la superficie del agar, realizando alguna de las técnicas que se describen más adelante para cajas Petri y tubos con agar sólido y semisólido.
5. Esterilizar el asa después de usarla.
6. Incubar la caja invertida, o tubo a 37°C por 24 horas.
7. Observar el crecimiento obtenido.

Técnicas de sembrado para cajas Petri

- Siembra por aislamiento o dilución en placa (Técnica americana o estría cruzada)
 1. Transferir el inóculo en la superficie del agar cerca del borde, pero sin tocarlo. Con el asa plana contra la superficie del agar, estriar ligeramente el inóculo hacia adelante y atrás sobre un área aproximadamente de un octavo de la caja. Tener cuidado de no romper el agar (figura 5.1, (1)).
 2. Esterilizar el asa y dejarla enfriar.
 3. Girar la caja para estriar series de cuatro líneas adelante y atrás y que cada una pase sobre el inóculo y se extienda sobre un lado de la caja (2).
 4. Esterilizar el asa de nuevo y dejarla enfriar.
 5. Girar la caja y estriar otra serie de cuatro líneas y que cada una cruce el final de las últimas cuatro y se extiendan sobre el lado adyacente de la superficie (3).

6. Finalmente realizar estriados en el centro de la caja en donde no se ha tocado con el asa, pero sin tocar los estriados anteriores. (4).

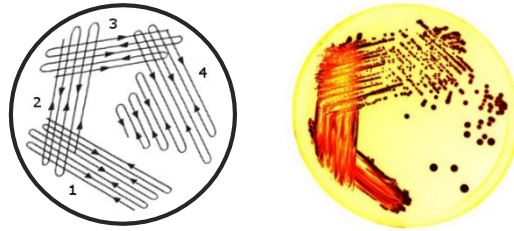


Figura 5. 2. Siembra por dilución americana.

- Siembra por aislamiento o dilución en placa (Técnica europea)
 1. Se procede de la misma forma que en la técnica americana, pero las líneas de cada estriado se realizan en una sola dirección.

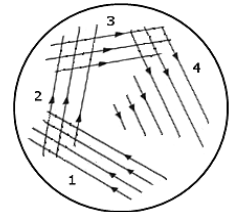


Figura 5. 1. Siembra por dilución europea.

- Siembra por agotamiento
 1. Transferir el inóculo en la superficie del agar cerca del borde, pero sin tocarlo.
 2. Con el asa plana contra la superficie del agar, estriar ligeramente el inóculo formando una línea continua.
 3. Estriar hasta cubrir la totalidad de la caja y sin tocar las estrías ya hechas. (Figura 5.3)

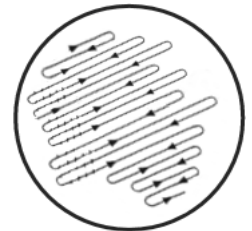


Figura 5. 3 Siembra por agotamiento

- Siembra en rejilla.
 1. Realizar una estría que atravesase el centro del agar.
 2. Luego realizar estrías en ángulo recto con respecto a la estría inicial.
 3. Girar el agar 90 grados y realizar estriado hasta cubrir todo el agar. (Figura 5.4)

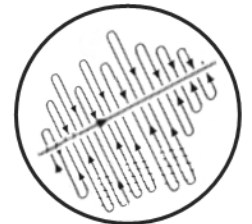


Figura 5. 4 Siembra en rejilla

- Sembrado masivo.
 1. Con un hisopo tomar un inóculo de la suspensión bacteriana ajustada al 0.5 del estándar de McFarland.
 2. Transferirla a la caja Petri con medio de cultivo, realizando asadas lineales de un extremo a otro y sin espacios de manera vertical, horizontal y diagonal de manera que se cubra toda la caja uniformemente del inóculo. (Figura 5.5)

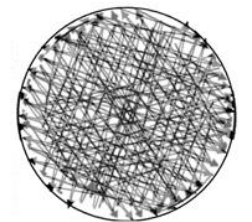


Figura 5. 5 Sembrado masivo

Técnicas de sembrado en tubos: recto e inclinado.

Se realizan por punción en agar recto (semisólido) y punción y estría en inclinado (sólido).

- Punción: Introducir el inoculo con el asa recta casi hasta el fondo del medio, con un solo movimiento y teniendo cuidado de hacer el mismo trayecto de entrada que de salida.
- Estría: Extender el inoculo sobre el agar inclinado, deslizando suavemente el asa por la superficie en forma de zigzag.
- No olvidar flamear la boca del tubo antes y después de la siembra.
- Evaluar la presencia de crecimiento en el agar por la formación de una película o por el crecimiento de colonias en la superficie.

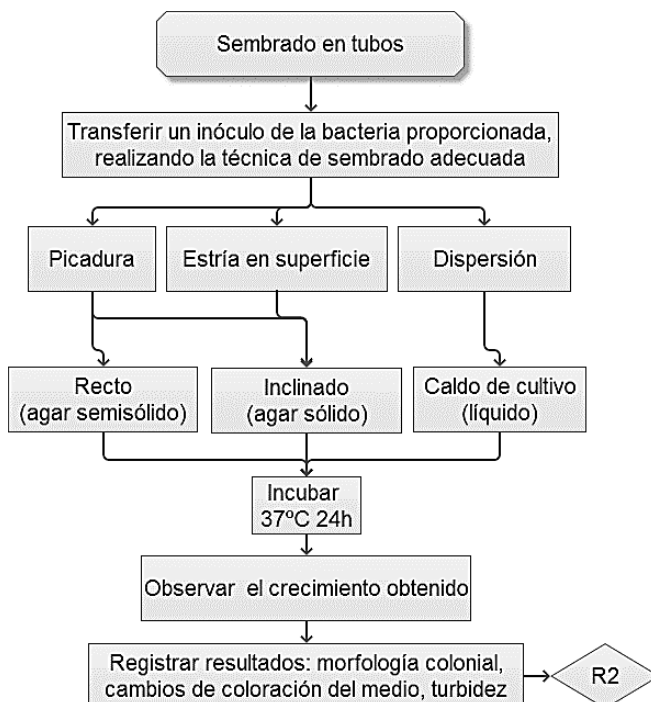
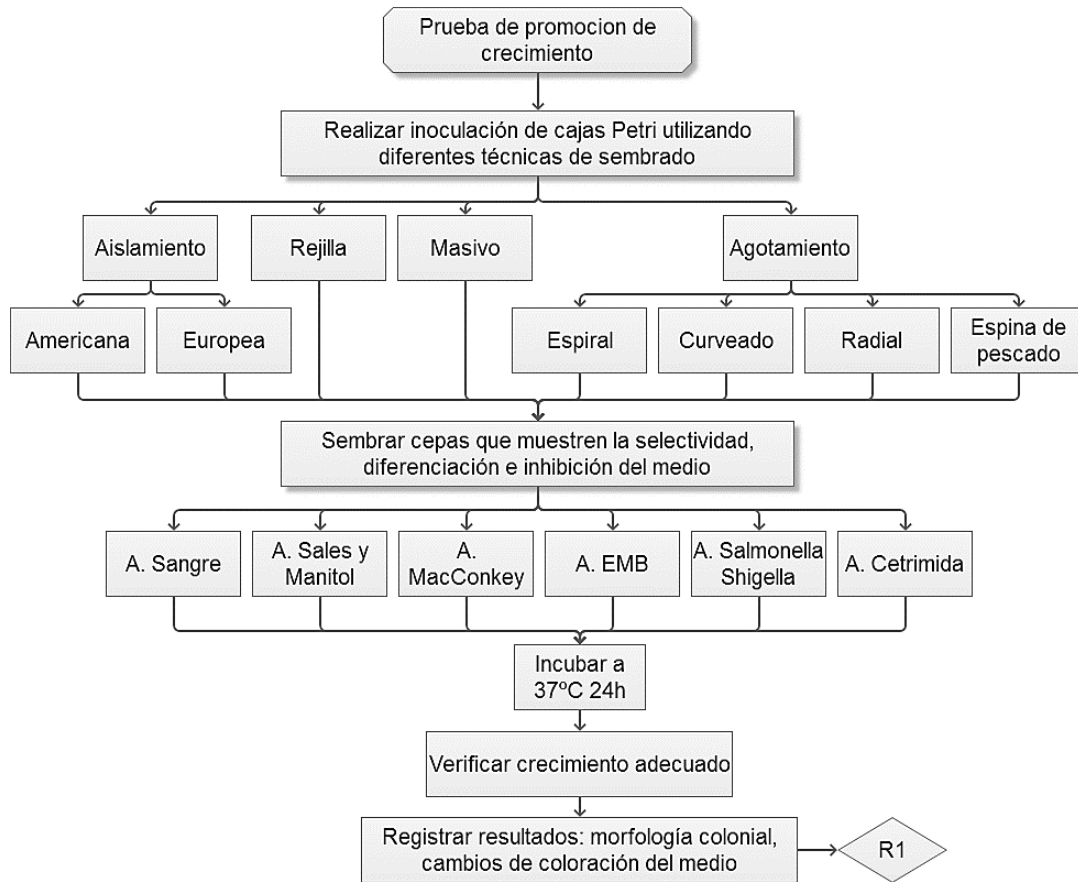
Prueba de promoción de crecimiento en medios de cultivo

1. Inocular cada caja con microorganismos que demuestren la selectividad y diferenciación del medio así como un testigo negativo para demostrar la inhibición de acuerdo a la tabla 5.2.
2. Incubar a 37°C por 24h.
3. La prueba del medio es exitosa si después de la incubación se observa crecimiento de los microorganismos para los cuales el medio es selectivo, y coinciden las características de diferenciación para cada cepa y no hay crecimiento en los testigos negativos.

Tabla 5. 2. Cepas control para prueba de promoción de crecimiento en medios de cultivo.

Agar	Crecimiento selectivo y diferencial			Inhibición
Sangre	α -hemolítico	β -hemolítico	γ -hemolítico	*no selectivo
	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>	
Sales y manitol	Gram +			Gram –
	Manitol +		Manitol -	
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>E.coli</i>
McConkey	Gram -			Gram +
	Lac +		Lac -	
	<i>E. coli</i>		<i>Proteus sp.</i>	<i>S. aureus</i>
EMB	Gram -			Gram +
	Lac + rápido	Lac + lento	Lac -	
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>
Salmonella Shigella	Gram -			Gram +
	Lac +	Lac -, H ₂ S -	Lac -, H ₂ S +	
	<i>E. coli</i>	<i>Shigella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>
Cetrimida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>E.coli</i>

Diagramas de flujo



Disposición de residuos

R1: Cajas Petri con cultivo, inactivar en autoclave y desechar.

R2: Tubos con cultivo, inactivar en autoclave y desechar.

Resultados

Prueba de crecimiento

Agar	Crecimiento selectivo y diferencial			Inhibición
Sangre	α-hemolítico	β-hemolítico	γ-hemolítico	*no selectivo
	<i>S. viridans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	
Observaciones (morfología colonial, cambios del medio etc.)				
Sales y Manitol	Gram +			Gram –
	Manitol +	Manitol -		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>		<i>E.coli</i>
Observaciones (morfología colonial, cambios del medio etc.)				
McConkey	Gram -			Gram +
	Lac +	Lac -		
	<i>E. coli</i>	<i>Proteus sp.</i>		<i>S. aureus</i>
Observaciones (morfología colonial, cambios del medio etc.)				
EMB	Gram -			Gram +
	Lac + rápido	Lac + lento	Lac -	
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>
Observaciones (morfología colonial, cambios del medio etc.)				
Salmonella Shigella	Gram -			Gram +
	Lac +	Lac - , H₂S -	Lac - , H₂S +	
	<i>E. coli</i>	<i>Shigella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>
Observaciones (morfología colonial, cambios del medio etc.)				
Cetrimida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>E.coli</i>	
Observaciones (morfología colonial, cambios del medio etc.)				

Referencias

1. Brock T. 1999. Robert Koch: a life in medicine and bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC.
2. Koch R. 1882. Die Ätiologie der Tuberculose. Berl Klin Wochenschr 15:221–230.

Tinciones

Desde que Antonie Van Leeuwenhoek empezó a describir las primeras bacterias, comenzó su clasificación por su similitud morfológica. Se formaron 4 grupos: los cocos, de forma esférica, los bacilos, en forma de pequeños bastones, los vibrios, ligeramente curvados y los espirilos.

Una vez conocida la forma de las bacterias, se empezó a observar que algunas se agrupan de una forma muy particular formando así otros grupos: los estreptococos en forma de cadenas, los diplococos en pares, las tetradas en grupos de cuatro, las sarcinas en forma de cubos, y los estafilococos en forma de racimo. Los bacilos también se agrupan en ciertas formas como: los diplobacilos en pares, los estreptobacilos en forma de cadenas, y en empalizadas que parecen formar letras chinas.

Las bacterias se pueden estudiar tiñéndolas o sin tinción, (montaje en fresco) Ésta preparación es útil para evidenciar la motilidad de las bacterias mediante microscopía óptica, mientras que las preparaciones teñidas nos sirven para mostrar los detalles estructurales de las células al producir un contraste de color.

Métodos de tinción

Las técnicas de tinción más utilizadas en la microbiología diagnóstica se describen a continuación:

Tinciones simples

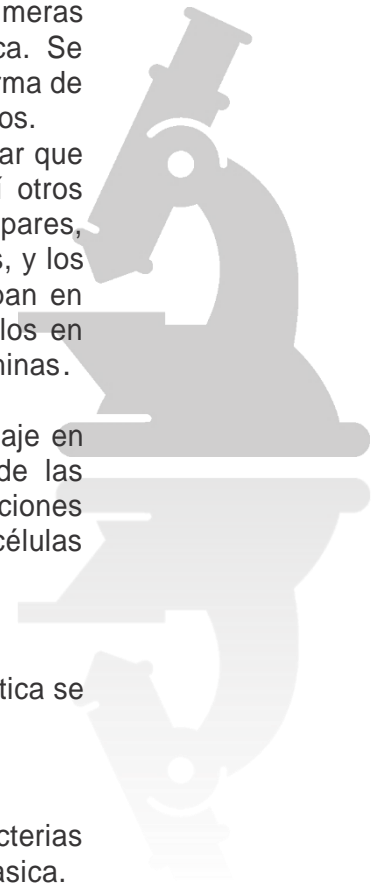
Proveen un contraste de color que es el mismo para todas las bacterias presentes en la preparación como el azul de metileno y fucsina básica.

Tinciones diferenciales

Le imparten diferentes colores a diferentes bacterias o diferentes estructuras bacterianas. Una de la más utilizadas es la tinción de Gram, que también se utiliza como un método conveniente para clasificar a las bacterias en dos grupos principales: Gram positivos y Gram negativos, debido a las características de la pared celular bacteriana (fig. 6.2). También la tinción de Ziehl Neelsen forma dos grandes grupos: las bacterias ácido alcohol resistentes, que se tiñen de color rojo, y las no ácido alcohol resistentes, que se tiñen de azul.

Tinción negativa

Los colorantes como la nigrosina producen un fondo oscuro y uniforme sobre el cual los organismos que no se han teñido resaltan debido al



contraste que se genera. Esto se utiliza para la demostración de la cápsula de bacterias u hongos que por lo general no se tiñe con tinciones simples (fig. 6.1).

Objetivo	Realizar diferentes técnicas de tinción de preparaciones microbianas sobre un portaobjetos, para conocer su fundamento y aplicación en la caracterización de los microorganismos de acuerdo con su morfología y afinidad por los colorantes.
-----------------	--

Materiales

Cultivos de bacterias y levaduras en cajas y/o tubos y/o muestra clínica: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*.
Papel filtro

Equipo

Microscopio óptico
Mechero Bunsen
Portaobjetos
Cubreobjetos

Reactivos

Tinción de Gram: Cristal violeta, lugol, alcohol acetona, safranina
Tinción negativa: Nigrosina o tinta china
Tinción de Ziehl-Neelsen: Fucsina fenicada, alcohol ácido, azul de metileno.
Tinción de Schaeffer-Fulton: Verde de malaquita,

Procedimiento

Tinción negativa

1. Colocar una gota de una suspensión de *Cryptococcus neoformans* o *Klebsiella pneumoniae* sobre un portaobjetos limpio, utilizando el asa de 10 μ L.
2. Colocar una gota de nigrosina a un lado de la suspensión anterior y homogeneizar con el asa.
3. Colocar el cubreobjetos.
4. Observar la preparación en fresco y ajustando la intensidad de la luz y apertura del diafragma del microscopio para distinguir la cápsula.
5. Registrar resultados

Resultados

- Bacilos teñidos de rojo sobre fondo azul: +
- Bacterias teñidas de azul: -

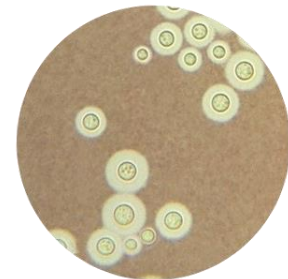


Figura 6. 1 Tinción negativa de *Cryptococcus neoformans*

Tinción de Gram

1. Flamear el asa de 10 mL
2. Tomar con el asa una gota de agua de un tubo con agua estéril.
3. Colocar el agua en el centro de la laminilla.
4. Flamear el asa y dejarla enfriar.
5. Preparar el frotis:
 - a. Tomar con el asa una pequeña porción de colonia.
 - b. Mezclarla con la gota de agua, realizando movimientos circulares.
6. Dejar secar al aire y fijar al mechero.
7. Colocar el portaobjetos en el puente de tinción.
8. Cubrir con cristal violeta por 1 minuto.
9. Enjuagar con un chorro suave de agua.
10. Cubrir con lugol 1 minuto.
11. Enjuagar con agua.
12. Decolorar con alcohol acetona por 5-10 segundos.
13. Enjuagar con agua.
14. Cubrir con safranina por 1 minuto.
15. Enjuagar con agua.
16. Dejar secar.
17. Observar al microscopio con los objetivos de 40x y 100x.
18. Registrar resultados

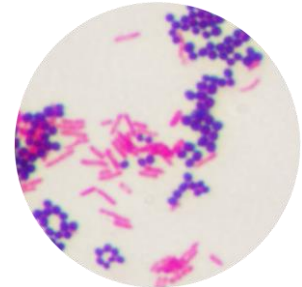


Figura 6. 2 Tinción de Gram de cocos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, en morado) y bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli*, en rojo).

Resultados para Tinción de Gram

Escribir en orden las observaciones siguientes:

1. Morfología celular: Cocos, Bacilos, Espirilos, Cocobacilos...
2. Tinción: Azul-violeta: Gram +
Rojo-rosa: Gram -
3. Agrupación: Pares, Cadenas, Racimos, Empalizadas...

Tinción de Ziehl-Neelsen (Bacilos Ácido Alcohol Resistentes)

1. Rotular con un lápiz de punta diamante el portaobjetos para evitar que se pueda borrar durante la tinción.
2. Preparar un frotis de
3. Dejar secar al aire y después fijar con metanol o a la flama del mechero.
4. Colocar el portaobjetos sobre un puente de tinción, y cubrirlo con un rectángulo de papel filtro que cubra todo el portaobjetos.
5. Cubrir toda la superficie del papel con fucsina fenicada.
6. Calentar hasta que comience a emitir vapores. No sobrecalentar y no dejar que se evapore todo el colorante, añadir más si es necesario. Mantener caliente por 5 a 10 minutos.
7. Quitar el papel filtro y enjuagar con un chorro de agua suave.
8. Cubrir el portaobjetos con alcohol ácido por 2 min.
9. Enjuagar con agua.
10. Cubrir con azul de metileno como colorante de contraste por 1 minuto.
11. Enjuagar con agua y dejar secar.
12. Observar al microscopio con el objetivo de 100x usando aceite de inmersión.
13. Registrar los resultados de las observaciones.



Figura 6. 3 Tinción de Ziehl-Neelsen para *Mycobacterium tuberculosis*.

Resultados

- Bacilos teñidos de rojo sobre fondo azul: +
- Bacterias teñidas de azul: -

Tinción de Schaeffer-Fulton (Endoesporas bacterianas)

1. Rotular con un lápiz de punta diamante el portaobjetos para evitar que se borre durante la tinción.
2. Tomar una asada del fondo del tubo de caldo cooked meat, y colocarla sobre el área central del portaobjetos con un movimiento rotacional continuo.
3. Dejar secar al aire y fijar a la flama del mechero.
4. Colocar el portaobjetos sobre un puente de tinción, y cubrirlo con un rectángulo de papel filtro que cubra todo el portaobjetos.
5. Cubrir toda la superficie del papel con verde de malaquita.
6. Calentar hasta que comience a emitir vapores. No sobrecalentar y no dejar que se evapore todo el colorante, añadir más si es necesario. Mantener caliente por 5 a 10 minutos.
7. Quitar el papel filtro y enjuagar con un chorro de agua suave.
8. Cubrir con safranina como colorante de contraste por 1 minuto.
9. Enjuagar con agua y dejar secar.
10. Observar al microscopio con el objetivo de 100x usando aceite de inmersión.
11. Registrar los resultados de las observaciones.

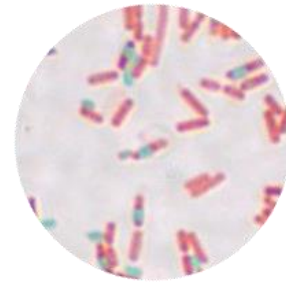


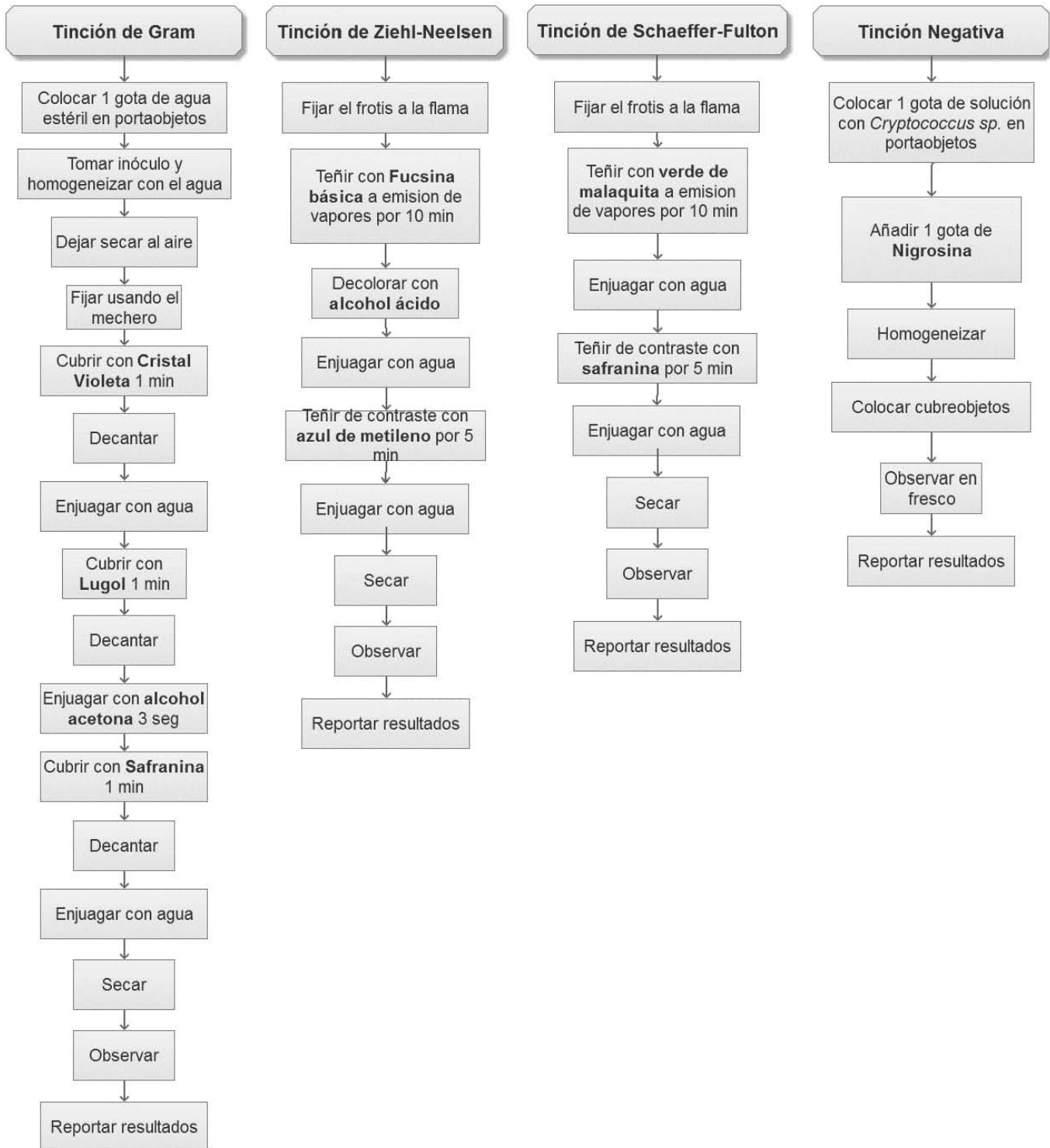
Figura 6. 4 Tinción de Schaeffer-Fulton para *Bacillus subtilis*.

Resultados

- Posición de la endoespora (color verde): Terminal, Subterminal o Central

*Los pasos 5-6 de las tinciones de Schaeffer-Fulton y de Ziehl-Neelsen pueden sustituirse por una caja Petri con suficiente colorante para sumergir las laminillas y se calientan a emisión de vapores por 5-10 min.

Diagramas de flujo

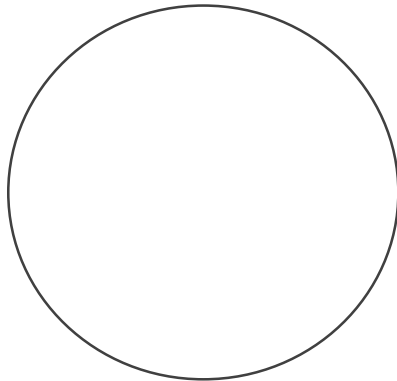


Disposición de residuos

R1: Laminillas: colocar en recipiente con desinfectante, esterilizar en autoclave y desechar en recipiente de punzocortantes.

Resultados

Observaciones al microscopio

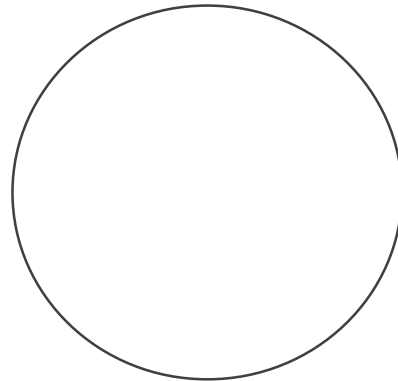


Tinción de Gram

Microorganismo:

Interpretación:

Aumento:

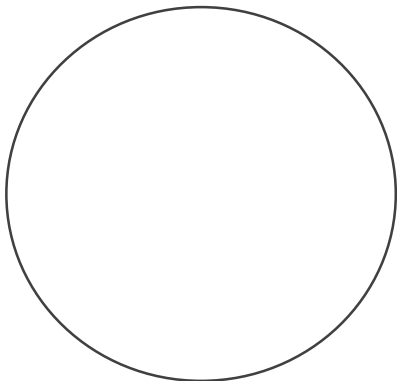


Tinción de Ziehl-Neelsen

Microorganismo:

Interpretación:

Aumento:

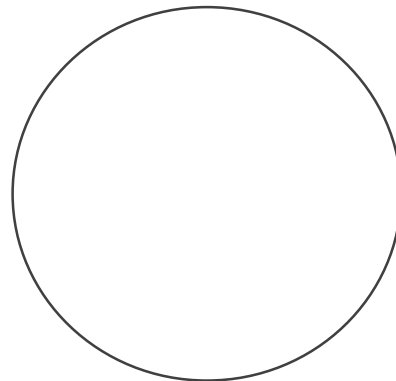


Tinción de Schaeffer-Fulton

Microorganismo:

Interpretación:

Aumento:



Tinción Negativa

Microorganismo:

Interpretación:

Aumento:

Referencias

1. Bergey, David H.; Holt, John G.; Krieg, Noel R.; Sneath, Peter H. A. (1994): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins, novena edición, 1994.
2. Madigan, M. T; Martinko J., Parker J. (2015): *Brock Biología de los microorganismos*. 14va ed. Pearson
3. Vasanthakumari, R., Jagannath, K., & Rajasekaran, S. (1986). A cold staining method for acid-fast bacilli. *Bulletin of the World Health Organization*, 64(5), 741-743.

Pruebas de identificación primarias

La identificación de microorganismos mediante criterios fenotípicos se basa en características morfológicas o metabólicas de las bacterias.

A continuación se muestran cinco pruebas preliminares para la identificación a partir de un cultivo puro.

Pruebas que muestran características morfológicas de la célula.

Morfología macroscópica

Morfología colonial

En el primer cultivo a partir de una muestra, se selecciona una o varias colonias de interés, para aislarlas y purificarlas, sembrándolas en un medio de cultivo nuevo. La morfología colonial y los cambios en el medio de cultivo son tomados en cuenta para la realización de las pruebas posteriores (ver Tabla 5.1).

Morfología microscópica

Tinción de Gram

Facilita la evaluación microscópica de la morfología celular bacteriana. Suele ser el primer paso en todo esquema de identificación ya que proporciona la información más básica e importante empleada por las estrategias de identificación definitiva. En muchos casos debe teñirse cada colonia que presenta una morfología diferente en la placa primaria.

Prueba de motilidad

La motilidad se puede observar por un crecimiento turbio lejos de la picadura recta realizada en la inoculación de los medios OF o en un medio SIM. También se puede utilizar la técnica de gota suspendida bacteriana.

Gota suspendida

Es uno de los métodos más simples para examinar a los microorganismos móviles vivos. Su uso principal es para determinar si un organismo tiene motilidad o no (debe poseer flagelos), pero también permite visualizar los patrones normales de los agrupamientos celulares sin distorsionar la forma de la célula. La motilidad desempeña un papel importante en la supervivencia y la capacidad de ciertas bacterias de causar enfermedad. Para esta prueba se necesita un cultivo bacteriano reciente en caldo.



QR 2 Gota suspendida (video)

Reporte de resultados para Motilidad

- Móvil: +
- Inmóvil: -

Pruebas que muestran características bioquímicas de la célula.

Prueba de catalasa

La enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno, producto de la respiración aerobia, por lo que protege a la célula. Su presencia se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano. La producción rápida de burbujas (efervescencia) cuando el cultivo bacteriano se mezcla con una solución de peróxido de hidrógeno se interpreta como una prueba positiva. Si el inóculo se contamina accidentalmente con eritrocitos cuando se recolecta de una placa de agar con sangre puede haber una producción débil de burbujas, porque la catalasa también se encuentra en los eritrocitos. Pero esto no debe interpretarse como una prueba positiva.

Reporte de resultados para Catalasa

- Efervescencia: +
- Sin cambios: -



Figura 7. 1. Prueba de catalasa.

Prueba de oxidasa

La enzima citocromo oxidasa participa en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato de ciertas bacterias. La prueba se realiza frotando una muestra de una colonia bacteriana sobre un papel filtro impregnado con el reactivo clorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1% (método de Kovac). Se recomienda emplear un asa de platino o palillo de madera, pues si se utiliza un asa de hierro puede producirse una reacción positiva falsa. Ciertos microorganismos pueden mostrar reacciones positivas leves después de 10 segundos, estos resultados no se consideran definitivos.

Reporte de resultados para Oxidasa

- Cambio inmediato a color azul oscuro: +
- Sin cambios: -



Figura 7. 2. Prueba de oxidasa.

Prueba de OF (oxidación y fermentación)

La forma en que un microorganismo metaboliza un carbohidrato se determina mediante la observación de los subproductos ácidos que produce en presencia o ausencia de oxígeno. El microorganismo que se desea identificar se siembra en dos tubos del medio OF, uno de los cuales se cubre con aceite mineral para impedir el ingreso de oxígeno. El uso oxidativo del carbohidrato producirá ácidos sólo en el tubo abierto que virarán el color de medio a amarillo. La utilización fermentativa del carbohidrato dará como resultado la producción de ácido tanto en el tubo abiertos como cerrado. Los organismos incapaces de metabolizar el carbohidrato (asacarolíticos), no producirán ácido en ninguno de los dos tubos. También es posible preparar varios medios con carbohidratos distintos cada uno, a manera de batería, para evaluar su capacidad de fermentar alguno de ellos. La interpretación de los resultados se muestra en la tabla 7.1.

Tabla 7. 1. Interpretación de la prueba de OF.

Utilización del carbohidrato	Tubo Abierto (sin capa de aceite)	Tubo Cerrado (con capa de aceite)
Oxidación (O)	Positivo (amarillo)	Negativo (verde)
Fermentación facultativa (O+ F+)	Positivo (amarillo)	Positivo (amarillo)
Fermentación estricta (O- F+)	Negativo (verde)	Positivo (amarillo)
No oxidador/No Fermentador (NR)	Negativo (verde)	Negativo (verde)



Figura 7. 3. Prueba de OF.

Objetivo Identificar el género de un cultivo bacteriano puro mediante la realización de pruebas de identificación primarias, para comprender su importancia en la planeación de un esquema de identificación completo para el diagnóstico microbiológico.

Materiales

Cultivos bacterianos en cajas y tubos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. *Enterobacter* spp.

2 Tubos para prueba de OF con Glucosa

Equipo

Microscopio óptico, Asas bacteriológicas
 Aplicadores o palillos de madera estériles
 Gradilla, Mechero Bunsen, Portaobjetos
 Cubreobjetos

Reactivos

Tren de tinción de Gram
 Solución salina fisiológica
 Peróxido de Hidrógeno al 3%
 Tetrametil-p-fenilendiamina (tiras o discos)
 Aceite mineral

Procedimiento

Tinción de Gram

1. Realizar la tinción de Gram como se describe en la práctica 6.
2. Observar al microscopio en 100X
3. Registrar resultados de la morfología y agrupación observadas.
4. Colocar la laminilla en un recipiente con desinfectante.

Prueba de Catalasa

1. Con un asa estéril, tomar el centro de una colonia y colocarlo directamente en el portaobjetos.
2. Colocar una gota de peróxido de hidrógeno sobre la preparación.
3. Observar la aparición de burbujas de gas y registrar los resultados.
4. Desechar el portaobjetos en el frasco con desinfectante.

Prueba de Citocromo Oxidasa

1. Colocar en un papel filtro el reactivo de oxidasa.
2. Usando un palillo de madera estéril tomar una colonia y frotarla en un área pequeña del papel filtro.
3. La reacción positiva es un cambio inmediato de color, de rosa claro a morado oscuro. (En la misma tira reactiva pueden probarse varias colonias de manera simultánea)
4. Registrar los resultados.
5. Desechar los palillos y papel en el frasco con desinfectante.

Prueba de Oxidación-Fermentación

1. Inocular los dos tubos mediante picadura hasta el fondo.
2. Adicionar en condiciones de esterilidad a uno de los dos tubos una capa de aceite mineral estéril de 1 cm de espesor.
3. Cerrar la tapa del tubo con aceite mineral y al otro tubo dejar floja la tapa.
4. Incubar a 37°C por 24-48h.
5. Observar el cambio de coloración del medio y la posible presencia de gas.

Prueba de motilidad.

Técnica de gota suspendida

1. Agregar sobre un cubreobjetos una gota de solución salina fisiológica estéril.
2. Colocar con el asa un inóculo pequeño de la colonia.
3. Homogeneizar de tal forma que la gota no se extienda mucho.
4. Colocar el cubreobjetos con la gota hacia abajo encima de un portaobjetos, al que previamente se le ha puesto una base de 4 bolitas pequeñas de plastilina, con el objetivo de evitar que la gota tenga contacto con el portaobjetos en la parte inferior.
5. Observar en 40X teniendo cuidado de no hacer contacto con el cubreobjetos.
6. Reducir al máximo la cantidad de luz del microscopio para poder observar, ya que no están teñidas y también para reducir la evaporación del agua.
7. Observar al menos 5 a 10 bacterias recorrer todo el campo de visión para declarar una motilidad positiva.

Nota: la motilidad verdadera de las bacterias depende de si poseen flagelos con los cuales se pueden propulsar con movimientos progresivos y direccionales. Este movimiento debe distinguirse del movimiento vibratorio de los organismos o de otras partículas suspendidas en un fluido, el cual se llama movimiento Browniano y es irregular. Tampoco confundir con el movimiento causado por las corrientes en el líquido causadas por burbujas o corrientes de aire.

Motilidad en medios de cultivo

La motilidad también se puede observar por un crecimiento turbio lejos de la picadura recta realizada en la inoculación de los medios semisólidos como medio SIM (fig. 7.4).

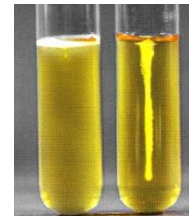
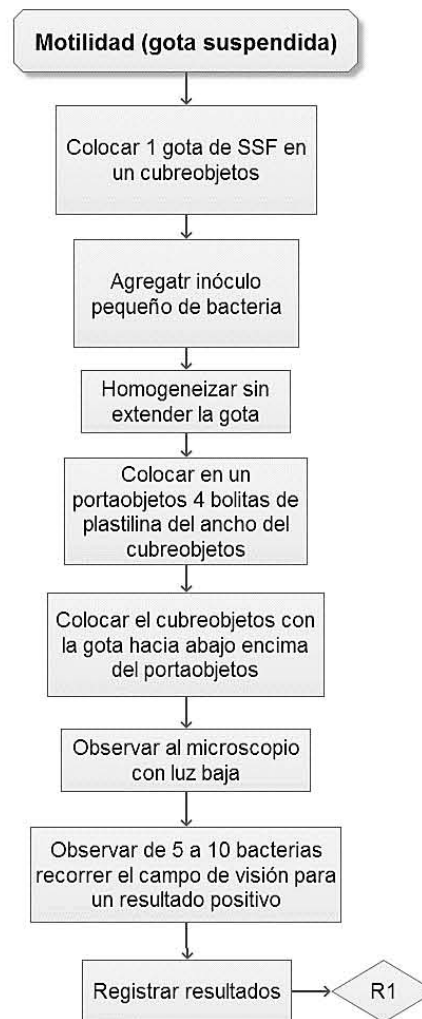
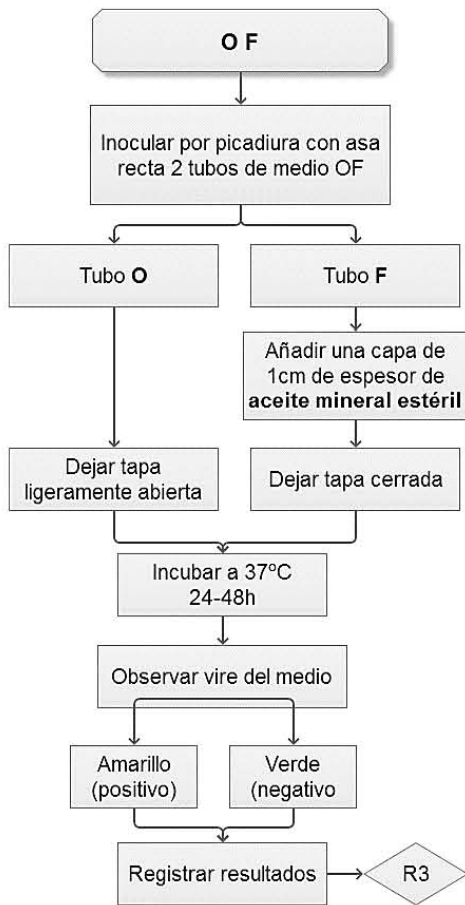
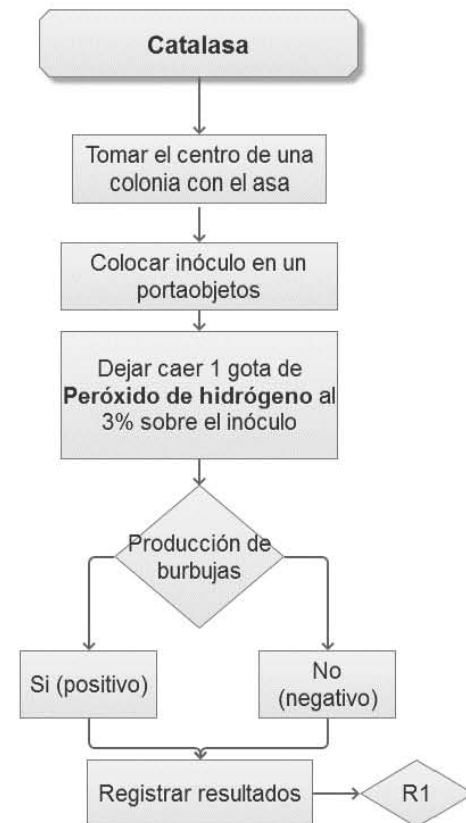
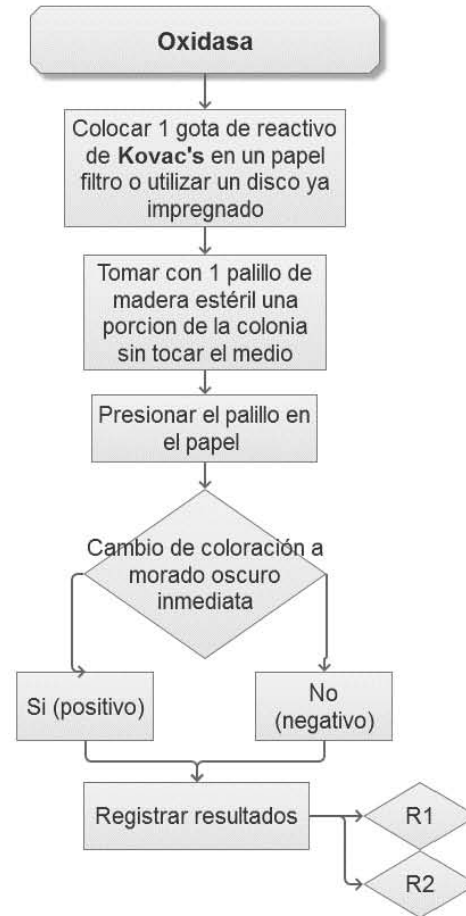
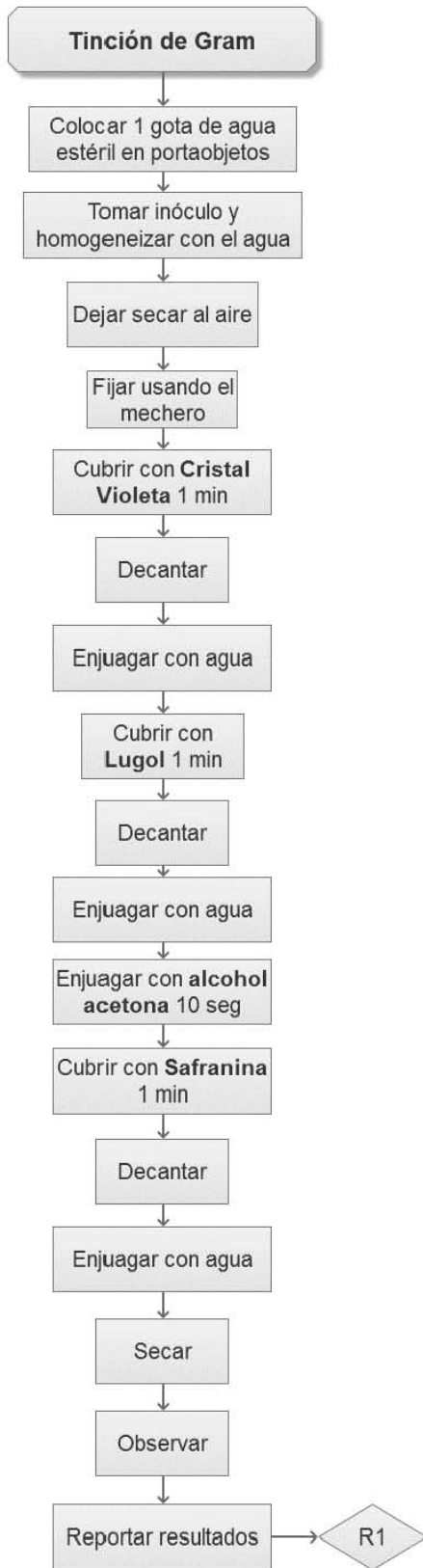


Figura 7. 4 Motilidad en medio SIM: Izquierda positiva, derecha negativa)

Diagramas de flujo





Disposición de residuos

R1, R2: Portaobjetos, cubreobjetos y palillos contaminados, colocar en recipiente con desinfectante, esterilizar en autoclave y desechar en recipiente de punzocortantes.

R3: Tubos con medio OF contaminados, inactivar en autoclave y desechar.

Resultados

Interpretación de las pruebas bioquímicas primarias realizadas

Gram	Morfología:	Gram: + ó -	Agrupación:
Catalasa	Positiva: +		Negativa: -
Oxidasa	Positiva: +		Negativa: -
OF	Oxidativo: O		Fermentador: F
Motilidad	Positiva: +		Negativa: -

Morfología colonial:	
Género Identificado:	

Referencias

1. Forbes, B. (2009). Bailey y Scott; Diagnóstico microbiológico. 12a edición. Buenos Aires: Médica Panamericana.
2. Hugh, R., & Leifson, E. (1953). THE TAXONOMIC SIGNIFICANCE OF FERMENTATIVE VERSUS OXIDATIVE METABOLISM OF CARBOHYDRATES BY VARIOUS GRAM NEGATIVE BACTERIA. *Journal of Bacteriology*, 66(1), 24–26.
3. Madigan, M. T; Martinko J., Parker J. (2015): Brock Biología de los microorganismos. 14va ed. Pearson.
4. Surinder, K. (2002) Textbook of microbiology. JP Medical Ltd

Pruebas de identificación secundarias

Posterior a la realización de las pruebas de identificación primarias, se pueden establecer las pruebas secundarias a realizar. Éstas son más específicas y podemos llegar a identificar la especie. Por lo general se efectúan al mismo tiempo utilizando conjuntos de pruebas de acuerdo a la familia o género previamente identificado.

Los microorganismos poseen un metabolismo celular que se lleva a cabo por catalizadores biológicos conocidos como enzimas, que son expresadas por el material genético de cada especie, aunque existen variaciones en la expresión de estas enzimas dentro de una misma especie, se puede utilizar esta información para realizar un perfil bioquímico del microorganismo y poder identificarlo. Éstas reacciones pueden ocurrir fuera y dentro de la célula.

Enzimas extracelulares (exoenzimas)

Actúan sobre las moléculas como polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN que se encuentran en el medio y que no pueden pasar a través de las membranas celulares, por lo tanto deben ser degradados. Las pruebas para éstas reacciones se observan como un cambio en las características físicas del medio alrededor del crecimiento bacteriano, como: licuefacción en la prueba de gelatinasa o que el medio se torne translúcido en las pruebas de hidrólisis de ADN o lípidos.

Enzimas intracelulares (endoenzimas)

Éstas actúan dentro de la célula y son útiles para la producción de energía entre muchas otras reacciones y como resultado de estos procesos metabólicos se forman metabolitos de desecho que son excretados al medio. Debido a las características químicas de estos metabolitos como acidez, basicidad y reactividad con otras moléculas que se encuentran en el medio, podemos observar desde cambios de coloración de los indicadores de pH (figura 8.1) o formación de precipitados, así como la expulsión de gases que se pueden recolectar dentro de un tubo interno, llamado campana de Durham. El siguiente esquema simplificado muestra algunas de las reacciones bioquímicas experimentales utilizadas para separar, identificar y clasificar a los microorganismos (Fig. 8.1).



Tabla 8. 1. Color y rango de vire de los indicadores de pH más utilizados en microbiología.

Indicador	pH y color	
	Ácido	Alcalino
Rojo de metilo	4.2 – Rojo	6.3 - Amarillo
Tornasol	5.0 – Rosa	8.0 - Azul
Púrpura de Bromocresol	5.2 – Amarillo	6.8 - Púrpura
Azul de Bromotimol	6.0 – Amarillo	7.6 - Azul
Rojo neutro	6.8 – Rojo	8.0 - Amarillo
Rojo de Fenol	6.8 - Amarillo	8.4 - Rojo

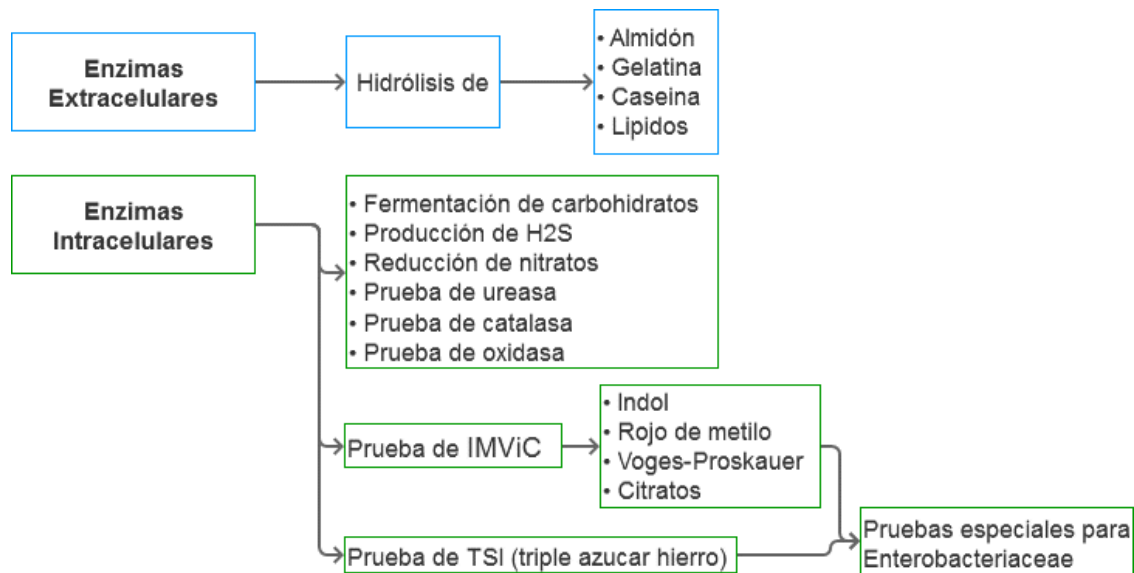


Figura 8. 1 Algunas actividades enzimáticas bacterianas útiles para su identificación

Pruebas IMViC

Son un grupo de pruebas para identificar bacterias de la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram negativos, aeróbicos o anaeróbicos facultativos que pueden producir gas a partir de lactosa en 48 horas. Los resultados de las pruebas IMViC para algunas enterobacterias se muestran en la tabla 8.2.

El término "IMViC" es un acrónimo para cada una de estas pruebas. "I" es para la prueba del indol; "M" es para prueba de rojo de metilo; "V" es para la prueba de Voges-Proskauer, y "C" para la prueba de utilización de citrato.

Tabla 8. 2. Resultados de las pruebas IMViC para algunas enterobacterias.

Especie	Indol	Rojo de Metilo	Voges-Proskauer	Citrato
<i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Shigella spp.</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Salmonella spp.</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Klebsiella spp.</i>	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
<i>Proteus vulgaris</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Proteus mirabilis</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Citrobacter freundii</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Objetivo

Conocer los métodos bioquímicos más comunes para la identificación bacteriana, utilizando bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, para poder establecer el género y especie de una cepa desconocida.

Materiales

Cultivos de enterobacterias a identificar
Tubos de pruebas: Arginina, Citrato, Gelatina, KIA, LIA, Malonato, MIO, MR-VP, Nitratos, SIM, TSI, Urea de Christensen y Urea de Stuart.
Mechero Bunsen
Gradilla
Aceite mineral estéril
Asa recta y asa cerrada

Reactivos para lectura

Prueba de nitratos: A (ácido sulfanílico), B (α -naftilamina) y polvo de zinc
Pruebas de Indol: Reactivo de Kovac
Prueba de MR: Rojo de metilo
Prueba de VP: A(α -naftol 5%) y B(KOH al 10%)
Prueba de Fenilalanina desaminasa: (FeCl_3 al 10%)

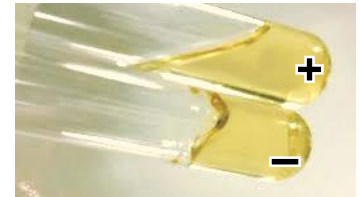
Procedimiento

1. Colocar todos los tubos para las pruebas bioquímicas en una gradilla, identificarlos y rotularlos con el nombre de la prueba abreviado.
2. Los tubos se inoculan de la siguiente manera:
 - Sólido (pico de flauta): por picadura hasta 3mm del fondo y estriado en la superficie con asa recta, excepto Citratos (sólo estriado).
 - Semisólidos: por picadura con asa recta, para la prueba MIO, adicionar una capa de 5mm de aceite mineral estéril al terminar de inocular.
 - Líquido (Caldos): sembrar disgregando un inóculo pesado con asa cerrada (una asada).
3. Al terminar de inocular, colocar todos los tubos por equipo en un bote rotulado para su posterior incubación.
4. Realizar las lecturas de las pruebas cuando se cumpla el tiempo de incubación específico para cada una.

Pruebas simples (un solo sustrato)

Prueba de hidrólisis de gelatina

1. Con un asa recta sembrar por punción sin tocar el fondo del tubo.
2. Incubar 37°C por 48 h.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente y refrigerar a 4°C por 10 min.
4. Inclinar el tubo para observar si existe licuefacción.



Resultados

- Positivo: Licuefacción parcial o total del medio a 4°C
- Negativo: Medio sólido a 4°C.

Prueba de Citrato

1. Inocular suavemente la parte superior del agar formando estrías.
2. Incubar 37°C por 24-48 h con el tapón flojo.



Resultados.

- Positivo: Cambio de coloración a azul Prusia y crecimiento
- Negativo: sin cambios (medio color verde).

Prueba de Arginina

1. Sembrar el caldo con inóculo pesado.
2. Adicionar una capa de 1 cm de aceite mineral estéril.
3. Incubar 37°C por 24 h. *De ser posible revisar los resultados a las 8h



Resultados

- Positivo: cambio de coloración del medio a violeta.
- Negativo: sin cambios de color (amarillo).

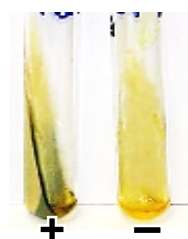
Prueba de Fenilalanina Desaminasa

1. Sembrar por picadura y estría.
2. Incubar a 37°C por 48 h.

Resultados

1. Adicionar 3 gotas de FeCl₃ al 10%

- Positivo: cambio de coloración a verde oscuro.
- Negativo: sin cambios de color (amarillo).

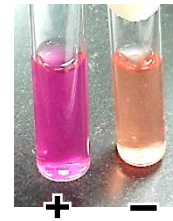


Prueba de Ureasa (caldo urea de Stuart)

1. Sembrar con inóculo pesado el caldo
2. Incubar 37°C por 48 h.

Resultados

- Positivo: Cambio de coloración de naranja a magenta
- Negativo: sin cambios de color

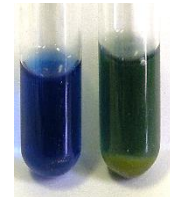


Prueba de Malonato

1. Sembrar con inóculo pesado el caldo
2. Incubar 37°C por 48 h.

Resultados

- Positivo: Cambio de coloración del caldo a azul
- Negativo: sin cambios de color (verde)



Prueba de Rojo de Metilo/Vogues-Proskauer (MR-VP)

1. Sembrar un inóculo pesado al caldo
2. Incubar 37°C por 24 h como.
3. Separar el caldo en dos alícuotas para las pruebas de MR y VP.
4. La prueba de MR se lee inmediatamente y el tubo de la prueba VP se coloca en la incubadora otras 24 h para su lectura posterior.

+ -

Prueba de MR (Lectura a las 24 h de incubación)

1. Agregar 4 gotas del indicador rojo de metilo y observar la reacción inmediata.

Resultados

Positivo: color rojo brillante indicativo de la fermentación ácida mixta.
Negativo: amarillo.



Prueba de VP (Lectura a las 48 h de incubación)

1. Agregar 6 gotas de solución A(α -naftol) y 2 gotas de solución B(KOH al 10%), **en ese orden**.
2. Agitar y observar 3 min.

Resultados

Positivo: formación de anillo en la parte superior color rojo, indicativo de la producción de acetoina.
Negativo: amarillo.



Prueba de reducción de Nitratos ($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$)

1. Se siembra el caldo nitrato con un inóculo pesado.
2. Incubar a 37°C por 48 h.
3. Observar el cultivo en busca de gas presente en la campana de Durham si es que contiene, lo que indica una reducción total hasta N_2 .
4. Agregar tres gotas de cada solución de los reactivos para nitratos A(ácido sulfanílico) y B(α -naftilamina).
5. Observar la aparición del color rojo durante al menos 3 min, Lo que indica una reducción a nitritos (prueba positiva)
6. Si no aparece el color se adiciona polvo de zinc, tomando una cantidad pequeña con un palillo de madera y sumergiéndolo en el caldo.
7. Observar la aparición de color rojo (negativa) o la ausencia de color (positiva).

Resultados

- **Positivo:**

- Reducción parcial de $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ Cambio de coloración a rojo al adicionar los reactivos A(ácido sulfanílico) y B(α -naftilamina).
- Reducción total de $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$ No hay cambio de coloración tras la adición de los reactivos y zinc.

- **Negativo:** (Sin reducción de nitritos) Cambio de coloración a rojo al adicionar los reactivos y el zinc.



Pruebas múltiples (varias vías metabólicas)

Prueba de TSI (Triple Azúcar Hierro)

Contiene tres carbohidratos: lactosa (1%), sacarosa (1%) y glucosa (0.1%).

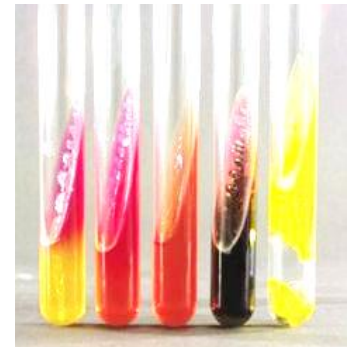
La adición de sacarosa permite la detección temprana de bacterias coliformes que fermentan la sacarosa más rápido que la lactosa. También ayuda a la identificación de bacterias Gram negativas que pueden fermentar la sacarosa y no la lactosa, con posible producción de gas y/o H_2S .

1. Con un asa recta sembrar primero por punción sin tocar el fondo del tubo y después por formación de estrías en la superficie del agar inclinado.
2. Dejar la tapa floja e incubar a 37°C de 18 a 24 h.
3. Leer los resultados dentro de ese periodo exclusivamente.

Resultados

Se registra primero el resultado de la parte superior del tubo y después el fondo: A=ácido (amarillo), K=alcalino (rojo)

- (K/K) = no hay fermentación de carbohidratos.
- (K/A) = fermentación de la glucosa solamente.
- (A/A) = fermentación de la lactosa y glucosa o sacarosa.
- (H_2S^+) = producción de ácido sulfhídrico (formación de precipitado negro).
- Burbujas o grietas en el tubo = producción de CO_2 o H_2 = fermentación con gas, se dibuja un círculo alrededor de la A



Prueba de KIA (Agar Hierro de Kligler)

El agar KIA es similar al agar TSI excepto que contiene sólo dos carbohidratos glucosa (0.1%) y lactosa (1%).

1. Con un asa recta sembrar primero por punción sin tocar el fondo del tubo y después por formación de estrías en la superficie del agar inclinado.
2. Dejar la tapa floja e incubar a 37°C de 18 a 24 h. *De ser posible revisar los resultados a las 12h

Resultados

Se registra primero el resultado de la parte superior del tubo (parte aeróbica) y después la del fondo (anaeróbica): A=ácido (amarillo), K=alcalino (rojo)

- (K/K) = no hay fermentación de carbohidratos.
- (K/A) = fermentación de la glucosa solamente.
- (A/A) = fermentación de la lactosa y glucosa.
- (H₂S⁺) = producción de ácido sulfhídrico (formación de precipitado negro).
- Burbujas o grietas en el tubo producción de CO₂ o H₂ = fermentación con gas, se dibuja un círculo alrededor de la A



Prueba de SIM (Sulfuro, Indol, Motilidad)

1. Con un asa recta sembrar por punción sin tocar el fondo del tubo.
2. Incubar 37°C por 48 h.
3. Observar la evidencia de motilidad por un crecimiento turbio que se aleja del lugar de punción, también observar la formación de precipitado negro.
4. Adicionar 1 o 2 gotas de reactivo de Kovac y dejar reposar 3 min.
5. Observar la formación de un anillo de color rojo en la superficie.

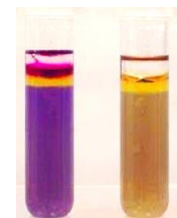


Resultados

- (Motilidad +) Crecimiento turbio a partir del lugar de punción
 - (H₂S⁺) = Formación de precipitado negro
 - (Indol +) = Formación del anillo rojo tras la adición del reactivo de Kovac
- * es preferible la interpretación del Indol en el medio SIM al MIO

Prueba de MIO (Motilidad, Indol, Ornitina)

1. Con un asa recta sembrar por punción sin tocar el fondo del tubo.
2. Adicionar una capa de 1 cm de aceite mineral estéril.
3. Incubar 37°C por 48 h.
4. Observar la evidencia de motilidad por un crecimiento turbio que se aleja del lugar de punción y el cambio de coloración del medio.
5. Adicionar 5 gotas del reactivo de Kovac.
6. Observar la formación del anillo rojo.



Resultados

- (Ornitina +) = Cambio de coloración del medio a purpura oscuro
- (Motilidad +) = Crecimiento turbio a partir del lugar de punción
- (Indol +) = formación del anillo rojo tras la adición del reactivo de Kovac

Prueba de LIA (Agar Lisina Hierro)

1. Con un asa recta sembrar primero por punción hasta el fondo del tubo y después por formación de estrías en la superficie del agar inclinado.
2. Dejar floja la tapa e incubar a 37°C por 24 h.

Resultados

Se registra primero el resultado de la parte superior del tubo y después la del fondo:

A=ácido (amarillo), K=alcalino (morado), R=(rojo).

- (K/K) = descarboxilación de la lisina y falta de fermentación de la glucosa.
- (K/A) = fermentación de la glucosa.
- (R/A) = Rojo en el Agar inclinado/ácido en el fondo: desaminación de la lisina y fermentación de la glucosa.
- (H_2S^+) = producción de ácido sulfhídrico (formación de precipitado negro).

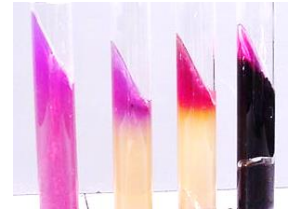
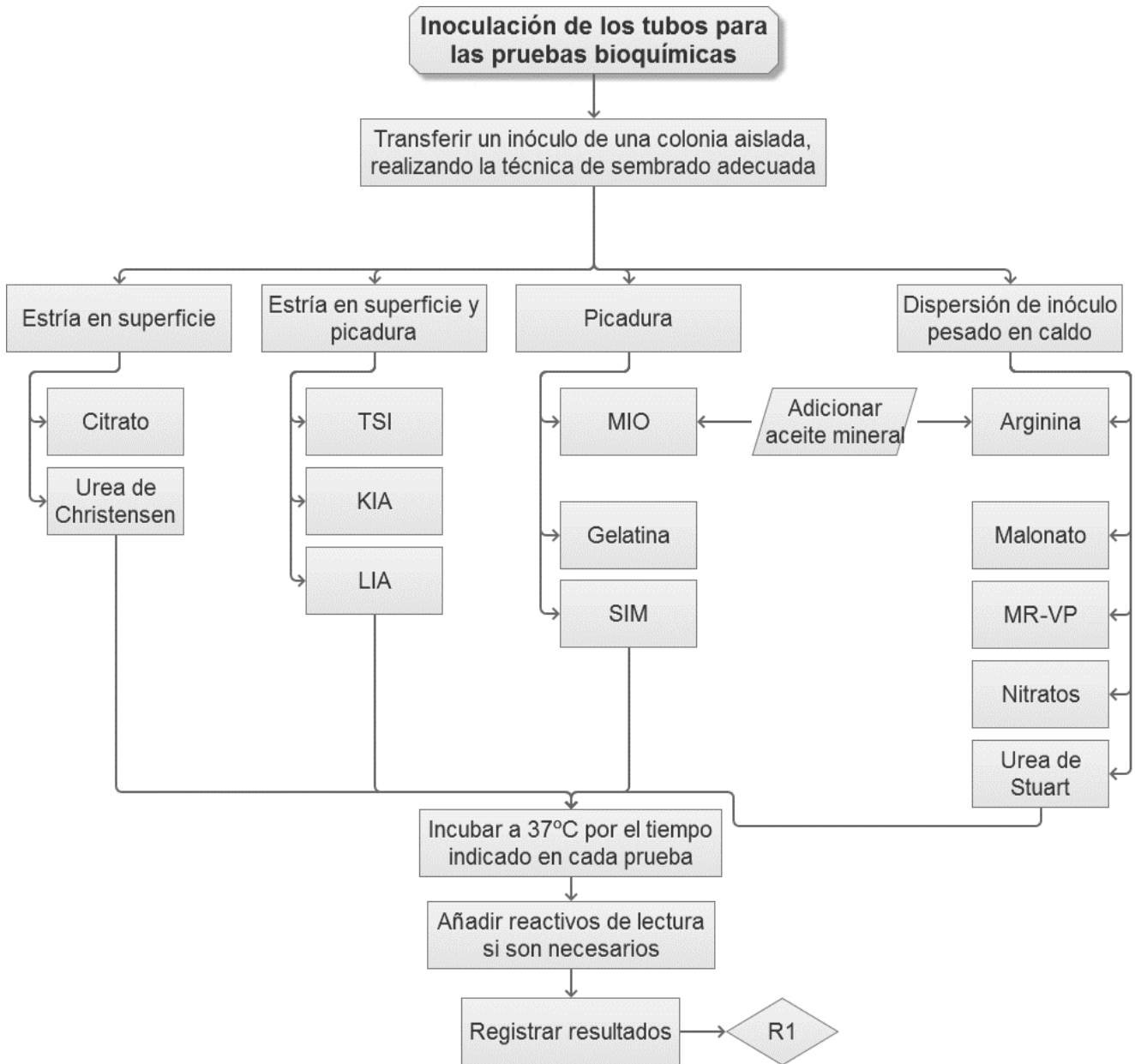


Diagrama de flujo



Disposición de residuos

R1: Tubos de pruebas bioquímicas, inactivar en autoclave, lavar.

Antibiograma

El antibiograma es un método de estudio in vitro del comportamiento de los antimicrobianos frente a los agentes infecciosos. Tiene como finalidad proporcionar información útil para iniciar el tratamiento con antibióticos. Con los resultados obtenidos en el antibiograma clasificamos a las bacterias en: sensibles, moderadamente sensibles y resistentes a un determinado antimicrobiano.

La información que proporciona el antibiograma es muy valiosa y para establecer una terapia adecuada se consideran las características del antimicrobiano, las características clínicas del proceso infeccioso y las propias del paciente.

Técnicas de realización del antibiograma

Para la realización del antibiograma es imprescindible partir de cultivos puros y con una concentración determinada, si se quieren obtener resultados fiables. Las técnicas más utilizadas son:

Kirby-Bauer: difusión en medio sólido con discos de carga constante

Dilución en medio líquido: se utiliza un gradiente de concentraciones del antimicrobiano con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La elección de la técnica depende en gran medida del material disponible y de la experiencia del personal de laboratorio. Una técnica laboriosa como la dilución en placa no es necesariamente más exacta que otra más sencilla como la de difusión en agar, aunque los resultados obtenidos con una u otra difieren en cuanto al tipo de información que ofrecen. La técnica de dilución proporciona datos cuantitativos y la de difusión en agar solamente cualitativos, pero lo más importante en todas las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos independientemente de la técnica empleada es asegurarse de su exactitud y reproductibilidad aparte de realizar todas las operaciones correctamente y emplear controles adecuados.

De los muchos medios disponibles, el agar Mueller-Hinton es el más utilizado en las pruebas de sensibilidad para bacterias no exigentes por las siguientes razones:

- No es selectivo ni diferencial, por lo que prácticamente todos los microorganismos pueden desarrollarse
- El almidón que contiene absorbe toxinas de las bacterias.
- Tiene un menor contenido de agar, lo que facilita la difusión de los antibióticos.

Objetivos Realizar pruebas de sensibilidad bacteriana frente a antimicrobianos, mediante una macrodilución en caldo, para determinar la concentración mínima inhibitoria.
Realizar pruebas de difusión en agar con las técnicas de Kirby-Bauer y E-Test para evaluar la sensibilidad a distintos antibióticos

Materiales

Cultivos bacterianos de:
Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*
Discos impregnados con antibióticos: Ampicilina Gentamicina y Oxacilina
Antibióticos inyectables: Amikacina, Ciprofloxacino, Gentamicina
1 Tubo con caldo nutritivo
12 Tubos con caldo Mueller Hinton
2 Cajas de agar MH
1 Caja de agar AST
Tubo estéril grande
Pipetas serológicas de 2, 5 y 10 mL
Micropipetas de 10-100 μ L y 20-200 μ L
Hisopos de algodón estériles
Estándar de turbidez de McFarland 0.5
Tiras de E-test, Regla milimétrica

Procedimiento

Macrodilución en caldo

1. Preparar en un tubo estéril una solución de antibiótico a evaluar, para que tenga una concentración de 5120 μ g/mL. Rotular como tubo A.
2. Transferir 0.2 mL del tubo A al tubo 1 que contiene 1.8 mL de caldo Mueller Hinton y homogeneizar.
3. Transferir 1 mL del tubo 1 al tubo 2 y homogeneizar.
4. Transferir 1 mL del tubo 2 al tubo 3 y homogeneizar.
5. Repetir esta acción hasta llegar al tubo 11.
6. Tomar 1 mL del tubo 11 y desecharlo en un recipiente con desinfectante.
7. Adicionar a los 11 tubos 10 μ L de solución bacteriana ajustada al 0.5 del estándar de McFarland y homogeneizar.
8. Realizar un control positivo de crecimiento en el tubo 12 que igualmente contiene 1 mL de caldo MH, este tubo llevará los 10 μ L de bacteria ajustada al 0.5 pero sin antibiótico.
9. Incubar los 12 tubos a 37°C por 18-24 h.
10. Observar el crecimiento presente como turbidez e identificar el tubo que presenta la concentración mínima inhibitoria, que es el último tubo que no presenta turbidez, para realizar la evaluación de los efectos bacteriostático y bactericida.

Evaluación de los efectos bacteriostático y bactericida

1. Marcar en 4 cuadrantes una placa de agar AST.
2. Sembrar por estría sencilla en cada cuadrante los siguientes tubos:
 - a. Tubo de la CMI.
 - b. Los tubos anterior y posterior a la CMI.
 - c. Tubo de control positivo de crecimiento.

3. Incubar a 37°C por 24 h.
4. Observar y registrar resultados.

Estandarización de la solución bacteriana y sembrado masivo

1. Tomar un inóculo de una colonia aislada y transferir a un tubo con 5 mL de caldo nutritivo, e igualar al estándar de turbidez de McFarland 0.5
2. Introducir un hisopo de algodón estéril hasta que se sature de la solución.
3. Eliminar el exceso de solución presionando el hisopo suavemente sobre las paredes del tubo.
4. Con el hisopo, inocular masivamente 2 cajas de agar Müller Hinton, cubriendo toda la superficie.
5. Dejar secar la superficie con la tapa de la caja puesta para su uso posterior en las pruebas de difusión en agar (método de Kirby-Bauer y E-test).

Método de Kirby-Bauer (Difusión en agar)

1. Esterilizar pinzas de acero, haciéndolas pasar por etanol y calentándolas en la flama del mechero hasta que se evapore.
2. Utilizando las pinzas esterilizadas colocar los discos impregnados con los antibióticos a probar, espaciándolos lo más posible entre sí y también de la orilla de la caja de agar Mueller-Hinton.
3. Presionar los discos ligeramente con las pinzas, para que tengan un buen contacto con el agar.
4. Incubar la caja en posición invertida a 37°C por 16-24h.
5. Medir el diámetro (en mm) de los halos de inhibición usando una regla, sobre la mitad inferior de la caja.
6. Reportar los resultados de cada antibiótico como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de acuerdo a los diámetros medidos, comparándolas con tablas del fabricante o del instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI). Ver tabla 9.1



Figura 9. 1 Método de Kirby-Bauer

E-test

Este método combina la difusión en agar y la dilución para determinar la CMI. Las tiras contienen un gradiente de concentraciones del antimicrobiano.

1. Usando las pinzas metálicas estériles, colocar la tira de E-test en un solo movimiento (una vez que tocó el agar, no volver a moverla), Colocando el extremo de la tira que tiene mayor concentración en la orilla de la caja.
2. Incubar la caja en posición invertida a 37°C por 24h.
3. Reportar los resultados de cada antibiótico como sensible o resistente de acuerdo a los diámetros medidos, ver tabla 9.1.

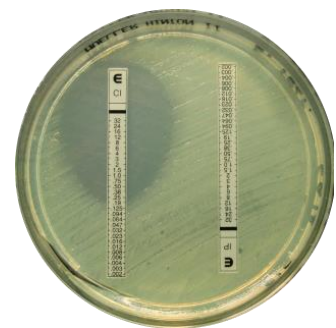


Figura 9. 2 Prueba de E-Test

Interpretación de resultados

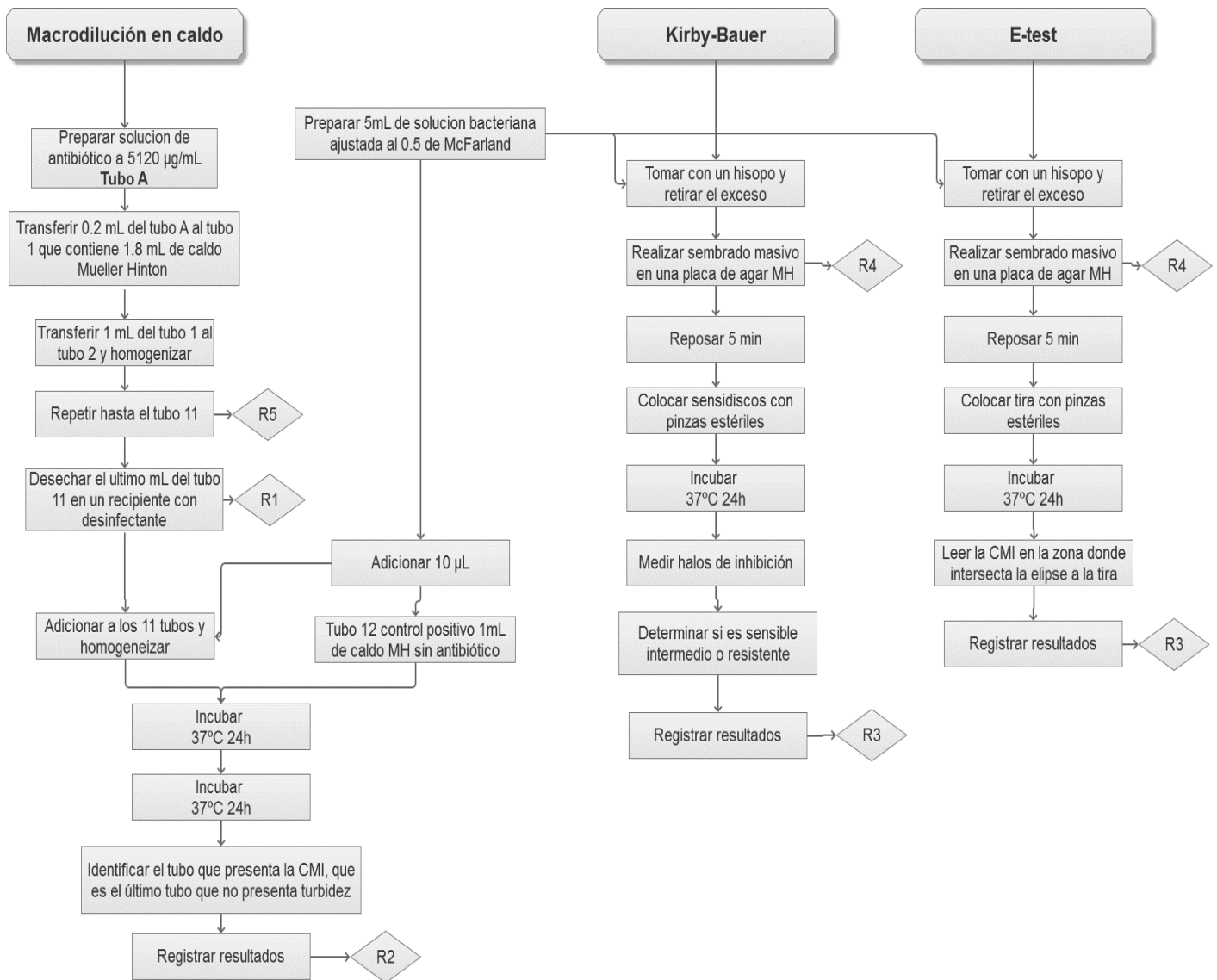
- La CMI se encuentra en el punto en donde la elipse intersecta a la escala.
- Leer la CMI en la zona en donde completa inhibición de crecimiento.
- Si un valor de la CMI se encuentra entre dos diluciones, redondear al valor más alto.
- Si la intersección difiere en cada lado de la tira, reportar la MIC como el valor más grande.

Tabla 9. 1. Interpretación de los diámetros de halos de inhibición

Antibiótico	Contenido en disco (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina				
Enterobacteriaceae	10	≤13	14-16	≥17
<i>Staphylococcus</i> spp.	10	≤28	-----	29≥
Gentamicina				
Enterobacteriaceae	10	≤12	13-14	≥15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	≤12	13-14	≥15
<i>Staphylococcus</i> spp.	10	≤12	13-14	≥15
Oxacilina				
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	≤10	11-12	≥13

Modificado de Mahon, 2015. A partir de la publicación del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): M100-22: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 22da ed.

Diagramas de flujo



Disposición de residuos

- R1: Caldo MH sobrante, desechar en recipiente con desinfectante
- R2: Tubos contaminados, inactivar en autoclave
- R3: Cajas Petri contaminadas, inactivar en autoclave y desechar
- R4: Hisopos de algodón contaminados, colocar en un recipiente con desinfectante y desechar
- R5: Puntas de pipetas contaminadas, colocar en un recipiente con desinfectante y desechar.

Resultados

Concentración de antibiótico en cada tubo

Antibiótico utilizado: _____

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración											

Crecimiento en cada tubo (turbidez)

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Factor de dilución											
Presencia de turbidez											

MIC calculada: _____

Evaluación de los efectos bacteriostático y bactericida

Reportar crecimiento bacteriano en la placa como: +, ++, +++

Moderado + 1-30 colonias

Abundante ++ 30-300 colonias

Muy abundante +++ Mas de 300 colonias

Tubo	Crecimiento	Observaciones
Anterior a CMI		
CMI		
Posterior a CMI		
Control positivo		

**Difusión en agar
Kirby-Bauer**

Microorganismo evaluado: _____

Antibiótico	Concentración	Diámetro del Halo	Interpretación (S), (I), (R)	Observaciones

E-test

Microorganismo evaluado: _____

Antibiótico	CMI

Referencias

1. Forbes, B. (2009). Bailey y Scott; Diagnóstico microbiológico. 12a edición. Buenos Aires: Médica Panamericana.
2. Mahon, C., Lehman, D., Manuselis, G. (2014) Textbook of Diagnostic Microbiology. 5a ed. Saunders

Hongos

La rama de la microbiología que se encarga del estudio de los hongos (levaduras y mohos) se llama micología. Los hongos verdaderos se separan en las siguientes cuatro clases, basadas en sus modos de reproducción sexual:

Ficomicetos: se encuentran en el agua y la tierra, son mohos. Sus esporas reproductivas son externas y sin cubierta.

Ascomicetos: son levaduras y mohos, sus esporas sexuales se llaman ascosporas y son producidas en una estructura en forma de saco llamada asca.

Basidiomicetos: También se conocen como macromicetos. Las esporas reproductivas se llaman basidiosporas.

Deuteromicetos: también se llaman hongos imperfectos porque no se ha observado que tengan una fase sexual reproductiva.

Nutricionalmente los hongos son organismos eucarióticos heterótrofos, y son capaces de metabolizar enzimáticamente una gran variedad de sustratos orgánicos. Los hongos pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales en los humanos.

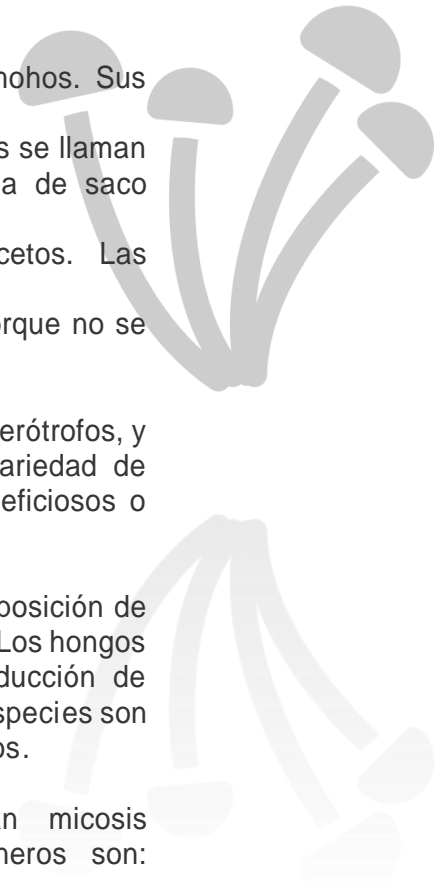
Los que habitan en el suelo tienen un rol vital en la descomposición de tejidos animales y vegetales, manteniendo un ambiente fértil. Los hongos fermentativos tienen una importancia industrial en la producción de cerveza y vino, enzimas industriales y antibióticos. Algunas especies son capaces de producir toxinas como la aflatoxina y alucinógenos.

Los dermatofitos son hongos patógenos que causan micosis superficiales en la piel, cabello y uñas, los tres géneros son: *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton*.

Morfología y cultivo de los hongos filamentosos (mohos)

La observación a simple vista muestra que estos organismos se componen de una red ramificada llamada micelio. Los filamentos que la forman se llaman hifas y la mayoría de ellos crece sobre o por debajo de la superficie del medio nutritivo y se llama micelio vegetativo. El micelio que se eleva de la superficie se denomina micelio aéreo. Aquí se producen hifas especializadas que pueden originar esporas reproductivas.

Debido a que los componentes estructurales de los mohos son muy delicados se requiere de técnicas especiales para estudiarlos ya que la simple manipulación con el asa de inoculación puede resultar en la disrupción mecánica de sus componentes, por lo que se utiliza una



técnica llamada microcultivo, en donde las esporas de los mohos se depositan en la superficie de un medio sólido adecuado, como el agar Sabouraud y se coloca un portaobjetos encima, para permitir la observación de las estructuras microscópicas sin alteración o rompimiento de las mismas.

Morfología de las levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares de entre 5 a 10 veces más grandes que las bacterias. Morfológicamente pueden ser elipsoidales, esféricas y en algunos casos cilíndricas. La mayoría se reproduce de forma asexual por un proceso que se llama gemación, donde la gema que crece de la célula madre se separa y produce una célula hija. Algunas levaduras también pueden llevar a cabo una reproducción sexual cuando dos ascosporas se conjugan y dan lugar a un cigoto o célula diploide.

Candida albicans

Es un patógeno oportunista dimórfico, involucrado en una amplia gama de infecciones, desde candidiasis mucocutánea transitoria hasta candidiasis invasiva potencialmente mortal en pacientes inmunocomprometidos. El diagnóstico de candidiasis invasiva suele requerir un alto índice de sospecha y es difícil porque la infección carece de signos o síntomas. En estos casos la serología podría ser de ayuda en el diagnóstico de candidiasis siempre que se identifiquen marcadores específicos que distinguen entre infecciones superficiales e invasoras. (Bonifaz, 2015).

Prueba del tubo germinativo

Sirve para diferenciar a *Candida albicans* de otras especies. Cuando *Candida albicans* se expone en suero de sangre humana o de oveja a 37°C por 3 h, forma tubos germinativos que se pueden detectar en un montaje un fresco con KOH y se observa como un crecimiento filamentosos que se extiende desde las células de levaduras. Esta prueba es positiva para *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

Objetivo	Conocer la estructura macroscópica y microscópica de las levaduras y mohos, utilizando técnicas de cultivo básico y procedimientos de tinción como base para la identificación de un organismo fúngico.
-----------------	---

Materiales

- Cultivos de levaduras y hongos filamentosos
- 2 Sistemas para microcultivo completos
- Solución de azul de algodón lactofenol
- Cinta adhesiva transparente marca Scotch
- Muestras de mohos de alimentos o superficies
- Suero de sangre humana o suero fetal bovino

Tubo con 8 mL de glicerol al 10%
Asa de inoculación en “L” y cerrada
Portaobjetos y cubreobjetos
Microscopio óptico y estereoscópico
Papel filtro, Bisturí

Procedimiento

Microcultivo para hongos filamentosos

1. Colocar en el fondo de la caja Petri un círculo de papel filtro y encima de éste la varilla de vidrio.
2. Colocar un cubreobjetos y un portaobjetos sobre la varilla, cerrar la caja y esterilizar en el horno Pasteur.
3. Esterilizar un bisturí con alcohol y calentarlo al mechero hasta que se evapore totalmente el alcohol.
4. Trabajando frente al mechero, recortar con el bisturí un cubo de agar dextrosa papa o agar Saboraud de aproximadamente 1.5 centímetros por lado y colocarlo sobre el portaobjetos del microcultivo.
5. Utilizando el asa en L, tomar una porción pequeña del micelio aéreo.
6. Inocular insertando el asa en el centro de una cara lateral del agar. Repetir para las tres caras laterales restantes del cubo de agar.
7. Utilizando pinzas, colocar el cubreobjetos en la superficie del cubo y presionarlo ligeramente para tener un buen contacto con el agar.
8. Añadir 5 mL de glicerol al 10% en la base de la caja Petri hasta saturar el papel, teniendo cuidado de no mojar el agar.
9. Rotular la tapa de la caja del microcultivo y tapar el microcultivo.
10. Incubar a temperatura ambiente de 3 a 7 días.



QR 3 Sistema de microcultivo

Observación del crecimiento en el cubreobjetos

1. Una vez completada la incubación para la maduración del cultivo, agregar de 1 a 3 mL de formaldehído al 10% por 30 minutos, antes de manipularlo para inactivar las esporas.
2. Retirar con mucho cuidado el cubreobjetos y colocarlo en un portaobjetos que contiene 1 o 2 gotas de azul de algodón lactofenol.
3. Observar a 40X.

Observación del crecimiento en el portaobjetos

1. Remover el cubo de agar y colocarlo en un recipiente con desinfectante.
2. Añadir 1 o 2 gotas de azul de algodón lactofenol al portaobjetos y colocar un cubreobjetos.
3. Observar a 40X.

Tinción de azul de algodón lactofenol para mohos, usando la técnica de cinta adhesiva

1. Colocar una gota del azul de algodón lactofenol en el centro de un portaobjetos rotulado.
2. Recortar una tira de cinta adhesiva transparente no mayor al tamaño de portaobjetos.
3. Trabajando frente al mechero, abrir la tapa del cultivo del moho y tocar con la cinta una pequeña porción del micelio para que se adhiera.
4. Pegar la cinta en el portaobjetos.
5. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación.
6. Observar 40X.
7. Identificar las estructuras fúngicas y registrar las observaciones.

Tinción de Gram para levaduras

1. Se realiza la tinción de la misma forma descrita en la práctica 6, aunque no es específica para hongos permite visualizar mejor la estructura celular.
2. Observar a 100X
3. Registrar resultados

Tubo germinativo para *Candida albicans*

1. Colocar 0,5 mL (12 gotas) de suero en un tubo de ensayo.
2. Hacer una ligera suspensión de las colonias de levaduras sospechosas (tocando 1-2 colonias grandes o 3-4 colonias más pequeñas con el asa)
3. Incubar el tubo a 37°C durante 2-3h
4. Colocar una gota de la suspensión en un portaobjetos usando una pipeta Pasteur y cubrir con un cubreobjetos.
5. Examinar el montaje húmedo a 40X para la producción de tubos germinativos (proyecciones largas tubulares que se extienden fuera de las células de levadura).
6. Registrar resultados.

Cultivo de especies de *Candida* en Chromagar

1. Dividir una caja de chromagar candida en secciones del mismo tamaño para sembrar las distintas especies.
2. Sembrar por estriado sencillo y sin tocar los estriados anteriores.
3. Incubar a 37°C por 24h.
4. Observar las diferencias de coloración en cada colonia.
5. Registrar resultados.

Interpretación de resultados

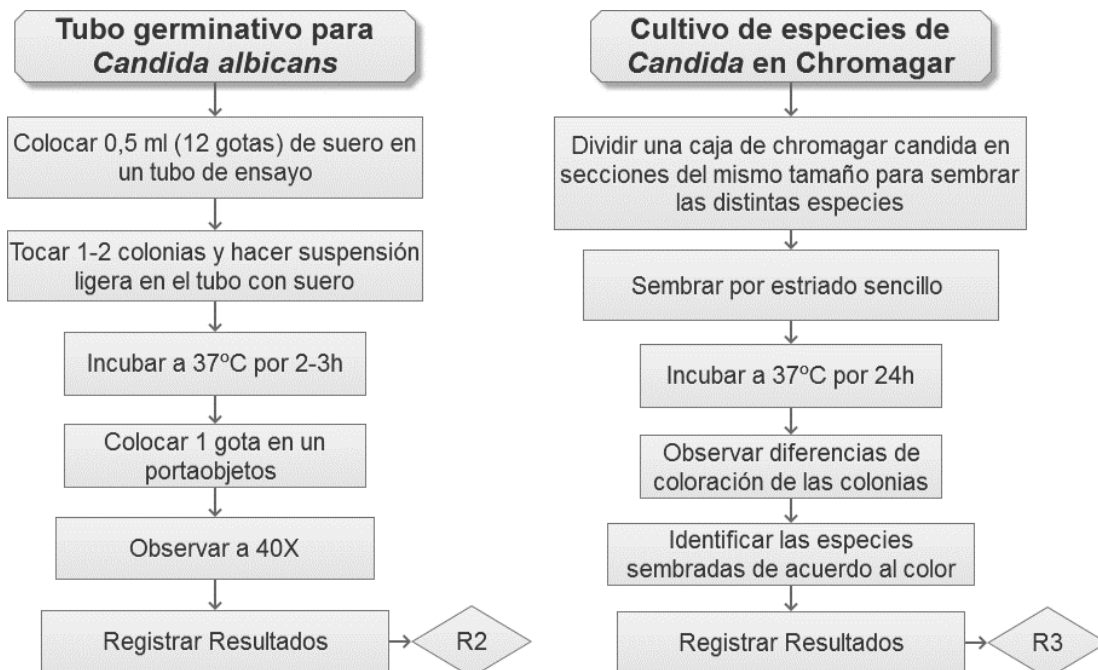
Candida albicans → verde

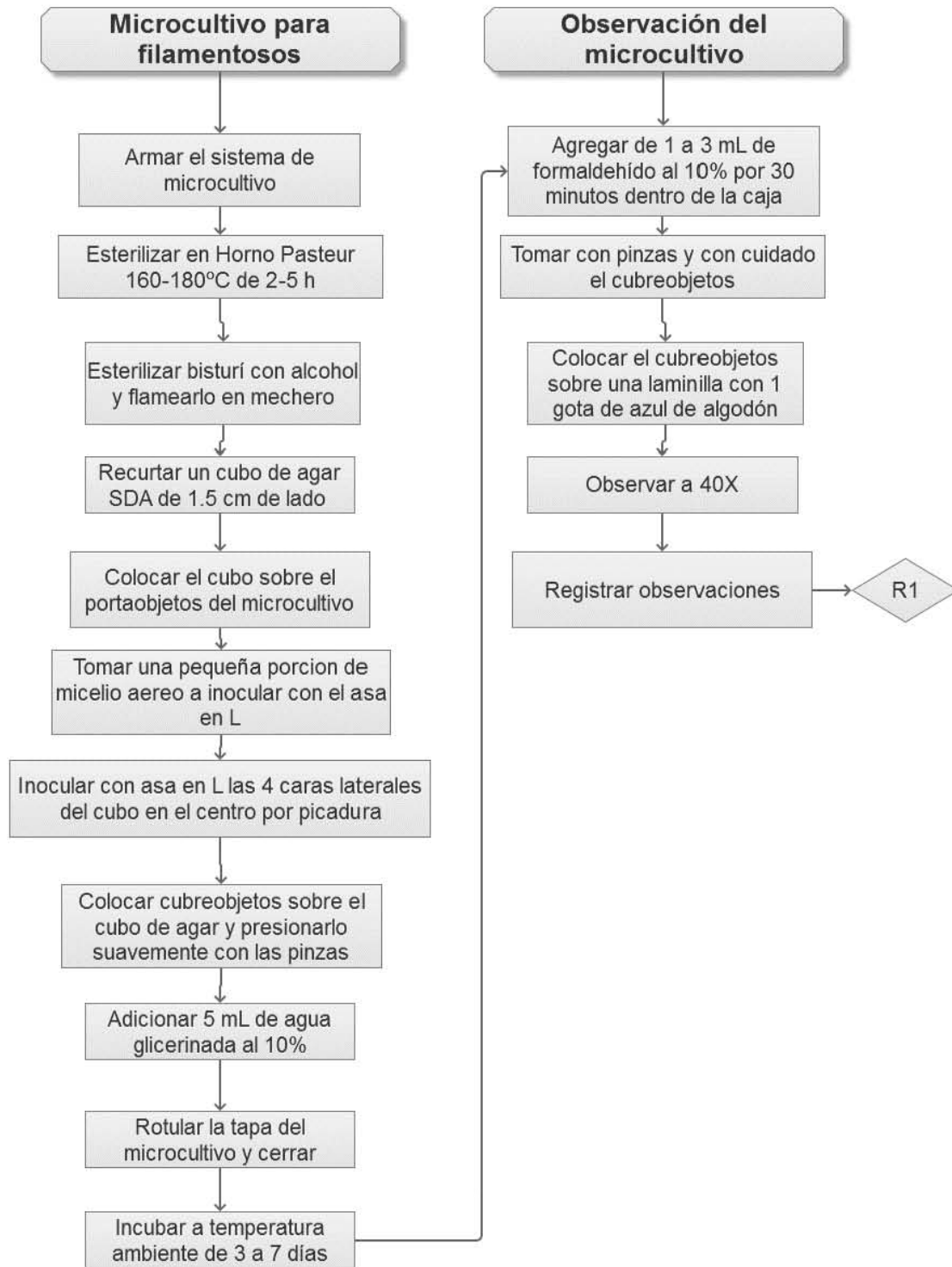
Candida tropicalis → azul metálico

Candida krusei → rosa

Otras especies → blanco a malva

Diagramas de flujo





Disposición de residuos

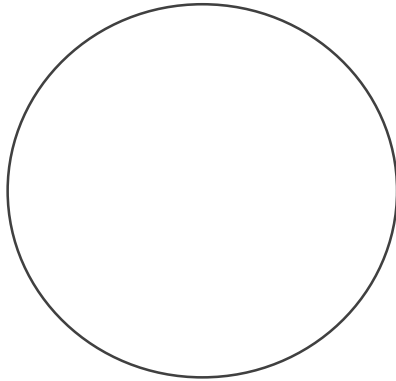
R1: Sistema de microcultivo: inactivar en autoclave, lavar.

R2: Tubos con suero contaminado: inactivar en autoclave

R3: Cajas Petri contaminadas, inactivar en autoclave y desechar

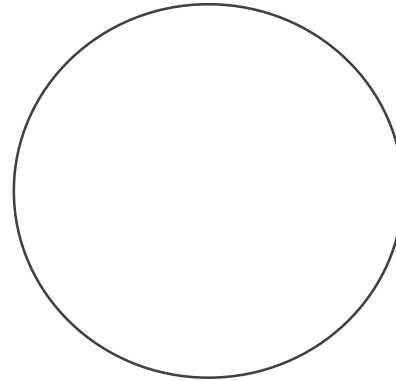
Resultados

Observaciones de levaduras y mohos



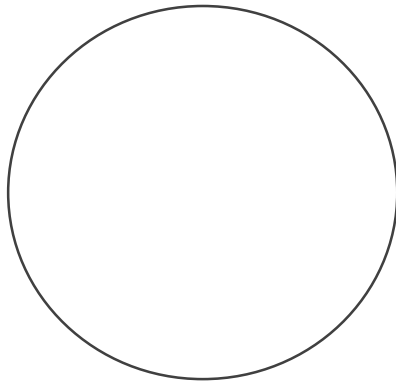
Microcultivo

- Moho:
- Tinción:
- Descripción:



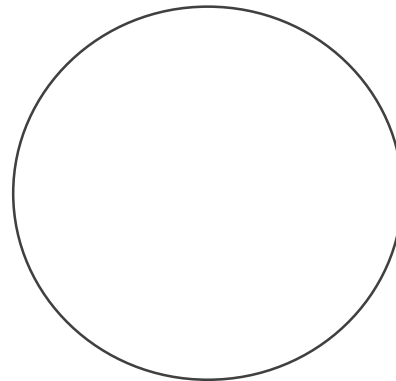
Tinción de Azul de algodón lactofenol

- Hongo:
- Descripción:



Tinción de Gram

- Hongo:
- Tinción:
- Observaciones:



Tubo germinativo

- Hongo:
- Observaciones:

Microcultivo

Observaciones del crecimiento de moho en agar Saboraud

Hongo: _____

Forma y tamaño	
Color en la superficie	
Color en el reverso	
Difusión de pigmento	
Textura: terrosa, yesosa, glabra, granulosa, vellosa, cremosa cérea	
Superficie: elevada o plana, levantamiento central	
Aspecto: plegado, radiado, cerebriforme, crateriforme.	
Consistencia: dura, suave, firme, membranosa	
Tiempo de crecimiento	

Referencias

1. Arenas, Roberto. (2014). *Micología Médica Ilustrada*, 5ta Ed. McGraw-Hill. México.
2. Bikandi, J., San Millán, R., Regúlez, P., Moragues, M. D., Quindós, G., & Pontón, J. (1998). Detection of Antibodies to *Candida albicans* Germ Tubes during Experimental Infections by Different *Candida* Species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(3), 369–374.
3. Bonifaz A. (2015). *Micología Médica Básica*, 5ª. Ed. Mc Graw Hill, México, D.F.
4. López, M. (2006). *Micología Médica (Procedimientos para el Diagnostico de Laboratorio)*, Ed. Trillas, México.
5. Nadeem, S. G., Hakim, S. T., & Kazmi, S. U. (2010). Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings.
6. Peltroche-Llacsahuanga, H., Schmidt, S., Seibold, M., Lütticken, R., & Haase, G. (2000). Differentiation between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by Fatty Acid Methyl Ester Analysis Using Gas-Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3696–3704.
7. Raghunath P, et al. (2014). SST broth, a new serum free germ tube induction medium for identification of *Candida albicans*. *World J Microbiol Biotechnol.*;30(7):1955-8.

Protozoarios

Los protozoarios son un grupo grande y diverso de organismos eucariotas unicelulares. La mayoría son de vida libre, pero algunos son parásitos. Las principales características que los distinguen son:

- Ausencia de una pared celular: aunque algunos poseen una capa flexible por fuera de la membrana celular.
- La habilidad para moverse mediante organelos locomotores.
- Nutrición heterótrofa, donde las formas de vida libre ingieren partículas como bacterias, levaduras y algas mientras que las formas parasíticas pueden obtener nutrimentos de fluidos biológicos de sus hospedadores.
- Formas de reproducción primariamente asexual, aunque algunos formas de reproducción sexual ocurren en algunos grupos.

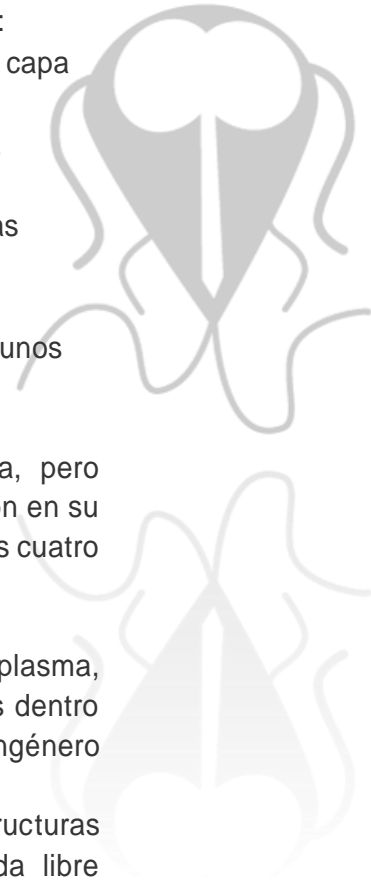
La clasificación taxonómica de los protozoarios es compleja, pero podemos clasificarlos dependiendo de sus medios de locomoción en su estadio adulto, por lo que el phylum se subdivide en las siguientes cuatro clases o subphylum.

Sarcodina: la motilidad es el resultado de la proyección del ectoplasma, a lo que se le denomina pseudopodos. Las amibas prototípicas dentro de este grupo incluye la de vida libre *Amoeba proteus* y su congénero parasítico *Entamoeba histolytica*.

Mastigophora: El movimiento es efectuado por una o más estructuras en forma de látigo llamadas flagelos. Los miembros de vida libre incluyen a los géneros *Cercomonas*, *Heteronema* y *Euglena* y son protistas fotosintéticos que se pueden clasificar como algas flageladas. Las formas parasíticas incluyen a *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* y especies de *Trypanosoma*.

Ciliophora: La locomoción se lleva a cabo por medio de proyecciones cortas en forma de cabellos llamados cilios, que se mueven sincronizados. Un ejemplo característico de vida libre miembro de este grupo es *Paramecium caudatum* y el miembro parasítico es *Balantidium coli*.

Sporozoa: A diferencia de los otros miembros de este phylum no contiene organelos de locomoción en su etapa adulta sin embargo en las formas inmaduras pueden exhibir algún tipo de movimiento. Todos



los miembros de este grupo son parásitos, los miembros más significativos pertenecen al género *Plasmodium*, los parásitos causales de la malaria de animales y humanos.

Los ciclos de vida de los protozoarios parásitos, y los de vida libre son muy complejos, por lo que el conocimiento de la morfología en los distintos estadios de desarrollo es esencial en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones parasitarias.



QR 4 Imágenes microscópicas de protozoarios.

Objetivo	Familiarizarse con las características distintivas de los miembros del phylum Protozoa, realizando observaciones microscópicas de laminillas de protozoarios parásitos
-----------------	--

Materiales

- Laminillas fijas de:
 - *Balantidium coli*
 - *Cryptosporidium parvum*
 - *Entamoeba histolytica* en forma de trofozoito y quiste
 - *Giardia lamblia*
 - *Leishmania* spp.
 - *Plasmodium vivax* en frotis de sangre humana.
 - *Toxoplasma gondii*
 - *Trypanosoma* spp.
- Microscopio óptico
- Aceite de inmersión

Procedimiento

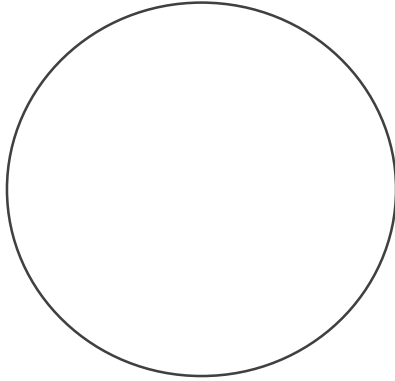
En esta práctica se estudiará a los protozoarios parásitos observando laminillas preparadas y comparándolas con las características morfológicas mostradas en la tabla 10

1. Examinar todas las preparaciones disponibles a 100 , tratando de identificar las características microscópicas que diferencian a cada parásito.
2. Dibujar esquemas representativos de los organismos observados.
3. Identifica las características estructurales que pudiste observar

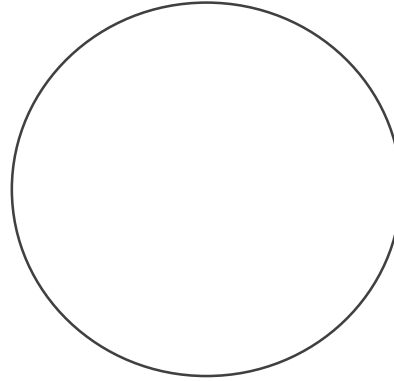
Resultados

Observación de laminillas

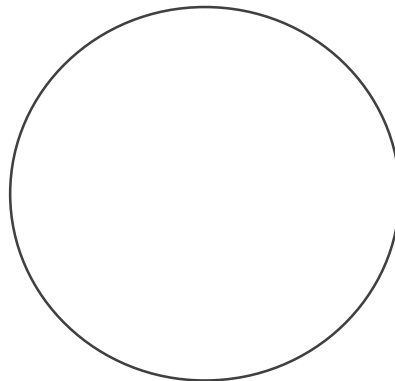
Identificar y dibujar las estructuras morfológicas



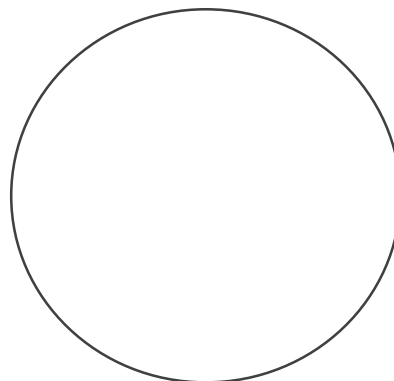
- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:



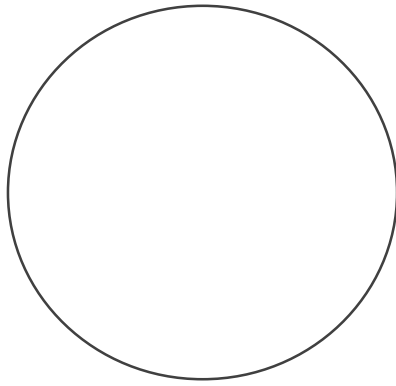
- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:



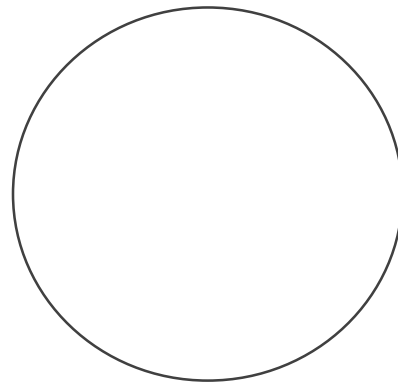
- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:



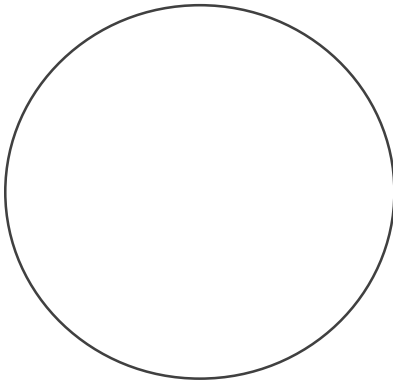
- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:



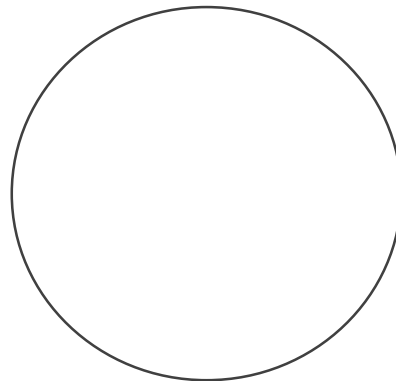
- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:



- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:



- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:



- Protozooario:
- Tinción:
- Aumento:

Referencias

1. Koneman, E., Allen, S. (2008). Koneman. Diagnostico Microbiológico: Texto Y Atlas En Color. 6ª ed. Médica Panamericana.
2. Prats, G. (2013). Microbiología y Parasitología Médicas. Médica Panamericana.

Virus

Los virus solamente pueden reproducirse en células vivas. Algunos de ellos están limitados a un solo hospedador mientras que otros pueden tener afinidad por múltiples hospedadores. En muchos casos no se puede utilizar el hospedador natural para cultivarlos y se debe recurrir a animales de laboratorio como: embriones de pollo, ratones, cobayas, conejos, monos o cultivos de celulares.

Para lograr un cultivo exitoso hay que introducir el virus al lugar donde puede iniciar la infección y reproducirse. Los embriones de pollo son los medios más empleados para el cultivo de virus y también de rickettsias, ya que muchos virus se pueden adaptar al embrión aviar. También este medio es muy económico y adecuado para aislarlos e identificarlos por que están relativamente exentos de contaminaciones externas y no forman anticuerpos contra el virus inyectado.

Los huevos embrionados se pueden inocular por diversas vías y la elección de alguna de ellas depende del virus que va a ser cultivado ya que tienen afinidad por ciertos tejidos. La figura 12.1 muestra las membranas y cavidades que rodean al embrión.

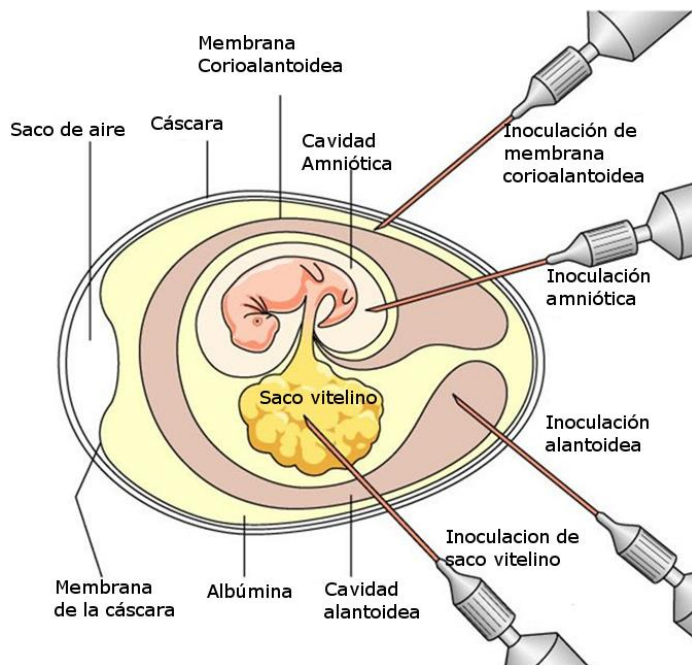


Figura 12. 1 Vías de inoculación de virus en huevos embrionados

Objetivo Practicar las distintas vías de inoculación en huevos embrionados, utilizando un colorante para observar la correcta aplicación del inóculo en la cavidad seleccionada

Materiales

5 Huevos embrionados de pollo de 4 a 12 días	Propipeta con chupón de látex de 2 cm
Ovoscopio	Barniz para uñas oscuro
Bandeja de huevos	Mechero Bunsen
Herramientas para disección	Etanol al 70%
Jeringas de 1 mL o 3 mL con aguja de 12 mm	Colorante (Cristal violeta o safranina)
Agujas de 50 mm	Lancetas estériles
	Vaso de precipitados de 250mL
	8 Cajas Petri de vidrio de 150mm

Procedimiento

Identificación y marcaje de las membranas

1. Colocar el huevo sobre la fuente de luz del Ovoscopio
2. Observar y comparar con la fig. 12.1 para localizar la cámara de aire y el embrión
3. Marcar el cascarón con lápiz delimitando la línea de cámara de aire y con una X al embrión en la parte del cascarón más próxima a éste.
4. Repetir para los 4 huevos y dejar uno como control.
5. Rotular con lápiz la vía de inoculación que se va a realizar en cada huevo.
6. Desinfectar el huevo sumergiéndolo en el vaso de precipitados con etanol por 10 s.
7. Retirarlo del vaso y dejar que se seque completamente.

Notas:

- Las perforaciones se realizan con la lanceta, y deben de ser pequeñas (lo suficiente para que entre la aguja de la jeringa) para que se puedan sellar fácilmente con el barniz.
- Trabajar en la zona de esterilidad proporcionada por el mechero.

Membrana corioalantiodea

Debe producirse artificialmente una cámara de aire.

1. Elegir y marcar una zona del cascarón libre de vasos hemáticos y en la posición contraria al embrión.
2. Perforar el extremo de la cámara de aire.
3. Perforar la zona marcada.
4. Usando el chupón de la propipeta o una pera de goma, aspirar hasta desprender la membrana, produciéndose así una cámara artificial.

5. Inocular dentro de la cámara artificial (sobre la membrana corioalantoidea) con cuidado de no atravesarla.
6. Sellar con barniz de uñas los 2 orificios.

Saco vitelino (yema)

1. Elegir y marcar una zona del cascarón libre de vasos hemáticos y en la posición contraria al embrión.
2. Perforar el extremo de la cámara de aire.
3. Perforar la zona marcada.
4. Inocular con jeringa de 50mm a una profundidad de 3 cm.

Cavidad amniótica

1. Elegir y marcar una zona del cascarón libre de vasos hemáticos y en la posición cercana al embrión.
2. Perforar el extremo de la cámara de aire.
3. Perforar la zona marcada.
4. Inocular con jeringa de 50mm a una profundidad de 3 cm en dirección al embrión.
5. Sellar con barniz de uñas los 2 orificios.

Cavidad alantoidea

1. Elegir una zona a unos 5 mm por arriba de la línea de la cámara de aire, marcar con un lápiz el punto de inoculación de esta zona.
2. Perforar la zona marcada.
3. Introducir la jeringa en ángulo de 45° hacia la cavidad alantoidea 3 cm e inocular.
4. Sellar con barniz de uñas el orificio.

Observación de las membranas

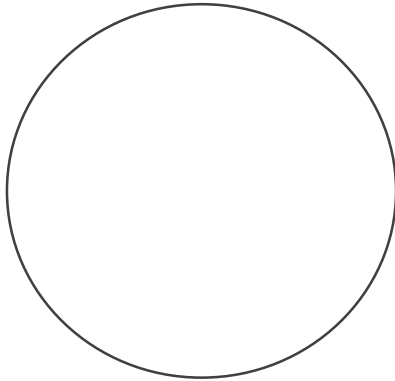
1. Romper el cascarón con ayuda de unas pinzas por la parte superior de la línea que marca la cámara de aire, teniendo cuidado de no romper la membrana
2. Observar a través de la membrana la presencia o no del colorante.
3. Romper la membrana sosteniendo el huevo en posición vertical.
4. Vaciar el contenido del huevo en la caja Petri con cuidado.
5. Verificar que la inoculación haya sido hecha en el lugar correcto.
6. Registrar las observaciones



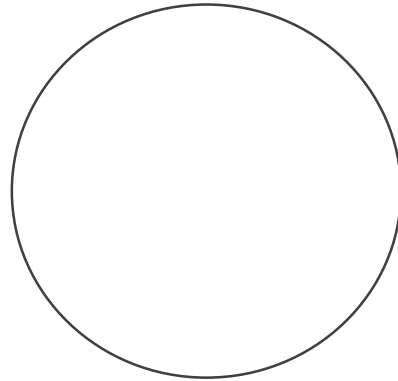
QR 5 Resultados de la inoculación de embriones

Resultados

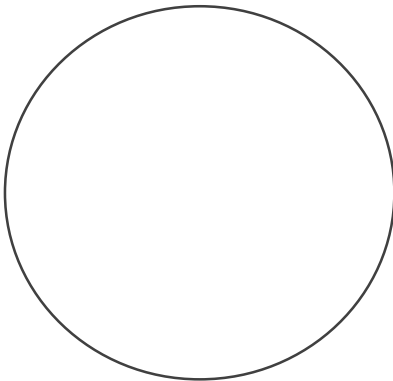
Tinción de las membranas del embrión de pollo



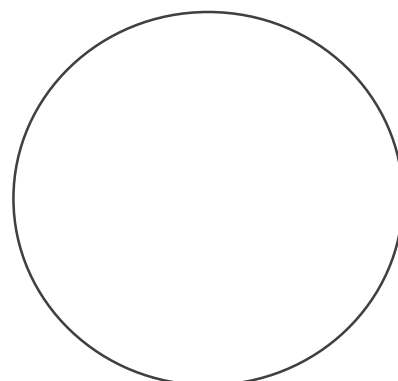
- Vía de inoculación:
- Observaciones:



- Vía de inoculación:
- Observaciones:



- Vía de inoculación:
- Observaciones:



- Vía de inoculación:
- Observaciones:

Parte 2 Aislamiento, cuantificación y amplificación de bacteriófagos T4

Para que el virus sea capaz de infectar la célula hospedadora, la superficie externa del virus debe interactuar con sitios específicos en la superficie de la célula. Estos componentes complementarios se mantienen unidos por enlaces débiles como enlaces de hidrógeno. Para algunos bacteriófagos el sitio del receptor es parte de la pared celular, en otros casos parte de las fimbrias o flagelos. Para los virus que infectan animales, los receptores se encuentran en la membrana plasmática de las células hospedadoras. Los bacteriófagos se pueden cultivar en suspensiones de bacterias en medios líquidos o en cultivos en medios sólidos. Cada virus infecta a una bacteria se multiplica y libera varios miles de virus nuevos, estos virus producidos infectan a las bacterias en la vecindad inmediata. Después de varios ciclos de multiplicación viral todas las bacterias en el área que rodea al virus original son destruidas, por lo que se produce una zona clara que se conoce como placa lítica. Mediante el número de placas que se forman y los factores de dilución que se utilizaron, se puede calcular el número de bacteriófagos presentes en la muestra.

Antes de poder aislar estudiar el virus la cantidad debe de ser amplificada, incubando las muestras de aguas negras, que contienen bacterias que se encuentran en el tracto intestinal humano como *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis*, y se utilizan como fuente de los virus que infectan a estos mismos organismos.



QR 6 Microscopías de fagos T4

Objetivo Realizar la cuantificación de bacteriófagos en muestras de aguas residuales, mediante su aislamiento y amplificación en un medio lisogénico

Materiales

Papel Whatman	Asas bacteriológicas
Matraz Erlenmeyer (250 o 500 mL)	Nefelómetro (McFarland) 0.5
Embudo de vidrio	Baño María
12 Tubos cónicos de 30 o 50 mL (de preferencia con base “self standing”), al menos 7 de ellos estériles.	10 pipetas volumétricas de 1 mL
Centrífuga	11 agares de medio LB (Luria-Bertani) 1.5%
Mechero Bunsen	11 agares “blandos” de medio LB 0.6%
Encendedor o cerillo	Plumón indeleble
10 a 15 Jeringas (10 mL).	3 tubos de caldo nutritivo (BHI, AST, LB)
Filtros 0.22 µm	Navaja estéril
10 tubos con 2.7 mL de solución salina estéril 0.85%	5 Pipetas Pasteur estériles (Opcional)
	Propipetas
	10 tubos Eppendorf estériles de 0.6 o 1.5 mL

Muestras

Aguas negras (100 mL)
Cepa *Escherichia coli* W3350

Procedimiento

Aislamiento de bacteriófagos

1. Tomar una muestra de aguas negras (100 mL aprox.)
2. Filtrar en papel Whatman: Tomar un matraz de 250 o 500 mL, colocar un embudo de vidrio con papel Whatman y vaciar el agua en el filtro. Colectar aproximadamente 50 mL de filtrado
3. Centrifugar el filtrado a 2500 rpm por 10 minutos en tubos cónicos de 30 o 50 mL
4. Tomar el sobrenadante con una jeringa (5 o 10 mL), colocar en condiciones de esterilidad un filtro de 0.22 μm en la jeringa y filtrar sobrenadante en un tubo cónico estéril, donde se tendrán los bacteriófagos aislados

Diluciones de bacteriófagos

1. Ajustar la bacteria *E. coli* W3350 al 0.5 de McFarland.
2. Etiquetar 10 pipetas volumétricas: "E. coli", "1", "2", "3", "4", "5", "6", "7", "8", "9".
3. Rotular del 1-9, 9 tubos con 2.7 mL de solución salina estéril 0.85%
4. Tomar 0.3 mL de la solución con bacteriófagos aislados y colocarlos en el tubo 1 (dilución 10^{-1}).
5. Homogeneizar.
6. Del tubo 1 tomar 0.3 mL y pasarlos al tubo 2.
7. Homogeneizar.
8. Repetir hasta llegar al tubo 9 (dilución 10^{-9}).

Siembra en agar blando LB (Luria-Bertani)

1. Rotular 11 cajas de medio LB: 10^{-1} , 10^{-2} , hasta el 10^{-9} y dos cajas más como control positivo y control de esterilidad.
2. Calentar los tubos con agar blando LB para licuarlos, una vez líquidos colocarlos y mantenerlos en baño María a 42°C.
3. Tomar un tubo del baño María e inmediatamente en condiciones de esterilidad:
 - a. Añadir al tubo con la pipeta "E. coli" 0.2 mL de bacteria estandarizada 0.5
 - b. Añadir al tubo con la pipeta "1" 0.1 mL del tubo 1
 - c. Homogeneizar.
4. Vaciar toda la mezcla en una placa de agar LB, realizando movimientos circulares para homogeneizar esta mezcla en toda la placa y permitir así la interacción entre bacteriófagos y bacterias.
 - Realizar los pasos 1 y 2 con cada una de las diluciones de bacteriófagos, utilizando una pipeta diferente para cada una (pipeta "2" con tubo "2" de dilución 10^{-2} y así sucesivamente).
 - Es importante que se tomen los tubos de medio LB uno por uno, por cada dilución, para mantenerlos a 42 °C el mayor tiempo posible.
5. Realizar dos placas control.
Control positivo de crecimiento:
 - 1) Tomar un agar blando de baño María.
 - 2) Agregar 0.2 mL de bacteria estandarizada.
 - 3) Mezclar y vaciar en placa de agar LB 1.5%.

Control de esterilidad:

1. Tomar un agar blando de baño María.
2. Agregar únicamente 0.1 mL de alguna dilución de bacteriófagos.
3. Mezclar y vaciar en placa de agar LB 1.5%.
6. Dejar solidificar todas las cajas
7. Incubar a 37 °C por 24-48 h
8. *Simultáneamente a este procedimiento sembrar en 3 tubos de caldo nutritivo (BHI, AST, LB) bacteria *E. coli* W3350 no estandarizada e incubar a 37 °C/ 24h, las cuales se ocuparán para la amplificación de bacteriófagos en caso de encontrarlos.
9. Observar resultados: En las placas que tengan la aparición de placas líticas, realizar cuenta y reportar como Unidades Formadoras de Placas líticas en cada mililitro. (UFP/ mL) considerando el factor de dilución.



Figura 12. 2 Formación de placas líticas Control positivo (izq.) y Dilución 10^{-1} (der.)

Ejemplo

En la dilución 10^{-1} se cuentan 35 UFP entonces:

$$\text{UFP/mL} = 35 \text{ UFP} \times 10^1 (\text{factor de dilución}) = 350 \text{ UFP/mL}$$

En la dilución 10^{-6} se cuenta 1 UFP entonces:

$$\text{UFP/mL} = 1 \text{ UFP} \times 10^6 (\text{factor de dilución}) = 1,000,000 \text{ UFP/mL}$$

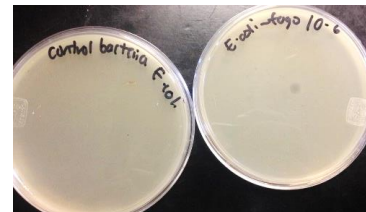


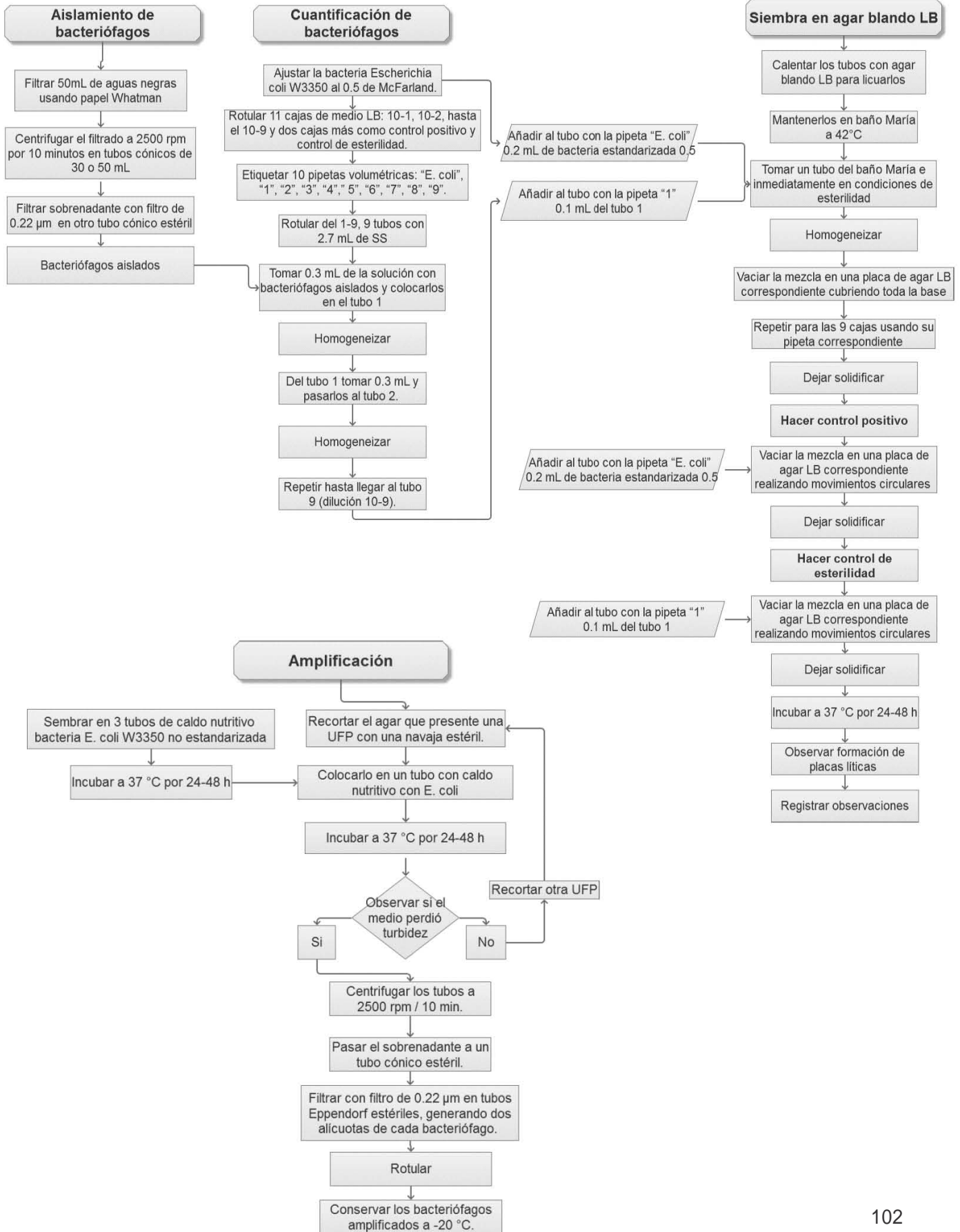
Figura 12. 3 Formación de placas líticas Control positivo (izq.) y Dilución 10^{-6} (der.)

Cada UFP de diferente tamaño representará a una clase de bacteriófagos, seleccionar 3 que se deseen amplificar.

Amplificación

1. Recortar el agar que presente una placa lítica (UFP) con una navaja estéril.
2. Colocarlo en un tubo con caldo nutritivo que contiene *E. coli* W3350, sembrados un día previo.
3. Incubar a 37°C por 24 h
4. Observar si el medio perdió turbidez, lo que comprueba la acción y presencia de los bacteriófagos.
5. Centrifugar los tubos a 2500 rpm / 10 min.
6. Pasar el sobrenadante con pipetas Pasteur estériles o por vaciado en un tubo cónico estéril.
7. Tomar el sobrenadante con una jeringa, colocar filtro de 0.22 μm y filtrar en tubos Eppendorf estériles, generando al menos dos alícuotas de cada bacteriófago.
8. Rotular los tubos Eppendorf
9. Conservar los bacteriófagos amplificados a -20 °C.

Diagramas de flujo



Resultados

Resultados de la amplificación de bacteriófagos

Dilución	Placas Líticas	UFP/mL	Cálculos

Referencias

1. Brauer, R., & Chen, P. (2015). Influenza Virus Propagation in Embryonated Chicken Eggs. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (97), 52421. Advance online publication.
2. Hjelmsø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenka, O., Seidel, M., Schultz, A. C. (2017). Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS ONE*, 12(1), e0170199. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>