



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1



Efectividad: 2008-1

Facultad de Medicina y Psicología

Manual de Laboratorio de Microbiología Médica



Laboratorio 3

Autor(es): QFB María de la Luz Ibarra Arias	Firma:	Fecha: Julio 2007
Revisó: Dr. Héctor Rivera Valenzuela	Firma:	Fecha: Julio 2007
Autorizó: Dra. Sara Cortés Bargalló	Firma:	Fecha: Julio 2007

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	

INDICE

	Pagina
PORTADA	
ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO GENERAL	2
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA	3-4
ORGANIZACIÓN, REGLAMENTOS Y EVALUACIÓN DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA MEDICA.	5-9
MÉTODOS DE DESINFECCIÓN y ESTERILIZACIÓN. MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS	10-15
FORMA, AGRUPACIÓN Y AFINIDAD TINTÓREAS. TINCION DE GRAM.	16-19
CULTIVO DE BACTERIAS.	20-24
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.	25-28
PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIMICROBIANOS.	29-34
IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS	
IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS. GENERO Staphylococcus.	35-38
IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE GENERO Streptococcus.	39-42
IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM NEGATIVOS. GENERO Neisseria.	43-47
BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS Y NO ESPORULADOS.	48-51
IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS.FAMILIA Enterobacteriaceae.	52-55
IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS. GENERO Pseudomonas.	56-59
IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE GENERO Haemophilus.	60-63
DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO DE TUBERCULOSIS. Genero Micobacterium.	64-68

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA

INTRODUCCIÓN

La Microbiología es una ciencia que a través de la observación y la experimentación distingue las formas biológicas microscópicas y que en el caso de la Microbiología medica hace énfasis en los agentes que causan daño al ser humano.

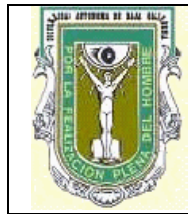
En los nuevos planes de enseñanza universitarios se ha convertido en una asignatura esencial por su relación con la salud. El presente manual tiene el propósito de servir de guía para que el estudiante de Medicina encuentre un enlace entre lo que va aprendiendo en el programa teórico, el laboratorio y en lo que será después el ejercicio de su carrera profesional. Por tal motivo el manual pretende cumplir con un calendario que le marca la teoría permitiendo al mismo tiempo reconocer la importancia que tiene para el clínico un buen laboratorio de Microbiología.

El laboratorio de Microbiología Medica se apoya en los conocimientos aprendidos en otros laboratorios como lo son los Laboratorio de Biología Celular e Inmunología y a la vez sirve como punto de partida para otros laboratorios como es el caso de Laboratorio de Parasitología y Micología Medica principalmente, por ello en este manual solo se refuerzan los primeros ocho módulos correspondientes a Microbiología del programa teórico.

En este manual se encuentran los temas calendarizados que contiene la carta descriptiva de la materia, así como el reglamento que rige el funcionamiento del laboratorio, que antes que nada tiene la consigna fundamental de hacer del laboratorio de Microbiología, no solo una herramienta útil e interesante sino segura para el alumno. Es importante señalar que este laboratorio merece respeto ya que en el se manejan microorganismos cuya peligrosidad hace necesario un manejo cuidadoso y control riguroso.

OBJETIVO:

El objetivo general del Manual de Laboratorio de Microbiología Médica es que sirva como instrumento de trabajo para la realización de las prácticas de laboratorio



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1

PROGRAMA DE ACTIVIDADES DE MICROBIOLOGIA. MEDICA

PRIMERA SEMANA

INTRODUCCION

PRIMER MODULO: PRINCIPIOS GENERALES DE MICROBIOLOGIA

- 1.1 BREVE HISTORIA DE LA MICROBIOLOGIA
- 1.2 BREVE ANALISIS DEL ORIGEN DE LA VIDA Y CONCEPTO VIDA
- 1.3 PRINCIPIOS DE TAXONOMIA

SEGUNDA SEMANA

- 1.4 LA CELULA BACTERIANA

SEGUNDO MODULO:

- 2.1 METABOLISMO BACTERIANO

TERCERA SEMANA DEL 4 AL 8 DE FEBRERO

- 2.2 GENETICA BACTERIANA

TERCER MODULO: CRECIMIENTO BACTERIANO

CUARTA SEMANA DEL 11 AL 15 DE FEBRERO

CUARTO MODULO: TERAPIA ANTIMICROBIANA

QUINTO MODULO: FUNDAMENTOS DE INMUNOLOGIA

QUINTA SEMANA

CONTINUA FUNDAMENTOS DE INMUNOLOGIA

SEXTO MODULO: PATOGENIA DE LAS ENFERMEDADES BACTERIANAS

PRIMER EXAMEN PARCIAL DE MICROBIOLOGIA

SEXTA SEMANA

SEPTIMO MODULO: GRUPOS BACTERIANOS QUE CAUSAN ENFERMEDAD

- 7.1 PANORAMA GENERAL EMERGENTE Y REEMERGENTE

- 7.2 COCOS GRAM POSITIVOS

Staphylococcus spp.
Streptococcus pyogenes

SÉPTIMA SEMANA

Streptococcus pneumoniae

- 7.3 COCOS GRAM NEGATIVOS

Neisseria gonorrhoeae
Neisseria meningitidis

OCTAVA SEMANA

- 7.4 BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS

ANAEROBIOS Clostridios de la gangrena
Clostridium tetani
Clostridium botulinum

NOVENA SEMANA

AEROBIOS : Bacillus anthracis

- 7.5 BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS

Corynebacterium diptheriae
Otros difteroides



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1

DECIMA SEMANA

7.6 BACILOS GRAM NEGATIVOS

ENTEROBACTERIAS: Escherichia coli
Salmonella spp.
Shigella spp.

UNDÉCIMA SEMANA

Otras enterobacterias: Proteus, Klebsiella; etc.

7.7 PSEUDOMONAS Y OTRAS

7.8 VIBRIONES Y OTROS EMPARENTADOS

DUODECIMA SEMANA

7.9 COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS

Hemophylus spp
Brucella spp.
Bordetella pertussis

DECIMOTERCERA SEMANA

7.10 YERSINIAS, PASTEURELAS Y OTRAS EMPARENTADAS

7.11 ANAEROBIOS NO ESPORULADOS

7.12 MYCOBACTERIAS

DECIMOCUARTA SEMANA

Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium leprae

7.13 ESPIROQUETAS

DECIMOQUINTA

7.14 MYCOPLASMAS

7.15 RICKETTSIAS

7.16 CLAMIDIAS

EXAMEN PARCIAL DE BACTERIOLOGÍA

DECIMOSEXTA

OCTAVO MODULO: VIROLOGIA MEDICA

8.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS VIRUS.

8.2 CLASIFICACION DE LOS VIRUS

8.3 PRINCIPALES ENFERMEDADES VIRALES

8.3.1 HEPATITIS

DECIMOSÉPTIMA

8.3.2 VARICELAS Y HERPESVIRUS

8.3.3 SARAMPION RUBEOLA Y OTRAS EXANTEMATICAS

8.3.4 VIROSIS TRANSMITIDAS POR ARTROPODOS

8.3.5 RABIA



DECIMOOCUARTA SEMANA

8.3.6 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

8.3.7 TERAPIA ANTIVIRAL

8.3.8 INMUNIZACION CONTRA LOS VIRUS

8.3.9 PRION

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

ORGANIZACIÓN, REGLAMENTOS Y EVALUACIÓN DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA MEDICA.

PRACTICA No.1

Tema teórico que apoya: Modulo I. Introducción.

Objetivo : Que el alumno conozca la organización del laboratorio, normatividad, obligaciones y mecanismo de evaluación de las practicas de Microbiología Medica.

FUNDAMENTO:

En las actividades del Laboratorio de Microbiología Medica es de primordial importancia la aplicación de la normatividad. Los alumnos deberán cumplir con Reglamento interno de Laboratorio de la Facultad de Medicina Tijuana, el reglamento interno del Laboratorio de Microbiología, los lineamientos del Sistema de Gestión de Calidad de los laboratorios y las medidas de bioseguridad.

Recursos materiales: N/A



Descripción de la actividad:

- Introducción al curso de practicas de Laboratorio de Microbiología medica.
- Integración de equipos
- Lectura de la Normatividad
- Actividades inherentes al Sistema de gestión de calidad.
- Mecanismos de Evaluación.

REGLAMENTO GENERAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA TIJUANA REGLAMENTO DE LOS LABORATORIOS Y QUIRÓFANO

Son los espacios académicos donde se llevan a cabo prácticas de diferentes asignaturas con el objeto de que los alumnos refuercen sus conocimientos. Para los fines de este reglamento, el quirófano será considerado como un laboratorio.

- 1.- El reglamento debe ser leído íntegramente en la primera sesión de trabajo de cualquier curso que requiera uso del laboratorio.
- 2.- Los alumnos NO deben entrar y salir del laboratorio a voluntad. Deben esperar fuera del laboratorio hasta que el maestro o instructor llegue y les indique que pueden entrar.
- 3.- Si los maestros o instructores no se presentan al laboratorio, las prácticas no podrán realizarse. Es responsabilidad de los técnicos administrativos que los alumnos permanezcan fuera del laboratorio hasta la llegada del instructor, así como la de comunicar a la Dirección por escrito la razón de la suspensión de practicas.
- 4.- Los alumnos deben usar bata BLANCA, LARGA, y LIMPIA para entrar a cualquier laboratorio. Deben ponerse la bata ANTES de ingresar.
- 5.- Está prohibido fumar o comer dentro de los laboratorios.
6. Los alumnos deben mantener el orden dentro de los laboratorios.
- 7- Deben presentarse al laboratorio adecuadamente preparados, habiendo consultado previamente en su manual la práctica correspondiente. De no cubrir este requisito no podrán efectuar la práctica.
- 8- El alumno debe leer con detenimiento la técnica a seguir, en caso de existir dudas consultar al profesor ANTES de iniciar la práctica.
- 9- Los alumnos serán asignados el primer día del curso a una mesa de trabajo, para todo el semestre. Ellos serán responsables del material y equipo que se proporcione a esa mesa y de la limpieza de la misma al finalizar la práctica.
- 10.- Al inicio del semestre se dotará a cada subgrupo del equipo y material que utilizará, responsabilizándose de la integridad de los mismos para entregarlo al finalizar el programa de prácticas. El material o equipo que sea destruido o perdido será restituido por los alumnos responsables.
- 11.- El aseo del laboratorio es de primordial importancia, por lo que los alumnos deben de cooperar en el mantenimiento de la limpieza de su mesa de trabajo y el material que así lo requiera. La basura debe colocarse en los recipientes correspondientes. Las sustancias corrosivas o contaminadas se dejarán en depósitos adecuados sobre las mesas. Por ningún motivo deben tirarse residuos o desperdicios a los lavabos.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

- 12.- Los alumnos son responsables de que las llaves de agua y de gas de su mesa queden debidamente cerradas al finalizar cada práctica.
- 13.- Los membretes o etiquetas para marcar el material o instrumentos deben ser humedecidos con agua de la llave, NUNCA CON SALIVA.
- 14.- Los alumnos deben abstenerse de colocar en las mesas de trabajo cualquier material que no sea el requerido para la realización de la práctica (por ejemplo: ropa, bolsas de mano, libros, etc.)
- 15.- En caso de cualquier accidente personal de equipo o material de trabajo debe notificarse inmediatamente al maestro o al instructor.
- 16.- Los maestros y alumnos deben planear su trabajo de manera que la práctica se complete puntualmente y puedan salir del laboratorio 10 minutos antes de la siguiente clase o práctica, previendo el tiempo que utilizarán para recoger, ordenar el material y limpiar su mesa.
- 17.- Por ningún motivo deben permanecer los alumnos en el laboratorio después de la salida del maestro o instructor.
- 18.- Los alumnos deben lavarse las manos con agua y jabón al finalizar cada práctica.
- 19.- Los alumnos que tengan el pelo largo deben mantenerlo recogido para evitar accidentes, sobre todo al trabajar con mecheros.
- 20.- En las prácticas en que se maneje especie canina, los alumnos se encargarán de conseguir los perros directamente del Centro antirrábico y trasladarlos al laboratorio
- 21.- Los alumnos que no aporten el material que les sea solicitado para alguna de las prácticas no podrán entrar al laboratorio.
- 22.- Dadas las características funcionales de cada laboratorio el alumno deberá someterse a las normas especiales, marcadas en cada uno de ellos.

SANCIONES



- 1.- El incumplimiento a estas normas será sancionado por el profesor o el instructor,
2. En la primera ocasión suspendiendo al alumno de la práctica correspondiente a esa sesión, y se le enviará un extrañamiento por escrito, con copia a su expediente y a la Dirección General de Servicios Escolares.
2. En la segunda ocasión se le suspenderá por tres sesiones seguidas y
3. Ante otra reincidencia será suspendido de las prácticas durante todo el semestre.

ORGANIZACIÓN Y NORMAS ESPECIALES DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

El laboratorio de microbiología es un lugar convenientemente habilitado donde con las debidas precauciones se pueden manejar y examinar microorganismos. Cuando manejamos cualquier tipo de muestra se debe tener en cuenta la posibilidad de riesgos que pueden ser biológicos, del ambiente del Laboratorio o riesgos asociados como el manejo sustancias químicas, eléctricos, fugas de gas, entre otros. Todos los microorganismos que se manipulen deben ser manejados con precaución por su potencial patogenicidad.

Al inicio del semestre:

- Cada sub-grupo designada un representante y un suplente los cuales quedaran registrados en la libreta de lo reporte semanal de practicas de laboratorio.
- Los alumnos obtendrán el Manual de prácticas de Microbiología en la página electrónica de la Facultad de Medicina Tijuana en la sección de Manuales.
Un ejemplar básico de Tablas de identificación simplificada será proporcionado al representante del grupo para su posterior reproducción, las cuales serán integradas al manual.
- El alumno se integra a un equipo, asignándosele a cada equipo el área de trabajo y gaveta. Las gavetas deberán conservarse limpias, se recomienda proteger la base con papel aluminio. Al final del semestre se hará entrega de la misma perfectamente limpia.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

➤ El personal auxiliar de laboratorio proporcionará material básico para la realización de sus prácticas. El recibo de materiales debe ser firmado. El material perecedero (No desechable) deberá ser entregado al finalizar el semestre.

➤ El alumno aportara el material que se le solicite. El material requerido es el siguiente.

1. Por equipo de trabajo.

Rollo de papel y Jabón líquido para limpieza de su área y aseo personal.

Un atomizador.

Encendedor.

Rollo de tape.

Cepillo para limpieza de manos.

2. Individual.

Bata de laboratorio

Bolsa de polietileno para transportar la bata.

Plumón de punta fina para vidrio o plástico.

Guantes (solo para realizar tinciones o para el aseo del area)

Cubrebocas. (opcional)

Lentes de seguridad.

Lápiz y colores

Cuaderno para uso exclusivo de Laboratorio.

NORMAS DE SEGURIDAD DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA.

1. Es obligatorio el uso de bata larga destinada exclusivamente para el Laboratorio de Microbiología. NO DEBE USARSE EN OTRAS AREAS DE LA FACULTAD O EN AMBIENTES HOSPITALARIOS.

(Al transportarla fuera del laboratorio envasarla en una bolsa de plástico. En caso necesario se recomienda lavar individualmente con Sol. de Cloro)

1. Al iniciar y finalizar la practica el estudiante lavara sus manos escrupulosamente con agua y jabón.

2. El lugar de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado. Al inicio y al finalizar cada práctica es conveniente desinfectar la superficie de trabajo con solucion desinfectante.

3. Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el Laboratorio. Los microorganismos deben manejarse cerca de la flama del mechero Bunsen.

4. Esta prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos. Cuando se manipulen microorganismos evite hablar innecesariamente o llevarse las manos a la nariz, boca, ojos etc.

5. Esta estrictamente prohibido el uso de teléfonos celulares durante las practicas de Laboratorio

6. Separe y envase correctamente los residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI), depositándolos en los recipientes adecuados. No tirar nada en los lavabos.

7. El material de desecho no contaminado, como papeles de envoltura depositarlos en los recipientes de basura común.

8. Cuando se utilice luz ultravioleta debe tomarse en cuenta que la exposición a esta radiación es peligrosa.



9. En caso de contaminación bacteriología o accidentes en el Laboratorio notificar inmediatamente al instructor o al personal técnico para tomar las medidas higiénicas y de seguridad apropiadas, así como su registro en el diario del laboratorio.

10. Identificar e incubar el material el tiempo que se indique, en caso contrario este será desechado.

11. No almacenar material en el refrigerador, solo se permite con la autorización del personal Auxiliar de laboratorio o el instructor.

12. Esta estrictamente prohibido retirar del Laboratorio cultivos o cepas.

13. Al finalizar la practica entregar el material empleado debidamente separado.



	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

LINEAMIENTOS DEL SISTEMA DE GESTION DE CALIDAD

1. El representante del grupo o el suplente, tendrán la responsabilidad de registrar la práctica realizada en la Bitácora Semanal de prácticas de Laboratorio del Sistema de Gestión de Calidad (SGC) con código: LC-N4-001.
2. Los alumnos y maestros según sea el caso tendrán la obligación de registrar los materiales que aporten o salgan del Laboratorio en el Diario del Laboratorio.
3. Los alumnos realizaran los registros del SGC que apliquen.
4. Los alumnos supervisados por el maestro son responsables de la separación, envase y depósito en el área temporal del Laboratorio de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos de acuerdo al procedimiento interno de manejo de RPBI. LC-N2-006.
5. Los alumnos deben contestar las encuestas de satisfacción de usuario LC-N4-006 cuando se le asigne.
6. Cuando sea necesario presenta Quejas o sugerencias LC-N4-006 en el Buzón de quejas.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

1. No hacer uso de lápiz labial u otros cosméticos en el Laboratorio.
2. Los coágulos de sangre, el suero y el plasma deben ser depositados en recipiente color rojo hermético de RPBI que se encuentra en el área temporal de Residuos Peligrosos Biológico infecciosos.
3. Las agujas deben ser colocadas en el recipiente rígido rojo de RPBI punzocortantes que se encuentra en el área temporal de Residuos Peligrosos Biológico infecciosos.
4. Los algodones, jeringas sin aguja, guantes de látex, papel absorbente contaminado y los aplicadores de madera deben ser depositados en la bolsa roja de RPBI ubicada en área temporal de Residuos Peligrosos Biológico infecciosos.
5. Los alumnos que tengan pelo largo deben mantenerlo recogido para evitar accidentes de trabajo.
6. Las mesas deben limpiarse al final de la práctica con solución clorada o fenol al 5%, el cual estará envasado en un rociador aportado por el equipo. Deberá estar identificado, incluyendo la fecha de caducidad.
7. El uso de guantes de látex para trabajar en el Laboratorio esta indicado solo para realizar coloraciones o para la limpieza del área de trabajo. No deberán usarse cuando se trabaja cerca de la llama del mechero.
8. Deben tener en su mesa de trabajo exclusivamente el material requerido para la realización de la práctica.
9. Al entrar al Laboratorio deberán colocar sus mochilas o útiles en su gabinete correspondiente que se encuentra ubicado en dicha área.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1



10. En caso de cualquier accidente personal o de material de trabajo debe notificarse inmediatamente al maestro o instructor verbalmente y registrar en el diario del Laboratorio.

MECANISMO DE EVALUACIÓN:

1. Es obligatorio un mínimo del 80 % de las prácticas de Laboratorio.
2. El alumno deberá contar con su manual de prácticas de Laboratorio de Microbiología Medica, identificado con nombre y grupo.
3. Deberá leer previamente la práctica. Se aplicara un examen por cada practica.
4. El alumno consignará en su cuaderno de prácticas las imágenes de los diferentes resultados, los criterios que utilizan para la interpretación de las pruebas que realice y las investigaciones que se soliciten.

EVALUACION:

- a) Conducta, actitud y destreza en la práctica.
- b) Calidad de las notas en el manual de prácticas.
- c) Calidad de las investigaciones que se soliciten.
- d) Calificaciones de las evaluaciones.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

INTRODUCCION AL TRABAJO DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

METODOS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN. (2.1)

MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS. (2.2)

Practica No.2. (2.1, 2.2)

Tema teórico que apoya:

Modulo I. Principios generales de Microbiología

2.1 METODOS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN

OBJETIVOS:

Introducir los principios de control de microorganismos incluyendo la definición de términos.

Conocer los principales métodos de desinfección y esterilización para su aplicación en el control de microorganismos en el laboratorio y en la práctica médica.

Fundamento:

El laboratorio de Microbiología es un lugar convenientemente habilitado donde se pueden manejar y examinar microorganismos. Este tipo de trabajo debe ser realizado con técnicas asépticas, por lo tanto requiere un ambiente limpio y ordenado.



Nunca debe olvidarse la necesidad de cumplir con dos requisitos básicos:

- Evitar el riesgo de contaminación de uno mismo o sus compañeros
- Evitar la contaminación de los cultivos en proceso y del medio ambiente del Laboratorio.

Por ello deberá trabajarse en condiciones de esterilidad cerca de la llama del mechero Buncen o en Campana de Flujo Laminar. Aunque los microorganismos que se manipulen no sean considerados patógenos. Los cultivos de todos los microorganismos deben ser manejados con precaución siguiendo las precauciones Universales

CONTROL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO. Por control de los microorganismos se entiende tanto la inhibición del crecimiento microbiano, como la destrucción de aquellos.

1. Esterilización. Proceso en que se destruye todas las formas viables de vida microbiana, incluye la destrucción de esporas y formas vegetativas.
2. Desinfección. Proceso de destrucción o eliminación de microorganismos mediante agentes químicos.
3. Asepsia: ausencia de organismos potencialmente patógenos.
4. Antisepsia. Procedimiento mediante el cual se detiene el crecimiento bacteriano en una superficie viva. El agente usado se denomina antiséptico
5. Microbiostasis: Condición por la que el crecimiento bacteriano esta inhibido. El crecimiento bacteriano puede resurgir. Se aplica a la correspondiente categoría. (bacteriostático, fungistático etc.)
6. Microbicida: Es el agente que destruye las formas viables de los microorganismos (bactericida, fungicida etc.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	

Los agentes químicos pueden ser usados para esterilizar si son microbicidas

METODOS DE ESTERILIZACION:

Esterilización por calor.	Esterilización por filtración	Esterilización por radiaciones
Calor seco	Esterilización por filtración	Particuladas
Calor directo	Porcelana	Alfa
Calor húmedo:	Tierra	Beta
Pasterización	Asbesto	Ondas electromagnéticas
	Membranas de gradocol	Rayos gamma
	Ester de celulosa	Rayos ultravioleta.
	Filtros de vidrio	

AGENTES QUIMICOS (DESINFECTANTES Y ANTISEPTICOS)

Tipos de agentes	Ejemplos
Ácidos y álcalis	H ₂ SO ₄
Metales pesados.(Generalmente tóxicos)	Plata, mercurio, arsénico,
Alcoholes	Fenol,cresol, alcohol etílico etc.
Colorantes	Violeta de genciana.
Agentes Oxidantes.	Cloro, yodo, Fluor, peroxido de hidrogeno, permanganato de potasio.
Agentes reductores	Formaldehído, glutaraldehido
Agentes alquilantes	Oxido de etileno
Agentes humectantes y detergentes	Catiónicos y aniónicos.

MECANISMOS DE ACCION DE LOS PRODUCTOS DESINFECTANTES.



La eficiencia de los desinfectantes varía de acuerdo a su mecanismo de acción, la naturaleza del material sobre el que se emplea así como su concentración. Para medir si un producto es más o menos eficiente se emplea el Índice Fenólico tomando como base el Fenol al 5%.Un buen desinfectante debe tener un Índice fenólico superior a 1.

Los mecanismos de acción de los desinfectantes son:

- Desnaturalización de proteínas.
- Proceso de oxido-reducción.
- Combinación de grupos ácidos con básicos.
- In activación de enzimas
- Modificación de la permeabilidad de la pared celular.
- Interferencia con grupos activos en las proteínas.

Los factores afectan su potencialidad son:

- Concentración del agente.
- Tiempo.
- pH
- temperatura
- Presencia de material extraño.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

RECURSOS MATERIALES:

Recursos materiales por equipo.

Autoclave.

Horno.

Mechero Bunsen

Pisetas.

Asas de inoculación. Redonda y recta.

Hisopos.

Agua destilada estéril.

Sol de PRESEPT (Ac.hipocloroso)

Sol. Fenol 5%.p/v.

1 Agar Nutritivo en caja Petri.



1 Agar Saboraund en caja Petri.

DESCRIPCION DE ACTIVIDADES:

1. El instructor Informara a los alumnos el programa de Laboratorio, bibliografía y requerimientos para la realización de las prácticas,
2. El alumno se integrara a un equipo de trabajo.
3. El auxiliar de laboratorio hara entrega del material basico para el desarrollo de las practicas.
4. El alumno identificara las soluciones desinfectantes que seran utilizadas en el desarrollo de las practicas.
5. Con un hisopo impregnado en agua estéril obtenga una muestra frotando una superficie aproximada de 20 cm² del laboratorio.
6. Inocule la muestra en los medios de cultivo Agar Nutritivo y Agar Saboraund. Identifique las cajas. Coloque ambos medios en la incubadora a una temperatura de 37° C.
7. Desinfecte la superficie de trabajo siguiendo las instrucciones especificas para la desinfección del área.
8. Siguiendo las indicaciones del instructor identifique encienda y regule el mechero Bunsen asignado, para la desinfección de las asas de inoculación.
9. Identifique la campana de seguridad bacteriológica y la forma de uso.
10. Identifique los equipos de esterilización por calor húmedo y seco del Laboratorio.

RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	

MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS.(2.2)

OBJETIVOS:

Que el alumno identifique, maneje, envase y recolecte, los residuos peligrosos biológico infecciosos (R.P.B.I.) en forma adecuada y segura, de acuerdo a la Nom - 087- ECOL-SSA1-2002

FUNDAMENTO:



En las actividades de los Laboratorios de la Facultad de Medicina, es obligatoria la observancia de la normatividad en materia de residuos peligrosos biológico infecciosos.

En la realización de las prácticas de Laboratorio de Microbiología se generan R.P.B.I. por lo que es importante conocer y aplicar las Normas Oficiales Mexicanas en especial la NOM 087-ECOL-SSA1-2002.

Esta norma regula todos los aspectos en el manejo de RPBI, clasifica a los generadores de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI), así como la separación (5 grupos), envasado, manejo y almacenamiento, de acuerdo a las siguientes tablas:

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

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

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

El depósito y envasado de R.P.B.I. se realizará observando que los recipientes solo se llenen hasta las $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad.

Es importante minimizar la generación de R.P.B.I. identificando y segregando los materiales que **NO** los contengan Ej. : Papel de envoltura de gasa estéril, envoltura de la jeringa, protector de las agujas etc.

En el desarrollo de las actividades se deberá separar adecuadamente los tubos que contienen cultivos y cepas, depositándolos en los recipientes destinados para su posterior tratamiento y recuperación (Ej. tubos de ensayo, matraces etc.)

Los cultivos y cepas que se encuentren en cajas Petri deberán ser apilados en conjuntos de máximo 5 placas y asegurados con tape. De esta manera los paquetes se depositan en el área temporal de Laboratorio asegurándose que se manejen en forma adecuada. (La placa más pequeña sobre la tapa más grande)

En el manejo de R.P.B.I. Se deben utilizar los implementos de protección personal para su manejo e identificar los sitios designados dentro del laboratorio para su depósito.

El **área temporal de depósito** se encuentra previamente señalada en el Laboratorio con el símbolo universal que los identifica y todos los recipientes que contienen R.P.B.I., deben ser colocados en estos sitios.

OTRAS ACTIVIDADES ESPECIFICADAS EN LA NOM-087 ECOL 1993. Y QUE SE REALIZAN POR PERSONAL RESPONSABLE DE LA FACULTAD DE MEDICINA.

Recolección y transporte al almacén general.
 Almacenamiento y entrega a empresa tratadora de R.P.B.I.
 Registros y elaboración de bitácoras y reportes.
 Disposición y tratamiento interno y externo.
 Capacitación y monitoreo.

RECURSOS MATERIALES:

Recipientes y bolsas especiales para depósito R.P.B.I.



DESCRIPCION DE ACTIVIDADES.

En coordinación con los integrantes de su equipo:

Elabore una lista de RPBI que haya generado durante las prácticas de Laboratorio en el semestre anterior.

Utilizando como guía las tablas 1, 2.

1. Identifique al grupo de R.P.B.I. al que pertenecen.
2. Identifique el envase adecuado de acuerdo a la tabla No.2.
3. Identifique el área de depósito de los RPBI en el Laboratorio.
4. Dibuje y anote sus resultados.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	



RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

Bibliografía:

ROMERO C. *Microbiología y Parasitología Humana*. 2ª. Ed. México D.F.ed. Medica Panamericana. 1999.Pags.20-26.

Normas Oficiales Mexicanas. Nom- 087-ECOL-SSA1-2002

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

FORMA, AGRUPACIÓN Y AFINIDAD TINTOREA DE LAS BACTERIAS.

TINCIÓN DE GRAM.

Practica No.3

TEMA TEORICO QUE APOYA: Modulo I. 1.4: La célula bacteriana.

OBJETIVOS:

Al finalizar la práctica el alumno Serra capaz de:

- Identificar la forma y agrupación de las bacterias.
- Diferenciar bacterias Gram. Positivas y Gram. Negativas

Fundamento:

Las características morfológicas microscópicas de los gérmenes tienen particular utilidad en su identificación.

La observación de los microorganismos con microscopia óptica es difícil, por lo que se han desarrollado diversos métodos de tinción para detectar gérmenes específicos Ej. Bacterias, micobacterias, hongos, parásitos.

La tinción de Gram fue desarrollada empíricamente por **Christian Joachim Gram** en 1884, a pesar del tiempo transcurrido, la tinción apenas se ha modificado y es uno de los primeros pasos que se realiza para cualquier identificación bacteriana. La técnica es capaz de diferenciar dos grandes grupos de eubacterias: **Gram positivas y Gram Negativas**.

La tinción de Gram. Requiere cuatro soluciones:

1. **Primer colorante** un colorante básico (+) que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. **Solución mordiente**, fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes usados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, Ej. solución diluida de yodo.
3. **Agente decolorante**: es un disolvente orgánico, alcohol acetona (1:1).
4. **Colorante de contraste**. Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, Ej., Safranina.

Los dos grupos bacterianos a los que anteriormente se refiere difieren en el color con el que finalmente se tiñen. Las bacterias **Gram. Positivas** se observarán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias **Gram. Negativas** perderán la coloración inicial en los siguientes pasos y se teñirán del color del colorante de contraste usado. (rosa cuando se aplica Safranina)

La diferencia está determinada por la composición de su envoltura celular. Las bacterias Gram. Positivas poseen una malla de péptido glicano en su parte más externa, mientras que las Gram. Negativas las recubre una fina capa de peptidoglicano y presentan una membrana externa.

Algunos grupos bacterianos requieren para su observación métodos en los que se demuestra la propiedad que tienen de resistir la decoloración con alcohol – ácido. Esta propiedad de algunas micobacterias y actinomicetos se correlaciona con el alto contenido de lípidos de su envoltura celular, que confiere un ambiente hidrófobo.

Las técnicas más utilizadas reciben el nombre de sus autores: **Tinción de Zhiel – Neelsen**. La modificación de **Kinyoun** se basa en el mismo principio.

Otros métodos de tinción comunes son:

1. Los tienen como objetivo identificar estructuras específicas como: **cápsula, flagelos o esporas**.
2. La utilización de reacciones **inmunofluorescentes**, que son sensibles y específicas para la rápida detección e identificación de microorganismos.

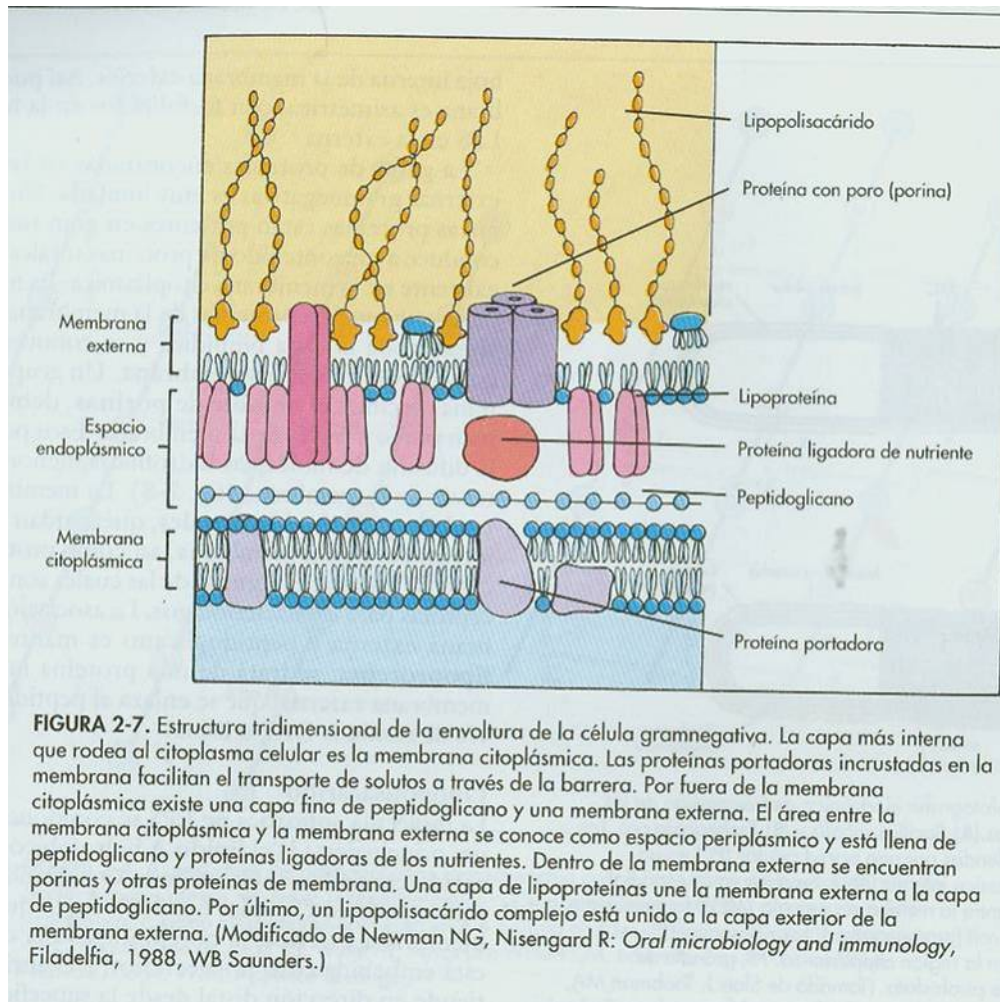


FIGURA 2-7. Estructura tridimensional de la envoltura de la célula gramnegativa. La capa más interna que rodea al citoplasma celular es la membrana citoplásmica. Las proteínas portadoras incrustadas en la membrana facilitan el transporte de solutos a través de la barrera. Por fuera de la membrana citoplásmica existe una capa fina de peptidoglicano y una membrana externa. El área entre la membrana citoplásmica y la membrana externa se conoce como espacio periplásmico y está llena de peptidoglicano y proteínas ligadoras de los nutrientes. Dentro de la membrana externa se encuentran porinas y otras proteínas de membrana. Una capa de lipoproteínas une la membrana externa a la capa de peptidoglicano. Por último, un lipopolisacárido complejo está unido a la capa exterior de la membrana externa. (Modificado de Newman NG, Nisengard R: *Oral microbiology and immunology*, Filadelfia, 1988, WB Saunders.)

Recursos materiales:

Recursos materiales por equipo de trabajo.

Cepas bacterianas:

- Staphylococcus spp.
- Streptococcus spp.
- Cepa de Enterobacterias .

Material biológico: raspado de mucosa bucal.

Reactivos y materiales:

Portaobjetos.



Asas.

Mechero Bunsen.

Charola de tinción.

Set. de colorantes de Gram.

Aceite de inmersión.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Papel y solución especial para limpieza óptica.
Hisopos.

Equipo:

Microscopio óptico.

Otros:

Set de cepas bacterianas y medios de cultivo para instructor.

Descripción



1. Preparar frotis en portaobjetos de cada una de las cepas.
2. Preparar frotis bacterianos en portaobjetos del raspado de la mucosa bucal
3. Fijar cuidadosamente al calor.
4. Cubra las preparaciones y teñir con cristal violeta (1 min.)
5. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
6. Cubra con Lugol (1 min)
7. Lavar con agua el exceso de Lugol)
8. Decolorar con alcohol acetona hasta que la preparación deje de perder color. (15 a 20 seg.)
9. Lavar con agua para eliminar el resto de disolvente.
10. Teñir con Safranina (1 min)
11. Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.
12. Secar la preparación.
13. Examinar al microscopio, siguiendo las indicaciones del instructor.
14. Realice las anotaciones de sus observaciones en la sección de resultados.

Nota: No olvide limpiar apropiadamente el microscopio.

RESULTADOS:

Dibuje y describa la forma tamaño y reacción a la tinción de Gram de:

Staphylococcus spp.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Streptococcus spp.



Enterobacteria,

Observaciones en la muestra de mucosa bucal.

CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFIA:

MURRAY P.R. ; KOBAYASHI ,G.S.;PFALLER ,M.A.;ROSENTHAL,K.S. : *Microbiología Medica*.2a.ed.harcourt brace.,1997.
 ROMERO C. *Microbiología y Parasitología Humana*.2ª. Ed. México D.F.ed.Medica Panamericana. 1999.240-247.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

CULTIVO DE BACTERIAS.

Practica No: 4

TEMA TEÓRICO QUE APOYA: Modulo II y III. Metabolismo y Crecimiento Bacteriano.

OBJETIVO:

Al finalizar la práctica el alumno conocerá:

- Los términos y conceptos frecuentes en microbiología relacionados con el cultivo de bacterias
- Los procedimientos para el manejo y la inoculación de muestras bacterianas.

FUNDAMENTO:

El estudio sistemático de las bacterias en el laboratorio se basa en las siguientes características:

1. Morfología microscópica.
2. Morfología macroscópica o estudio de colonias bacterianas.
3. Afinidad a colorantes.
4. Reacciones bioquímicas diferenciales.
5. Carácter inmunológico
6. Información genética.

Cultivo de microorganismos:

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme; Por ello la variedad de medios de cultivo, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos.

Un medio de cultivo debe contener en forma asimilable: Nitrógeno y Proteínas (peptonas), lípidos, hidratos de carbono, distintas sales minerales, factores de crecimiento (Ej. vitaminas, sangre, etc.), agua, extractos de carne o levadura agentes solidificantes (agar o gelatina).

Deben ser estériles, isotónicos, poseer propiedades buffer, una viscosidad optima y un potencial oxido reductor determinado.

Las diferencias en la capacidad de empleo de los nutrimentos y las reacciones que con ellos se verifiquen, constituye parte de las bases para la identificación de microorganismos.

Preparación de medios de cultivo:

Los principios generales que rigen la preparación de un medio tanto en forma natural como utilizando medios sintéticos deshidratados, son en general:

- 1) asegurar cantidades adecuadas de sustancias estimulantes del desarrollo, pesando con exactitud los distintos ingredientes.
- 2) adaptar la reacción final del medio de cultivo a un pH óptimo.
- 3) emplear la menor filtración posible.
- 4) emplear el mínimo de calor en la esterilización.

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo al:

- estado físico: líquidos, semisólidos, sólidos.
- según su composición: simples, enriquecidos.

Al uso a que se destinen:

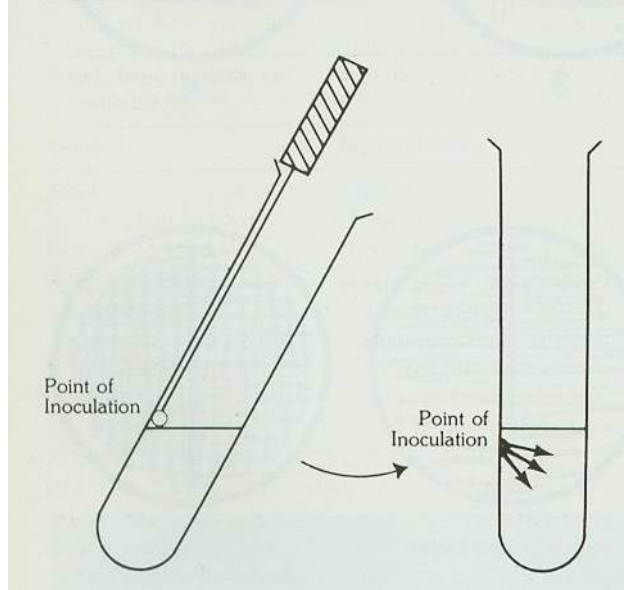
- medios de propagación y enriquecimiento.
- medios diferenciales selectivos.
- medios de diferenciación por pruebas bioquímicas,
- medios de conservación.
- medios para usos especiales.

Métodos básicos de inoculación.



Siembra en medio líquido:

Se siembran introduciendo el asa cargada con el material biológico hasta poco antes de alcanzar el nivel del medio, inclinando el tubo de manera que el medio líquido alcance el contenido del asa, con esta se dan unos golpes ligeros contra la pared del tubo y se sacude suavemente para distribuirlo homogéneamente.



Siembra por picadura o siembra profunda,

Se utilizan tubos que contengan un medio sólido o semisólido, o un medio sólido inclinado. Se introduce el asa recta cargada, casi hasta el fondo del tubo, utilizando una trayectoria recta y teniendo cuidado de que el trayecto de salida sea el mismo.

Un medio de cultivo inclinado puede inocularse por picadura y estría en la superficie, en este caso se efectúa primero la picadura.

Siembra por estrías o siembra superficial:

El estriado sobre las superficies de placa de agar o en medios inclinados es usado especialmente para aislar cultivos puros a partir de especímenes que contienen flora mixta. Las características de homogeneidad de las colonias aisladas permiten la diferenciación de las cepas. Otras propiedades pueden ser observadas por Ej. Hemólisis en medios que contienen sangre.

La siembra por estrías consiste en extender el material por cultivar en líneas paralelas o estriadas cubriendo ampliamente la superficie de forma que las bacterias al ir avanzando se distribuyan y finalmente puedan depositarse células aisladas.

La siembra por estrías en medios inclinados se inicia en el fondo del tubo, al principio de la superficie inclinada.



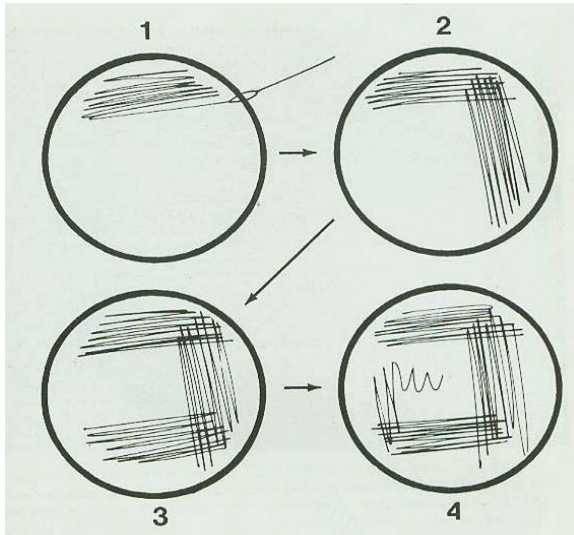
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1



RECURSOS MATERIALES:

Cepas bacterianas por equipo

- 1: Staphylococcus aureus.
- 2: Cepa de Enterobacterias.

Medios de cultivo por cada alumno.

- 1 Medio líquido caldo cerebro corazón.
- 1 Medio semisólido de SIM en tubo
- 1 Medio sólido en tubo inclinado. Citrato de Simmons.
- 1 Medio TSI agar en tubo semi- inclinado
- 1 Medio Agar eosina azul de metileno.(EMB)
- 1 Medio sólido en placa petri. Agar soya Tripticasa. (AST)

Reactivos y materiales :

- Set de colorantes de Gram.
- Portaobjetos.
- Asas redonda y recta.
- Mechero Bunsen.
- Charola de tinción.
- Aceite de inmersión.
- Papel y solución especial para limpieza óptica.



Equipo:

- Microscopio óptico.
- Incubadora.

Otros:

- Set de cepas bacterianas y medios de cultivo para instructor.
- Set de medios de cultivo para ser utilizadas como testigos.

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Procedimiento:

1. Identificar el material proporcionado para la práctica.
2. Preparar frotis bacterianos en portaobjetos de cada una de las cepas.
3. Teñir con técnica de Gram. (Posteriormente observar y correlacionar con los resultados)
4. Siguiendo la demostración del instructor inocule los siguientes medios de cultivo:
5. Medios líquidos.
6. Medio semisólido por picadura.
7. Medio sólido en tubo inclinado por estriación en la superficie.
8. Medio de TSI agar. Picadura fondo y estriación en la superficie.
9. Con la técnica de inoculación por estriación en la superficie de agar inocule el medio AST con la cepa de Staphylococcus aureus y el medio Agar EMB con la cepa de Enterobacterias.
10. Incube los medios inoculados a 37 C en ambiente aerobio.
11. Después de 24 a 48 hrs. de incubación, observe los cambios en los medios de cultivo. (compare siempre con el tubo testigo sin inocular)

RESULTADOS:

Dibuje y describa sus observaciones.

1.- Tinción de Gram:



S.aureus.

Enterobacterias

2.- Resultados : Dibuje y describa los resultados obtenidos en cada uno de los medios, incluyendo los tubos testigo.

Medio liquido caldo cerebro corazón:

Medio semisólido de SIM.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

Medio sólido Citrato de Simmons.

1 Medio Agar soya Trypticasa. (AST)



1 Medio Agar TSI

1 Medio Agar eosina azul de metileno.(EMB)

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA:

Murray P.R... ; Kobayashi ,g.s.;Pfaller ,m.a.;Rosenthal,k.s. : **Microbiologic Medical**. 2a.ed.harcourt brace.,1997.
 Romero c. **Microbiología y Parasitología humana**.2ª. ed. México d.f.ed.medica panamericana. 1999.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA IDENTIFICACION BACTERIANA.

PRACTICA No. 5

TEMA TEÓRICO: Módulos II y III. Metabolismo y crecimiento bacteriano.

OBJETIVO:

Al finalizar la practica que el alumno:

- Realice pruebas de laboratorio para identificar procesos metabólicos bacterianos.
- Correlacione las pruebas con los fundamentos bioquímicos involucrados.

FUNDAMENTO:

Como la mayor parte de los seres vivos, las bacterias son capaces de modificar el ambiente que las rodea, captando sustancias necesarias para su multiplicación y liberando a los medios productos de desecho, enzimas, exotoxinas, etc.

Las interacciones que cada grupo bacteriano establece con el entorno son propias y características, esta especificidad depende del genotipo de la bacteria y se expresa en un determinado equipo enzimático. La caracterización de dichas enzimas es una útil herramienta para la identificación y clasificación bacteriana.

Con este fin existen una enorme variedad de medios de cultivos diseñados no solo para permitir el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos, sino también para inhibir o resaltar determinadas características metabólicas, la aplicación de estas pruebas sirve como base para la identificación bacteriana en microbiología clínica, ambiental y de los alimentos.

A continuación se describen algunos de los fundamentos bioquímicos de las pruebas de laboratorio:

1. Prueba de la catalasa:

La enzima **catalasa** (oxidoreductasa del H₂O₂), se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

Método: Colocar unas gotas del reactivo peróxido de hidrógeno sobre un portaobjeto limpio y añadir una colonia del microorganismo con un palillo de madera. La prueba se interpreta positiva con la aparición de burbujas,

2. Prueba de la Citocromo Oxidasa:

La prueba determina la presencia de enzimas **oxidasa**s presentes en el sistema citocromooxidasa.

Los citocromos son proteínas que forman parte de algunas cadenas transportadoras de electrones propias del metabolismo respiratorio.

Determinar la presencia o ausencia de estas proteínas proporcionará información útil para la clasificación de algunos grupos bacterianos.

La prueba detecta la presencia de Citocromo C y se basa en la capacidad del colorante tetrametil -p - fenilendiamonio de oxidarse al ceder electrones al Citocromo C. Este colorante es incoloro en estado reducido y puede oxidarse rápidamente en presencia de Citocromo C produciendo formas coloreadas.

Método: Colocar un trozo de papel filtro sobre un portaobjeto limpio y añadir sobre él una gota de reactivo de oxidasa. Con un palillo de madera extender una colonia sobre el reactivo, la prueba es positiva cuando se observa coloración azul o violeta en la colonia.



3. Pruebas de fermentación de los hidratos de carbono.

Principio: determinar la capacidad de un organismo de degradar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas.

Los hidratos de carbono que se utilizan en las pruebas pueden ser: monosacáridos, polisacáridos, alcoholes polihídricos o inositoles.

Los polisacáridos primero son catabolizados en monosacáridos menos complejos por enzimas exocelulares (permeasas) de manera que puedan entrar en la célula bacteriana para su degradación.

Las bacterias que fermentan un hidrato de carbono son por lo general anaerobios facultativos.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Los carbohidratos son degradados, los productos finales varían en cada especie bacteriana y depende del sistema enzimático existente y las condiciones del medio ambiente.

La vía más importante de degradación es el ciclo fermentativo de Embden-Meyerhof, aun cuando también puede producirse por la derivación de las pentosas o el ciclo de Entner-Duodoroff o en combinación con ellos.

Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son:

- 1.- Ácido láctico.
2. Ácidos acéticos y formico.
- 3.-Ácido láctico y alcohol etílico.
- 4.- Alcohol etílico.
- 5.-Acetil metil carbinol y CO₂
- 6.- Ácido Succínico a ácido Propionico y CO₂.
- 7.-CO₂ y acetona a alcohol iso propílico.
- 8.- AC. Butírico a alcohol butílico.

Las pruebas utilizan un medio básico con el o los carbohidratos de prueba y un indicador de pH que revela el cambio a medio ácido. (El más utilizado es el rojo fenol que vira a color amarillo en un pH 6.8.)

4. Prueba del Indol.

Esta prueba se emplea para detectar la presencia de la enzima **triptofanasa** en las bacterias. Esta enzima degrada el aminoácido triptofano a indol, que es el compuesto que se detecta en el ensayo.

El medio base contiene proteínas animales especialmente rico en triptofano. La detección del indol se hace al añadir al medio el reactivo de Kovacs

(p-dimetilaminobenzaldehído), la presencia de un color rojo se interpreta como positiva.

5. Citrato de Simmons.

Determina si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad, que se detecta con el cambio de color azul del indicador azul de bromo timol.

RECURSOS MATERIALES:

Recursos materiales por equipo de trabajo.

- 4 Medio Hugh Leifson/ glucosa. (O/F) (2 tubos por prueba)
- 2 Medio SIM.
- 2 Medio TSI. (Triple azúcar hierro agar)
- 2 Lactosa caldo.
- 2 Citrato Simons.
- 4 Medio RM-VP. (2 tubos por prueba)
- Aceite mineral.

REACTIVOS:

- 1) Peroxido de hidrogeno 3%. (catalasa)
- 2) Tetra metil -p- fenilen diamina. (oxidasa)
- 3) Rojo de metilo. (0.1g en 300 ml alcohol etílico)
- 4) Reactivo de Kovacs. (indol)
- 5) Reactivos de Voges Proskauer A y B. (α Naftol, KOH)

CEPAS:

- 1) Escherichia coli. (o Enterobacterias disponibles)
- 2) Pseudomonas spp.



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1

Otros:

Set de medios de cultivo para ser utilizadas como testigos.

DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Comprobar mediante tinción de Gram las muestras de prueba y verificar que no sean un cultivo mixto.
- 2) A partir de las cepas de Escherichia coli (o Enterobacterias) y Pseudomonas sp. inocular la batería de pruebas bioquímicas como a continuación se describe:

Batería de pruebas bioquímicas por cada una de las cepas bacterianas:

- 2 tubos de medio o/f (picadura)
- 1 medio SIM. (picadura)
- 1 tubo medio TSI. (Picadura y estriación)
- 1 tubo lactosa caldo. (Inoculación)
- 1 tubo citrato Simmons. (Estrucción en la superficie)
- 2 tubos medio RM-VP. (Inoculación)

3.- Cubrir con unas gotas de aceite mineral uno de los tubos del medio O/F .

4.- Identifique adecuadamente cada una de las pruebas.

5.-Incubar a 37 C por 24 hrs. en ambiente aerobio.

6.- Realice la prueba de catalasa a cada uno de los microorganismos de prueba.

7.- Realice la prueba de oxidasa a cada uno de los microorganismos de prueba.

RESULTADOS:

- 1.-Dibuje y describa sus resultados.

TINCION DE GRAM:



Microorganismo:	Resultados

Prueba:	Microorganismo	Resultado:
Catalasa	Enterobacterias sp	
	Pseudomonas sp.	
Oxidasa	Enterobacterias sp	
	Pseudomonas sp.	

2.- PRUEBAS BIOQUIMICAS:

Dibuje y describa sus resultados incluyendo en cada medio utilizado:

- Método de inoculación.
- Atmósfera y Temperatura de incubación.



	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

- Observaciones en tubos testigo (medio sin inocular)
- Observaciones en tubos inoculados.
- Interpretación de la prueba.
- Base bioquímica de la prueba

Conclusiones:

BIBLIOGRAFIA:

Koneman ,E.W.;Allen,S.D.;Dowell,V.R.;y Sommers,H.M.:Diagnostico Microbiológico . Panamericana,Buenos Aires,1983.
 Mac Faddin,J.F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clinica.Panamericana. Buenos Aires 2003.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIMICROBIANOS.

METODO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE BAUER-KYRBY.

PRACTICA No.6

TEMA TEÓRICO: Modulo IV. Terapia antimicrobiana.

OBJETIVO:

Al finalizar la practica el alumno:

- Realizara la prueba para determinar la susceptibilidad o resistencia a los antimicrobianos por el método de difusión en agar.
- Conocerá la forma de interpretar la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

FUNDAMENTO:

Desde 1929 en que **Fleming** aisló la **penicilina** a partir de un hongo, *Penicillium notatum*, se han utilizado para la lucha contra las enfermedades bacterianas gran cantidad de agentes antibacterianos, antibióticos o quimioterapicos.

A diferencia de los antibióticos que son sustancias químicas producidas por microorganismos o derivados semisintéticos de estas, los quimioterapicos son productos de síntesis química, pero con la propiedad común de estar dotados de actividad antibacteriana.

Todas las bacterias no tienen la misma sensibilidad a los distintos antibacterianos

Las pruebas mas utilizadas para evaluar la sensibilidad de una bacteria a un antimicrobiano están basadas en el enfrentamiento in vitro de la bacteria con distintas concentraciones del agente.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana in vitro tienen valor para seleccionar los agentes quimioterapicos activos contra el germen causal, esta selección y su efecto en el paciente están influenciados por una variedad de factores interrelacionados entre los que se incluyen propiedades farmacocinéticas del fármaco, su toxicidad y la situación clínica general del enfermo.

Es importante señalar que la prueba debe efectuarse cuando el microorganismo que esta involucrado en un proceso infeccioso presenta un espectro que **no** puede predecirse. También debe practicarse en los pacientes alérgicos a penicilina.

La sensibilidad de una bacteria a un antibiótico determinado viene dada por la **concentración mínima inhibitoria (CMI)**, que se define como la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada. Si se logra alcanzar en el organismo la CMI con dosis terapéuticas, podremos afirmar que la cepa es **sensible** al antibiótico. En caso contrario se define como **resistente**.

Una bacteria es moderadamente sensible cuando la **CMI** de ese antibiótico se alcanza en el organismo con una dosis mas elevada que la dosis terapéutica habitual, sin llegar a ser tóxica, en ocasiones la CMI suele encontrarse en los límites entre sensible y resistente, lo que se llama puntos de corte o concentraciones críticas, en este caso se clasifican como intermedia.

Algunos métodos permiten además determinar la **concentración mínima bactericida (CMB)** que es la menor concentración de antimicrobiano capaz de destruir una cepa bacteriana dada.

Los métodos mas utilizados para determinar la sensibilidad de una bacteria a agentes antimicrobianos son:



- 1.- difusión en agar.
- 2.- métodos de dilución en caldo o agar.

Antibiograma por el método de difusión en agar.

La prueba enfrenta a la bacteria inoculada sobre la superficie de un medio de agar a una solución antibiótica absorbida en discos de papel filtro o en pastillas y su acción se manifiesta por halos de inhibición.

Este método fue estandarizado y los halos de inhibición obtenidos, correlacionados con la **CMI** por Bauer y cols. en 1966, este estudio dio lugar al **método de Bauer Kirby**, recomendado por la Food and Drug Administration (FDA) y el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Este método es adecuado únicamente para bacterias patógenas de crecimiento rápido.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Varios factores afectan el halo de inhibición:

- la carga del antibiótico en el medio de cultivo.
- el tamaño del inóculo bacteriano.
- la composición y grosor del medio de cultivo.
- la velocidad del crecimiento bacteriano.
- la distancia entre cada antibiótico
- tiempo de incubación.

El medio de cultivo más frecuentemente empleado es el de Mueller Hinton que permite el crecimiento de casi todas las bacterias y puede ser suplementado con un 5% de sangre defibrinada de caballo, oveja, conejo, cuando la bacteria lo requiera para su desarrollo.

El pH del medio debe estar entre 7.2 y 7.4 y el grosor del agar 4 a 6 mm.

Los discos de antibióticos son adquiridos comercialmente, deben contener la cantidad de antibiótico establecida, ser conservados a 4 °C y protegidos de la humedad.

El inóculo bacteriano se prepara inoculando caldo Mueller Hinton o caldo soya tripticasa, con la bacteria de prueba, posteriormente se incuba hasta alcanzar una turbidez similar al tubo 1 del nefelómetro de McFarland. (aproximadamente 10 ufc/ml. (paso 2 Descripción de actividades)

La inoculación en el agar Mueller Hinton se realiza con hisopo de algodón estéril. (paso 3, 4, 5 Descripción de actividades)

En la aplicación de los discos con antibióticos debe tomarse en cuenta la distancia entre cada uno de ellos con el fin de que no se superpongan los halos de inhibición. (pasos 6, 7, 8 Descripción de actividades)

Las placas se deben de incubar a 37 °C en atmósfera adecuada, de acuerdo al microorganismo en prueba.

La lectura se realiza entre 18 y 24 hrs., midiendo los halos de inhibición y comparando con los halos de referencia establecidos. (paso 9, 10 Descripción de actividades)

Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos para el diagnóstico, requieren ser realizadas con un control de calidad utilizando cepas de referencia ej:

Staphylococcus aureus. ATCC25923

Escherichia coli. ATCC 25922.

Pseudomonas aeruginosa. ATCC 27853.

RECURSOS MATERIALES.

Cepas:

1 Set de cepas bacterianas por equipo inoculadas 24 hrs antes en tubos con medio de cultivo Mueller Hinton caldo.



Staphylococcus aureus.

Cepa de Enterobacterias sp.

Pseudomonas aeruginosa.

Medios de cultivo. Por equipo.

2 Placas con medio de cultivo Mueller Hinton Agar de 15 cm. de diámetro (4 mm de espesor)

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	

1 Placas con medio de cultivo Mueller Hinton Agar de 10 cm. de diámetro (4 mm de espesor)
Tubos con medio de cultivo Mueller Hinton caldo.
Tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland

Materiales y reactivos:

Sensidiscos para Gram. Positivos y Gram. negativos en base a la tabla de la National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Performans Standards for antimicrobial Disk Suceptibility test.4th, Ed...Documente M2-A6 y M2T4.

3 Hisopos de algodón estériles.

Asas de inoculación.

3 Pinzas.

3 Hojas fondo negro y regla de medicion.

Tincion de Gram.

Plantillas guia.

Equipo.

Microscopio óptico.

Estufa de incubación.

Otros:

Set de cepas bacterianas y medios de cultivo para instructor.



DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES:

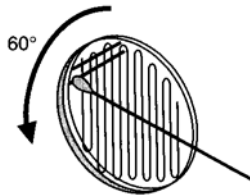
1. Realizar tinción de Gram de la bacteria en prueba.
2. Preparar el inculo hasta que la turbidez sea visible en caldo Mueller Hinton, ajustando la turbidez al estándar 0.5 de McFarland utilizando un fondo oscuro.



Fondo para contrastar cultivos con la constante de McFarland

3. Utilizando un hisopo de algodón, sumergir en el inculo, eliminar el exceso presionando sobre la pared interna del tubo que lo contiene.
4. Inocular la superficie de una placa de agar Mueller Hinton (4 mm de espesor) con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie, por último pasar el hisopo por el reborde de la placa de agar.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

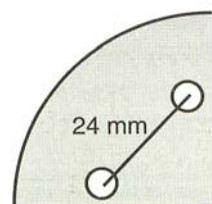


Al inocular, frote el hisopo tres veces sobre toda la superficie de la placa, rotándola 60° cada vez.

- Dejar secar 5 min.

Seleccionar antibióticos de acuerdo a la tabla 1 de la tabla de la National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Performans Standards for antimicrobial Disk Susceptibility test. 4th, Ed.Documente M2-A6 y M2T4.

- Señalar los sitios para colocar los discos de antibióticos (los discos no deben estar a menos de 15 mm de los bordes de la placa y separados 20 mm aproximadamente).



Los discos deben espaciarse cuando menos 24 mm de centro a centro

- Colocar los discos de antibióticos con pinza estéril, apretándolos suavemente sobre la superficie del agar. incubar la placa en posición invertida a 37 c. durante 18 a 24 hrs.
- Medir los diámetros de las zonas de inhibición con una regla o un calibrador utilizando fondo negro.
- Interpretar los resultados traduciéndolos a las categorías:

Resistente (R), intermedio (I), moderadamente sensible (MS), sensible (S).

En base a la tabla de la National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Performans Standards for antimicrobial Disk Susceptibility test. 4th, Ed.Documente M2-A6 y M2T4.

- RESULTADOS: Elabore una tabla de resultados de la prueba de acuerdo al siguiente esquema:

Tincion de Gram:



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1

Preparacion Inoculo:

Inoculacion del medio y aplicación de antibioticos:



TABLA DE RESULTADOS (PARA CADA ANTIBIOTICO UTILIZADO)

Antibiótico, clave de identificación:
Concentración :
Grupo al que pertenece:
Mecanismo de acción.
Diámetro halo inhibición :
Valores de Referencia:
Interpretación :

Antibiótico, clave de identificación:
Concentración :
Grupo al que pertenece:
Mecanismo de acción.
Diámetro halo inhibición :
Valores de Referencia:
Interpretación :

Antibiótico, clave de identificación:
Concentración :
Grupo al que pertenece:
Mecanismo de acción.
Diámetro halo inhibición :
Valores de Referencia:
Interpretación :

Antibiótico, clave de identificación:
Concentración :
Grupo al que pertenece:
Mecanismo de acción.
Diámetro halo inhibición :

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	



Valores de Referencia:
Interpretación :

Antibiótico, clave de identificación:
Concentración :
Grupo al que pertenece:
Mecanismo de acción.
Diámetro halo inhibición :
Valores de Referencia:
Interpretación :

Conclusiones:

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Performans Standards for antimicrobial Disk Susceptibility test. 4th, Ed...Document MZT4.
- 2.- Bauer,A.W.;W.M.M.Kirby;J.C. Sherris &M.Turck,1966.
Antibiotic. Susceptibility testing by a Standardized single disk Method.Am.J.Clin.Pathol.
- 3.- Murray P.R. ; Kobayashi ,G.S.;Pfaller ,M.A.;Rosenthal,K.S. : Microbiologic Medica.2A.ed.Harcourt Brace.,1997

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE COCOS GRAM POSITIVOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS.
 CATEGORÍA MAYOR II. GRUPO 17.GENERO Staphylococcus
 TEMA TEORICO QUE APOYA: COCOS GRAM POSITIVOS.
 PRACTICA No. 7

OBJETIVO: Al finalizar la practica el alumno :

1. Será capaz de identificar en el laboratorio Staphylococcus de importancia clínica.

2. FUNDAMENTO:

El genero **Staphylococcus** son células esféricas de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, no móviles, no esporulados, anaerobios facultativos, catalasa positivos, capaces de crecer en un medio con 10% de cloruro de sodio y a temperaturas de 10 a 40° C.

La temperatura óptima de crecimiento es de 30-37° C.

Son saprofitos de vida libre, pero el hábitat natural de los estafilococos es la superficie de los primates y otros mamíferos. Su presencia como flora endógena en ciertas circunstancias proporciona a muchas especies la oportunidad de causar infecciones.

Staphylococcus es un patógeno humano importante que causa una amplia variedad de enfermedades, desde infecciones cutáneas superficiales hasta enfermedades sistémicas potencialmente letales.

Las especies asociadas más frecuentemente con infecciones humanas son:

S.aureus, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.lugdunensis*, *S.saprophyticus* y *S.schleiferi*.

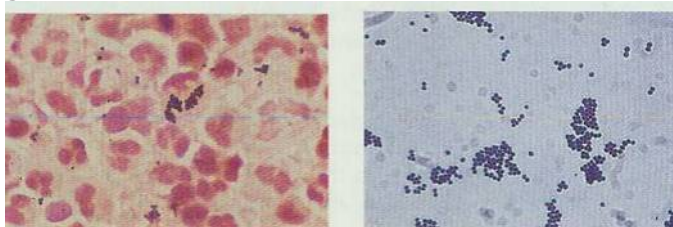
S.aureus es la única especie hallada en humanos que produce la enzima coagulasa; así pues todas las demás especies son conocidas habitualmente como "estafilococos coagulasa negativos".

La estructura de los estafilococos consta de : cápsula, peptidoglicano, proteína A, ácido teicoico, factor de agrupamiento, membrana citoplásmica.

S.aureus produce un gran número de factores de virulencia que incluyen toxinas citolíticas, enterotoxinas y enzimas.

Diagnostico de laboratorio.



Microscopia: a la tinción de Gram. Se observan cocos con paredes Gram Positivos aisladas o en pequeños grupos (racimos de uva)

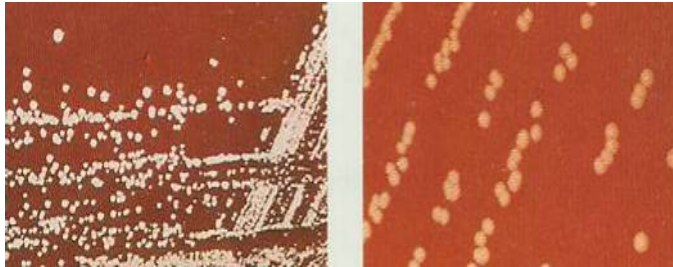


Cultivo: crecen con rapidez en medios de cultivo no selectivos o medios enriquecidos con nutrientes y o suplementados con sangre de oveja.

S.aureus puede ser aislado en medio suplementado con cloruro de sodio al 7.5% y manitol

Al cabo de 24 hrs. en ambiente aerobio o anaerobio se observan grandes colonias lisas. La coloración amarilla causada por carotenoides es común en caso del *S.aureus*. En agar sangre puede observarse hemólisis

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1



Identificación: además de la morfología microscópica y de las colonias se pueden identificar estos microorganismos por las características en pruebas bioquímicas, susceptibilidad a los antibióticos y serología.

Prueba de la coagulasa:

La prueba detecta la coagulasa ligada (factor de agregación) o la coagulasa libre.

Esta prueba se puede realizar siguiendo dos métodos: técnica en portaobjeto y en tubo de ensayo.

Uno de los posibles mecanismos de acción de la coagulasa libre se basa en la reacción de una enzima extracelular bacteriana, la procoagulasa que actúa, con un factor activador presente en el plasma de conejo similar a la protrombina. Esta reacción da lugar a un complejo análogo a la trombina, la coagulasa propiamente dicha, que a su vez reacciona con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina en ausencia de Ca^{++} .

La coagulasa ligada o factor de agregación actúa directamente sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina. No requiere la presencia de activadores plasmáticos.

Realización de la prueba:

1.-En un tubo de ensayo con 0.5 ml de plasma citratado o con EDTA, resuspender una colonia aislada.

2.-Incubar a 37 c por 4 hrs.

Interpretación:

Prueba Negativa: Ausencia de Coágulo en el tubo de prueba.

Prueba Positiva: Se observa la formación de coágulo.

3.-RECURSOS MATERIALES:

Cepas.

Set de 2 cepas de Staphylococcus(identificadas con clave) por equipo.

Materiales y reactivos.

Tinción de Gram.

2 Medio Agar sangre

2 Medio de Nitratos.

2 Medio manitol NaCl. (S110)

2 Medio xilosa

2 Medio sacarosa

2 Medio urea

2 Medio maltosa



2 Medio Trehalosa

2 Discos diferenciales de Novobiocina 5 U.

Peroxido de hidrogeno 3%. (catalasa).

2 Plasma citratado. (Coagulasa)

Reactivo de Nitratos. (α naftil amina / ac. Sulfanilico)

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	

Otros:

Set de cepas bacterianas y medios de cultivo para instructor.
Set de medios de cultivo para ser utilizadas como testigos.

4.-DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

A cada una de las cepas proporcionadas realizar:

1. Tinción de Gram.
2. Prueba de catalasa.
3. Prueba de la coagulasa.
4. Inocular gelosa sangre y aplicar disco de novobiocina sobre el área de la estriación masiva.
5. Inocular los medios de manitol NaCl 7.5% (S 110)
6. Inocular los siguientes medios en tubo:
 - Medio de Nitratos.
 - Medio xilosa
 - Medio sacarosa
 - Medio urea
 - Medio maltosa
 - Medio Trehalosa
7. Incubar en ambiente de CO2 a temperatura de 37 C.
8. Describir la morfología colonial del crecimiento en gelosa sangre y agar manitol salado, así como la susceptibilidad a la Novobiocina.
9. Interprete cada una de las pruebas.
10. Realice las anotaciones de los resultados obtenidos por el equipo.
11. Identifique presuntamente las cepas proporcionadas.
12. Anexe al reporte la referencia bibliográfica que utilizo para la identificación.

5.- RESULTADOS:

Dibuje y describa sus resultados
Tabla simplificada de resultados:

Prueba	Cepa No.1	Cepa No.2
Tinción de Gram		
Resultados en agar sangre: Tipo hemolisis: Pigmento: Novobiocina :		
Resultados en medio S110 Manitol: Crec. En NaCL 7.5%		
Catalasa:		



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1



Coagulasa:		
Medio de Nitratos :		
Medio Xilosa:		
Medio Sacarosa:		
Medio Urea:		
Medio maltosa:		
Medio trehalosa:		
Identificación presuntiva:		

CONCLUSIONES:

7.-BIBLIOGRAFÍA:

1. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J.T., WilliamsS.T. **Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology** .9th.ed.Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994
2. MURRAY P.R.,KOBAYASHI G.S.,PFALLER M.A.,ROSENTHAL K.S.**Microbiología Medica** .Harcourt Brace de España s.a.
3. SIDNEY M.F.,ELLEN J.B.,**Bayley/Scott.Diagnostico Microbiológico**. Panamericana,Buenos Aires.
4. KONEMAN ,E.W.;ALLEN,S.D.;DOWELL,V.R.;Y SOMMERS,H.M.:**Diagnostico Microbiológico** .Panamericana,Buenos Aires, 1983.

MAC FADDIN,JF.**Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia Clinica**.3^a.ed. Panamericana,Buenos Aires.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE COCOS GRAM POSITIVOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS.
CATEGORÍA MAYOR II. GRUPO 17.GENERO Streptococcus.

Practica No.8

TEMA TEORICO QUE APOYA: Modulo 7.2. COCOS GRAM POSITIVOS

OBJETIVO: Al finalizar la practica el alumno:

Será capaz de identificar en el Laboratorio Streptococcus de importancia medica.

FUNDAMENTO:

Los Streptococcus son miembros de la flora normal del ser humano y además agentes etiológicos de varias enfermedades graves, pueden causar secuelas secundarias.

Los miembros del genero Streptococcus abarca una diversidad de especies que tienden a crecer desarrollando cadenas en los medios líquidos, son cocos Gram. Positivos catalasa negativos

Como producto final del metabolismo de los carbohidratos forman grandes cantidades de ácido. Láctico. La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, aunque los requerimientos atmosféricos pueden oscilar desde especies anaerobias estrictas hasta capnofílicas (requieren CO₂) sus requerimientos nutricionales son complejos, es necesario el uso de medios enriquecidos con sangre o suero para su aislamiento.

La diferenciación entre las especies dentro del género es complicada, debido a que se emplean cuatro esquemas distintos para su clasificación

1. presentación clínica (estreptococos piogénicos, orales, entéricos)
2. propiedades serológicas (grupos de Lansfield a-h y k-v)
3. patrones de hemólisis (β completa, α incompleta, γ nula)
4. propiedades bioquímicas (fisiológicas)

Algunos estreptococos poseen **antígeno específico de grupo** (hidratos de C de la pared celular o ácidos teicoicos), que pueden detectarse mediante sondas inmunológicas para la detección rápida de los Streptococcus patógenos más comunes.

No todos los Streptococcus poseen esos antígenos S.pneumoniae y las numerosas especies alfa hemolíticas y no hemolíticas (conocidos en conjunto como grupo viridans) se identifican por sus propiedades fisiológicas.

Identificación presuntiva por el laboratorio.

Microscopia: a la tinción de Gram. Cocos Gram. Positivos asociados en pares o cadenas en medios líquidos.



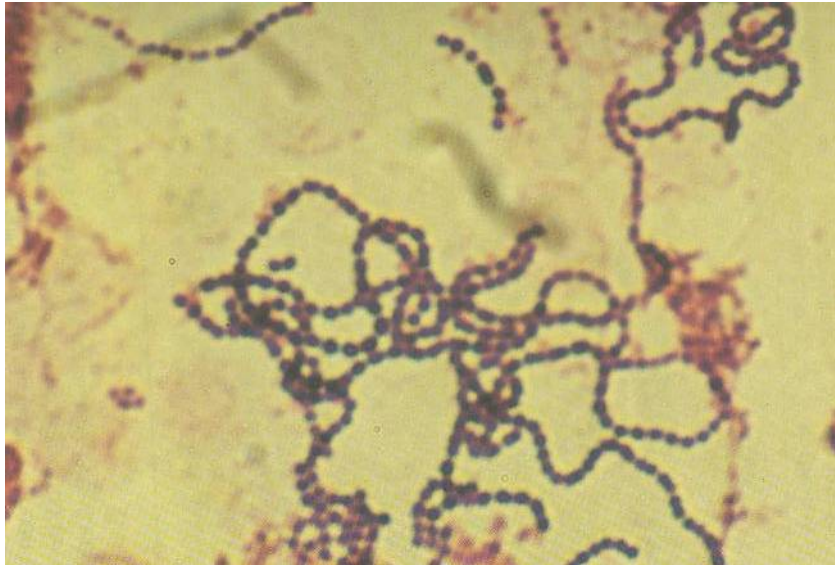
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1



Propiedades bioquímicas (fisiológicas)

Las pruebas utilizadas para la identificación presuntiva más comunes incluyen:

Susceptibilidad a Bacitracina:

Permite diferenciar estreptococos beta hemolíticos del grupo A del resto de los estreptococos beta hemolíticos, que son resistentes, solo un porcentaje muy pequeño de los grupos B, C, G son sensibles a la Bacitracina.

Procedimiento:

Colocar un disco conteniendo Bacitracina (taxo A) en el centro de la zona inoculada masivamente con la bacteria en estudio en agar sangre.

Incubar 18-24 hrs. a 37 c y en ambiente de CO₂.

Susceptibilidad a Optoquina: (etilhidroxicupreina)

Es una prueba que permite diferenciar *S.pneumoniae* que es sensible a la optoquina de otros estreptococos alfa hemolíticos, en especial del grupo viridans, que son resistentes.

Procedimiento:

Colocar un disco conteniendo optoquina (taxo P) en el centro de la zona inoculada masivamente con la bacteria en estudio en agar sangre.

Incubar 18-24 hrs. a 37 c y en ambiente de CO₂.

Prueba de la esculina en medio con bilis:

Principio: determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculina glucosa, en presencia de bilis.

Procedimiento: inocular por estriación en la superficie el medio bilis esculina,



Incubar 18-24 hrs. a 37 C

Interpretación: **Positiva presencia color negro a castaño oscuro.**

Prueba de CAMP:

Principio: Los estreptococos grupo B, producen una proteína termoestable di fusible (factor CAMP) que potencia la hemólisis del *S. aureus*. (Cepa productora de -toxina)

S.aureus produce esfingomielinasa C, que puede unirse a las membranas eritrocitarias. En contacto con Factor CAMP del grupo B, las células experimentan hemólisis.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Procedimiento: En agar sangre de borrego al 5%, inocule con *S. aureus* de un extremo a otro en el centro de la caja. Esterilice el asa y deposite los estreptococos haciendo una línea en ángulo recto sin tocar el *S. aureus*. (A una distancia aproximada de 0.5 cm.)

Incubar 18-24 hrs. a 37 C

Interpretación: Positiva cuando se forme una zona de hemólisis en la zona de difusión de la toxina (forma de punta de flecha)

Las pruebas para detección de **antígenos en muestras directas** son en la actualidad muy importantes ya que proporcionan un diagnostico preciso y rápido.

RECURSOS MATERIALES:

Recursos materiales por equipo de trabajo.

Colorantes para tinción de Gram.

4 Agar sangre borrego al 5%

3 Tubo medio bilis esculina.

3 Discos diferenciales de Bacitracina (taxo A)

3 Discos de optoquina (taxo P)

Peroxido de hidrogeno 3%. (catalasa)

3 Medios Agar soya tripticasa con NaCl 6.5 %.

Cepa de *S.aureus* (Prueba CAMP)

Cepas:

Streptococcus pyogenes.

Streptococcus agalactiae

Enterococcus faecalis

Staphylococcus aureus.

OTROS :

Set de cepas bacterianas y medios de cultivo para instructor.

Set de medios de cultivo para ser utilizadas como testigos.



DESCRIPCIÓN:

A cada una de las cepas proporcionadas realice:

1. Tinción de Gram. .
2. Prueba de catalasa.
3. Inocule agar sangre y aplique discos de Bacitracina en un área de la estriación. Aplique en otra de las áreas inoculadas disco de optoquina.
4. Inocular el medio de bilis esculina.
5. Realizar la prueba de CAMP.
6. Incubar en ambiente de CO₂ a 37 C.
7. Después De la incubación, Interprete cada una de las pruebas (incluyendo el tipo de hemólisis), anote los resultados.
8. Identifique presuntamente las cepas proporcionadas utilizando cuadros de identificación abreviada.

RESULTADOS:



1. Dibuje y describa sus resultados.
2. Identifique presuntamente las cepas proporcionadas utilizando cuadros de identificación abreviada.
3. Investigue la Base bioquímica de las pruebas bioquímicas que realizo.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFÍA:

1. MURRAY P.R.,KOBAYASHI G.S.,PFALLER M.A.,ROSENTHAL K.S.*Microbiología Medica* .Harcourt Brace de España s.a.
2. SIDNEY M.F.,ELLEN J.B.,*Bayley/Scott.Diagnostico Microbiológico*. Ed.Panamericana, Buenos Aires.
3. KONEMAN ,E.W.;ALLEN,S.D.;DOWELL,V.R.;Y SOMMERS,H.M.:*Diagnostico Microbiológico* .Panamericana, Buenos Aires,1983.
4. MAC FADDIN,JF. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clinica*. Panamericana México .1993.
5. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J.T., WilliamsS.T. *Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology* .9th.ed.Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

CATEGORÍA MAYOR I. GRUPO 4. GENERO *Neisseria*.

Practica No. : 9

TEMA TEÓRICO: Modulo 7.3.Cocos Gram negativos.

OBJETIVO:

Al finalizar la practica el alumno:

Conocerá los cocos Gram Negativos de importancia médica.

Será capaz de obtener adecuadamente una muestra de oro faringe e identificar en el laboratorio el género y especie de la cepa problema de la familia Neisseriaceae.

FUNDAMENTO:

La familia Neisseriaceae esta constituida por cocos y bacilos Gram. Negativos aeróbicos microaerofílicos, que se asocian en pares o masas.

El genero *Neisseria* esta compuesto por diplococos Gram. negativos, que se presentan en pares con los lados adyacentes aplanados, con excepción de *N.elongata* (bacilos cortos), crecen como aerobios estrictos y forman parte de la flora normal de la mucosa respiratoria, gastrointestinal y genitourinaria del ser humano.

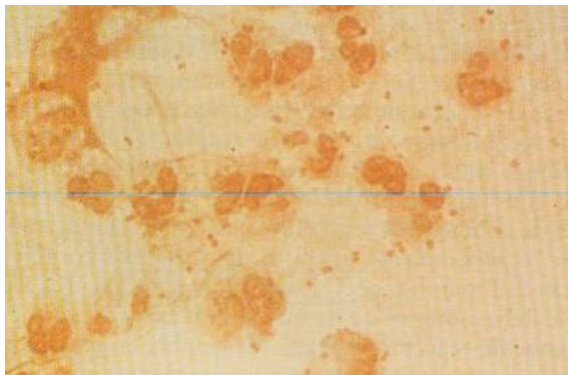
Este grupo incluye dos especies patógenas para el hombre: *N.meningitidis* (meningococo) y *N.gonorrhoeae*(Gonococo)



Algunas especies son cromógenas (*N.flavescens*,*N.subflava*) otras son acromógenas(*N.caviae*,*N.sicca*).

Morfología: *Neisseriae* son cocos Gram. negativos inmóviles, crecen habitualmente en parejas. El tamaño individual de los cocos es pequeño(alrededor 0.8 um).En los preparados de material clínico se observan frecuentemente dentro de neutro filis polimorfonucleares. Los meningococos y gonococos recién aislados de los enfermos poseen pilis. Los meningococos aislados de sangre o líquidos tienen una cápsula de polisacárido.

Son parásitos estrictos del hombre y otros animales, anaerobios facultativos, requieren para su crecimiento de factores X (hemina) termoestable y V (difosfo piridin nucleótidos) termolábil, presente en la sangre. El factor V puede ser aportado por otros microorganismos como los estafilococos por lo que en presencia de estafilococos crece alrededor de este, presentando el fenómeno de satelitismo. Las reacciones de fermentación son variables y no tienen utilidad diferencial.

Las cepas se clasifican en ocho biovariedades (I-VIII) en base a su acción sobre el triptofano, Urea, Ornitina y en seis biovariedades relacionadas con su polisacárido capsular (de la a a la f).



	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Fotografía de impronta de muestra de secreción uretral.

Características generales de desarrollo:

Las especies patógenas necesitan para su desarrollo medios enriquecidos en el primo aislamiento, contienen almidón de maíz, albúmina, suero y líquido de ascitis. (Agar Chocolate, Agar Thayer y Martin, Tioglicolato etc.) Algunas peptonas y agar con impurezas son capaces de inhibir el desarrollo de *N.meningitidis* y *N.gonorrhoeae*. Crecen mejor en presencia de 5 a 10 % de CO₂, a una temperatura óptima de 35 a 37 C. Las *Neisserias* patógenas son excepcionalmente sensibles a las condiciones ambientales desfavorables, son auto lítico y los cultivos pueden morir en pocos días.

Neisseria gonorrhoeae: Es el agente causal de la gonorrea, se transmite casi exclusivamente por contacto sexual o perinatal, afecta predominantemente la membrana mucosa del canal genitourinario. La infección genital ascendente en la mujer conduce a la salpingitis, una de las principales causas de infertilidad. La bacteriemia, la conjuntivitis neonatal y la epididimitis aguda son consecuencia importante de la infección primaria.

Recolección de muestras: Para aislamiento de *N. gonorrhoeae* se toma material de áreas genitales como uretra, cervix, canal anal y otras localizaciones extragenitales como orofaringe, lesiones cutáneas, articulaciones, sangre, secreciones oftálmicas en el neonato.

Para una mejor recuperación se emplean hisopos de algodón no tóxico tratados con Carbón para absorber los ácidos grasos tóxicos) o de alginato de calcio. Preferentemente deberán ser inoculadas en los medios apropiados inmediatamente después de la obtención. Algunas especies son muy sensibles a variaciones de temperatura las muestras que no se inoculan directamente en los medios de cultivo deben ser transportadas y mantenidas a temperatura ambiente en un medio de transporte que evite el sobrecrecimiento de los no patógenos (medio de Amie con carbón).

Ciertas cepas del gonococo requieren el agregado de nutrientes particulares para desarrollar en los medios artificiales. (auxotipos) como arginina, hipoxantina y uracilo (auxotipos AHU).

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR: Luego de 24 a 48 hrs. de incubación *N.gonorrhoeae* forma colonias pequeñas, translúcidas grisáceas, convexas, brillantes con bordes lisos.

Son catalasa y oxidasa positivos. (La prueba puede realizarse directamente sobre las colonias o en papel filtro) colocando unas gotas del reactivo de Kovac (clorhidrato de tetrametil p-fenileno diamina) que tomarán un color púrpura. Cada especie presenta un patrón de fermentación de los azúcares característico.

Neisseria meningitidis: Es un habitante normal de las vías respiratorias superiores de personas sanas o causar enfermedades graves como la meningitis. Otros síndromes asociados con la infección incluye la neumonía, artritis y la uretritis.



Crece en medios selectivos y en gelosa chocolate forma colonias transparentes, no pigmentadas; la atmósfera parcial de CO₂ favorece su crecimiento dando colonias mucoides con cápsula abundante.

Actualmente se conocen 13 serogrupos de *N. meningitidis* de acuerdo a la presencia de antígenos capsulares o proteína de membrana externa; donde el grupo A es el responsable de la meningitis epidémica, el grupo B y C de las infecciones en los períodos inter epidémicos; los otros grupos son menos frecuentes y las infecciones de menor gravedad.

Recolección de muestras:

Usualmente se aísla a partir de muestras de líquidos estériles como LCR, Sinovial, Pleural o de material aspirado de petequias, material de ojos, sec. genital, y del ano. En el material colectado debe reducirse al mínimo la exposición al aire y a las bajas temperaturas.

Métodos de cultivo: Las muestras de cualquier líquido mayor de 1 ml deben centrifugarse a 1500 rpm por 15 min. El sobrenadante se colecta en tubo estéril (puede ser utilizado para detección rápida directa de antígenos solubles), el sedimento se resuspende para luego ser inoculado en los medios apropiados (A. sangre, A. chocolate o Thayer Martin y Tioglicolato). Las muestras purulentas no requieren centrifugación.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

Las mismas técnicas aplicadas a la identificación de gonococos son útiles para los meningococos.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES COMUNES DEL GENERO NEISSERIA.

Especies	Crecimiento a 22 C	glucosa	maltosa	sacarosa	lactosa
N.meningitidis	-	+	+	-	-
N.gonorrhoeae	-	+	-	-	-
N.lactamica	-	+	+	-	+
N.catarrhalis*	+	-	-	-	-
N.sicca	+	+	+	+	-
N.flavescens	+	-	-	-	-

* ahora Branhamella catarrhalis.

RECURSOS MATERIALES:

Recursos materiales por equipo .

2 Medio agar gelosa chocolate enriquecido.

2 Medio agar sangre 5%.

2 Medio CTA Glucosa.

2 Medio CTA Maltosa

2 Medio CTA Sacarosa

2 Medio CTA Lactosa

Reactivo H₂O₂

Reactivo Oxidasa.

Coloración Gram.

Materiales:

2 Hisopo estéril

2 Abatelenguas.

Asas de inoculación.

Portaobjetos

Papel filtro.

Mechero Bunsen.

Cepas:



Neisseria spp

Otros:

Set de cepas bacterianas y medios de cultivo para ser utilizadas como testigos.

DESCRIPCIÓN:

- Obtener una muestra de exudado oro faríngeo.
- Realizar frotis y tinción de Gram.
- Realizar frotis de la cepa proporcionada, dejar secar, fijar y teñir por la técnica de Gram.
- Observar y describir la morfología microscópica de las preparaciones.
- Inocular en Agar Sangre y agar chocolate enriquecido la muestra y la cepa proporcionada
- Incubar 24-48 hrs. a Temperatura 37 C en ambiente de 5% de CO₂
- De la muestra de exudado faríngeo identifique colonias de Cocos Gram negativos.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

- Describir la morfología colonial de la cepa y las colonias del exudado oro faríngeo.
- Realice las pruebas de catalasa y oxidasa.
- Inocular en Medio con base CTA con Glucosa, Maltosa, Sacarosa, Lactosa.
- Incubar 24-48 hrs. a 37 C.
- Observar, registrar resultados y concluir la especie de la cepa proporcionada.

RESULTADOS:

Descripción de la Morfología Microscópica:

Muestra Oro faríngeo:

Cepa:

Descripción de la Morfología Colonial:

Muestra Oro faríngeo:

Cepa:

Tabla de Resultados:



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1

Prueba	Cepa	Muestra oro faringe
Catalasa		
Oxidasa		
Medio CTA Glucosa.		
Medio CTA Maltosa		
Medio CTA Sacarosa		
Medio CTA Lactosa		

	Identificación presuntiva
Cepa:	
Muestra oro faringe	

CONCLUSIONES:



Bibliografía:

1.-Murray ,R.P.,Drew,L.W Kobayashi,S.A.& Thompson ,H.T.1990.

Medical Microbiology. Ed. The C.V. Mosby Co.USA .p. 180-184

1. - Baron,E.L& S.M.Finegold.1990.Bailey & Scott .Diagnostico Microbiologico.8th ed. Med. Panamericana.p.367 – 374.

2. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J.T., WilliamsS.T. **Bergey` s Manual of Determinative Bacteriology** .9th.ed.Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

DENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.
 BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS.
 GENERO Bacillus.
 CATEGORÍA MAYOR II. GRUPO 19. BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS.
 GENERO Listeria.
 Practica No.10
 TEMA TEÓRICO: 7.4. Bacilos Gram. Positivos

OBJETIVO:

Al finalizar la practica el alumno:

Será capaz de identificar esporas en preparaciones microscópicas.

Realizar las pruebas de laboratorio para la identificación preliminar de las especies de Bacillus spp. y Listeria spp.

FUNDAMENTO.

En el **Manual Bergey de Bacteriología Sistemática** el genero Bacillus se agrupa en la categoría mayor II, grupo 18. Consta de 34 especies, la mayoría saprofitas ampliamente distribuidas en el aire, suelo y agua. En cultivos jóvenes son bacilos largos Gram Positivos aerobios o facultativos, catalasa positivos. Presentan endosporas de forma cilíndrica o helicoidal y posición generalmente central, resistentes al calor y la desecación y a varios desinfectantes.

La especie tipo es B. subtilis.

Varias especies son responsables de infecciones importantes de diversos tipos. La especie de mayor importancia es el B.anthraxis, agente etiológico del ántrax llamado también carbunco o pústula maligna que afecta principalmente al ganado. El ántrax humano lo contraen granjeros, veterinarios o trabajadores de mataderos o talleres en los que se maneja lana.

El ántrax se puede manifestar en tres formas dependiendo de la ruta de entrada.

1. Ántrax cutáneo o pústula maligna, se inicia por la entrada del microorganismo a través de una lesión.
2. Pulmonar (Enfermedad de los cardadores de lana)El contagio se efectúa por vía aérea con el material infectado por las esporas.
- 3.- La Intestinal que se adquiere por la ingestión de alimentos contaminados por esporas, es la forma más rara y violenta de la enfermedad.



El Bacillus cereus es la segunda especie de importancia médica y la principal entidad clínica es Intoxicación alimentaria que puede presentarse de dos formas : la de tipo emético asociado con una enterotoxina termoestable (relacionado con ingestión arroz contaminado) y la de tipo diarreico. Producido por una toxina termolábil (ingestión de carnes o verduras) .,el cuadro clínico esta relacionado con una toxina termoestable

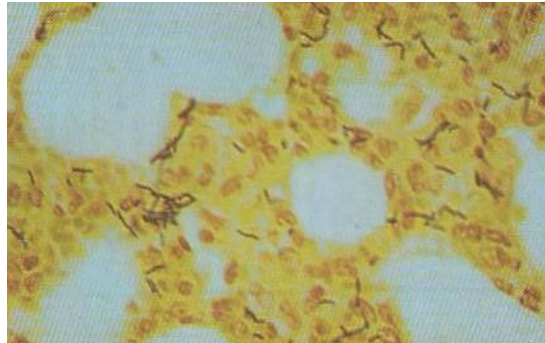
Otras especies de Bacillus se han reportado como agentes etiológicos en procesos infecciosos en humanos que presentan algún factor predisponente

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

La diferenciación de las especies de Bacillus esta basada en el tamaño y localización de las esporas, en el hecho de que sea aerobio obligado o facultativo, fermentación de carbohidratos, hidrólisis del almidón, licuefacción de la gelatina, producción de acetil metil carbinol Voges Proskawer, producción de indol y nitritos, producción de cápsula, hemólisis, sensibilidad a la penicilina y patogenicidad en animales.

La temperatura óptima de desarrollo es de 35 C

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1



Cuando se sospecha de *B.anthraxis* es necesario tomar precauciones rigurosas de seguridad. Existen otros métodos de identificación que no incluyen cultivo.

El genero **Listeria** consiste en siete especies. *Listeria monocytogenes* causa enfermedad humana. *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo. Los síndromes clínicos más importantes son enfermedad neonatal, meningitis en el adulto, Bacteriemia primaria, Endocarditis entre otras infecciones. Es un cocobacilo Gram. positivo, anaerobio facultativo, **no esporulado**, hemolítico (produce listeriolisina O), se caracteriza por su movilidad (a los tumbos) en líquidos incubados a T ambiente, catalasa positiva.

RECURSOS MATERIALES:

Tinción de Gram.

Tinción de Shaeffer y Fulton

Medios de cultivo:

2 Medio en placa de agar gelosa sangre 5%.

2 Medio en placa de Agar soya tripticasa.

Reactivo de catalasa.

1 Medio Voges Proskawer.

1 Medio de Nitritos.

1 Medio SIM.

1 Medio TSI

2 D-glucosa,

2 D-manitol,

2 D-xilosa

Portaobjetos

Asas de inoculación.

Cepas bacterianas.

3. Cepa de *Bacillus* spp. (preparada con una semana de anticipación)



4. Cepa de *Listeria monocytogenes*.

Otros:

Set de medios de cultivo para ser utilizados como testigos.

DESCRIPCIÓN.

1. Realizar dos frotis de las cepas proporcionadas.
2. Teñir por la técnica de Gram. .
3. Teñir por la técnica de Shaeffer y Fulton (esporas).
4. Observar y describir la morfología microscópica.
5. Sembrar las cepas en Agar Sangre y agar Soya Tripticasa por estría cruzada.
6. Incubar 24-48 hrs. a 37 C.
7. Describir la morfología colonial.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1



8. Inocular con la cepa **No. 1** los siguientes medios: Medio SIM, Voges Proskauer, Nitritos D-glucosa, D-manitol, D-xilosa, incubar 24-48 hrs. a 37C.

9. Inocular la cepa No. 2 en los siguientes medios: TSI, Manitol, glucosa.
10. Observar, registrar resultados y concluir la especie de la cepa proporcionada.

RESULTADOS:

Dibuje y describa sus resultados.



Identifique presuntamente las cepas proporcionadas.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

CONCLUSIONES.

Bibliografía:

1. 1.-Murray ,R.P.,Drew,L.W Kobayashi,S.A.& Thompson ,H.T.1990.
Medical Microbiology. Ed. The C.V. Mosby Co.USA .p. 180-184
2. 2.-García-Ramos,E y Hernández –Mendez,J.T.1988.**Manual para el aislamiento e identificación de Bacterias anaerobias** .ENCB-IPN.
3. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J.T., WilliamsS.T. **Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology** .9th.ed.Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS.
CATEGORÍA MAYOR I. GRUPO 5. SUB GRUPO I. FAMILIA Enterobacteriaceae.

Practica No.11

TEMA TEÓRICO que apoya: 7.6. Bacilos Gram negativos.

OBJETIVO:

Al finalizar la practica el alumno:

1. Conocera los criterios y pruebas de laboratorio para la identificación de enterobacterias por el laboratorio.
2. Realizar las pruebas de laboratorio mas comunes para la identificación en el laboratorio de los miembros de la familia **Enterobacteriaceae**.

FUNDAMENTO.

La familia Enterobacteriaceae es el grupo mas grande y heterogeneo de bacilos Gram negativos de importancia clinica. Los miembros de esta familia incluyen una gran variedad de generos algunos de los cuales forman parte de la Biota normal mientras que otros causan infecciones

La taxonomia de la familia Enterobacteriaceae es compleja y esta cambiando con rapidez conforme se efectuan estudios de homologia de ADN . Actualmente se usan tres enfoques para identificar los diversos generos y especies :

- 1)La nomenclatura propuesta por Edward y Ewing.(1986), por medio de subagrupamientos fenotipicos en tribus.
- 2) Clasificación propuesta por Brenner y col. publicada en *Manual Bergey's of Systematic Bacteriology* (1984) en la cual se definen 14 generos mayores y 6 adicionales basados en estudios de relaciones de DNA.
- 3) Farmer y col. de los CDC en el que estan subagrupadas en 22 generos 69 especies y 29 grupos entericos basado estudios de relaciones de DNA y características fenotipicas.



Para el desarrollo de esta practica se utilizaran los criterios de Edward y Ewing.

Generalidades:

Las enterobacterias son los aislamientos bacterianos aislados con mas frecuencia de muestras clinicas. Estan ampliamente dispersos en la naturaleza, estos microorganismos se encuentran en suelos, agua, plantas y en el tubo digestivo de humanos y animales.

La familia Enterobacteriaceae se caracteriza por estar constituida por bacilos o cocobacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos , crecen bien sobre medios de cultivo comunes en el laboratorio , reducen los nitratos a nitritos, oxidasa negativos, utilizan la glucosa por la via fermentativa .

La diferenciacion de las enterobacterias se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genetico de los cromosomas bacterianos. Los substratos con los cuales pueden reaccionar estas enzimas se incorporan a los medios de cultivo junto con indicadores que pueden detectar la utilizacion del substrato o la presencia de productos metabolicos especificos. Eligiendo una serie de medios que evaluen diferentes características metabolicas es posible establecer un perfil bioquimico para su identificación.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:

La identificación por el laboratorio de las enterobacterias se realiza en una secuencia que incluye:

1. Tinción de Gram (Solo en muestras que no sean de materia fecal)
2. Morfología de las colonias bacteriana en medios de cultivo. Los medios de cultivo s pueden ser medios no selectivos para aislamiento primario (ej. Agar sangre), medios de enriquecimiento y Agares selectivos y o diferenciales (p.ej. MacConkey agar , Hektoen agar, SS agar, XLD agar etc.)

Algunos de estos medios son complejos e incluyen ingredientes que no solo inhiben el crecimiento de ciertas especies bacterianas (selectividad), sino que también detectan diversas características bioquímicas importantes para efectuar una identificación preliminar de los microorganismos presentes en las muestras (medios diferenciales).

3. Utilización de medios que evalúan diferentes características metabólicas de los microorganismos (pruebas bioquímicas). Con pocas excepciones todos los miembros de esta familia muestran las siguientes características:

- La glucosa es metabolizada de forma fermentativa.
- No hay actividad de citocromo oxidasa.
- Los nitratos son reducidos a nitritos.

Existen una variedad de pruebas diferenciales y numerosos esquemas disponibles para la identificación final de especies de enterobacterias las más relevantes son :

Utilización de los hidratos de carbono.

Actividad de ortonitrofenil galactosidasa ONPG.

Producción de indol

Rojo de metilo y Voges Proskauer (acetil metil carbinol)

Utilización del citrato.

Producción ureasa.

Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina.

Producción de fenil alanina deaminasa

Producción de sulfuro de hidrógeno

Motilidad.

RECURSOS MATERIALES:

Recursos materiales por equipo de trabajo.

Tinción de Gram.

Medios de cultivo en placa:

2 Medios Agar Eosina azul de metileno (EMB)

2 Medio Hecktoen agar.

2 Medio XLD o SS agar (elegir según existencia)



Medios en tubo :

4 tubos con medio OF glucosa.

2 tubos medio TSI.

2 Microplaca de pruebas bioquímicas (Microscan, Api) (elegir según existencia)

Reactivos:

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

Reactivo de catalasa.
 Reactivo Voges Proskawer (A y B)
 Reactivo de Nitritos.
 Reactivo de oxidasa.
 Reactivo Indol.
 Reactivo cloruro ferrico.
 CEPAS:
 Cepas de enterobacterias en existencia en el cepario del laboratorio.
 (Preparar de acuerdo con el instructor para ser manejadas como cepas problema)



DESCRIPCIÓN.

- 1 Realizar frotis de la cepas proporcionadas.
- 2 Teñir por la técnica de Gram .Observar y describir la morfología microscópica.
- 3 Sembrar por estría cruzada las cepas en los medios de cultivo en placa proporcionados.
- 4 Inocular el medio en tubo OF (2 por prueba). Cubrir con aceite mineral uno de los tubos.(previamente inoculado)
- 5 Inocular el medio TSI.

- 6 Inocular la microplaca de pruebas bioquimicas de acuerdo a instrucciones.
- 7 Incubar a T de 37 C.
- 8 Interprete y registre los resultados de las pruebas siguiendo instrucciones.

RESULTADOS:



En forma secuencial dibuje y describa sus resultados.
 Analice sus resultados utilizando diagramas simplificados e identifique presuntivamente la cepa proporcionada.
 Elabore reporte individual de acuerdo a las instrucciones del instructor.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

CONCLUSIONES.

Bibliografía:

4. García-Ramos,E y Giono Cerezo S. Bacteriología Medica disgnostica .ENCB-IPN. Mexico 1993.
5. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J.T., WilliamsS.T. Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. .9th.ed.Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994
6. Koneman/ Allen/ Dowell/Janda/ Sommers/ Winn. Diagnostico Microbiologico.3^a. Edicion. Ed. Medica Panamericana.1998.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.
 BACILOS GRAM NEGATIVOS. CATEGORÍA MAYOR I. GRUPO 4. GENERO Pseudomonas
 Practica No. 12
 TEMA TEORICO QUE APOYA: Modulo 7.7.Pseudomonas y otras.

OBJETIVO: Identificar en el Laboratorio bacterias del genero Pseudomonas.

FUNDAMENTO:

CARACTERÍSTICAS GENERALES:

Pseudomonas es un género que de acuerdo al Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology, esta agrupado en la CATEGORÍA MAYOR I, GRUPO 4.

Tiene como características generales el ser bacilos Gram. negativos, aeróbicos, microaerofilicos. móviles por uno o más flagelos polares, aerobios estrictos capaces de usar como única fuente de energía compuestos simples de Carbono orgánico e inorgánico.

Utilizan glucosa y otros hidratos de C en forma oxidativa (con algunas excepciones), por lo que se denominan **NO** fermentadores.

Son catalasa y oxidasa positivas, crecen de 4C a 43 C. Algunas especies producen pigmento difusible como pioverdina (blanco a azul verdoso) y las piocianinas (color azul).

Ampliamente distribuidos en la naturaleza, diferentes especies son patógenos para el hombre, animales y plantas, pueden ser oportunistas (nosocomial).

Alrededor de 14% de los aislamientos bacterianos en los laboratorios de Microbiología corresponden a bacterias Gram. negativas NO fermentadoras de Carbohidratos, principalmente glucosa.

En el género Pseudomonas se distinguen dos tipos:

1.- Grupo fluorescente: P. aeruginosa, P. fluorescens y P. putida.

2.- Grupo No fluorescente: P. pseudomallei, P. mallei, P. cepacia, P. maltophilia y P. picketti.

La especie tipo es P. aeruginosa aislado con frecuencia de muestras clínicas procedentes de heridas, piel quemada, aparato urinario y aparato respiratorio principalmente. La mayoría de las infecciones son exógenas, aunque también pueden ser endógenas.

Se localiza normalmente en suelo y agua; se considera parte de la flora normal intestinal humana y puede localizarse esporádicamente en piel y saliva.

Presenta con frecuencia multiresistencia a los amino glucósidos (los antibióticos de elección)

La identificación presuntiva de Pseudomonas incluye:

Tinción Gram.

Morfología colonial, pigmentación, hemólisis, olor a "masa de tortilla"

Oxidasa.

Agar TSI

OF Glucosa.

Movilidad.

Crecimiento a 42 C.

BACILOS GRAM. NEGATIVOS NO FERMENTADORES MÁS FRECUENTEMENTE AISLADOS.

Pseudomonas aeruginosa	65 – 85%
Acinetobacter baumannii	9%
Stenoteophomonas (Xantomonas, Pseudomonas) maltophilia	4%
Chyseeobacterium (Flavobacterium) especies	3%
Burkholderia (Pseudomonas cepacia)	1%

RESERVORIOS DE BACTERIAS NO FERMENTADORES

Del ambiente	Pacientes	Hospital
Flores	Manos	Equipos anestesia



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1

Vegetales	Flora intestinal humana	Humidificadores
Suelo	Piel y saliva	Nebulizadores
Albercas y baños calientes		Termómetros
Lagos & arroyos y ríos		Cremas de manos
Tubos calientes		Algunos desinfectantes
Yacusi		Soluciones de irrigación
		Baños
		Utensilios de limpieza
		Manos del personal.

FACTORES PREDISPONENTES.

- Procesos malignos, Leucemia
- Instrumentación – Cirugía
- Cateterización
- Prótesis
- Diálisis
- Tratamiento esteroides
- Terapia Cáncer
- Inmunodepresivos
- Enfermedades crónicas
- Quemaduras
- Heridas abiertas & lesiones

RECURSOS MATERIALES:

Recursos materiales por equipo.

- Colorantes para tinción de Gram.
- 2 Placa agar McConkey.
- 2 Placa de Agar SS.
- 2 Placa de Agar sangre.
- 4 Tubo con medio O/F.
- 2 Medio en tubo de TSI
- 2 Medio SIM
- 2 Medio de Nitratos.
- Reactivo de Oxidasa
- Peroxido de hidrogeno 3%. (catalasa).

Cepas:

- 1 Cepas rotuladas como problema de bacilo Gram. negativo fermentador.
- 1 Cepas rotuladas como problema de bacilo Gram. negativo NO fermentador.



Otros:

Set medios de cultivo para ser utilizadas como testigos.

DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

A cada una de las cepas proporcionadas realizar:



- Tinción de Gram. Describa la morfología microscópica.
- Inocular agar MacConkey, Agar SS y Agar sangre por estriación.
- Inocular el medio O/F y cubrir uno de los tubos con aceite.
- Inocular los TSI por picadura y estriación.
- Inocular medio SIM por picadura.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

- Inocular medio Nitritos.
- Identificar cada una de las pruebas e incubar en ambiente aerobio a 37 C.
- Observar la morfología colonial en los medios en placa e Interpretar cada una de las pruebas.
- Identifique presuntamente las cepas proporcionadas.
- Anote los resultados y elabore sus conclusiones.

RESULTADOS:



1. Observar, registrar resultados.
2. Investigue y anexe cuadros de identificación abreviada.
3. Identifique presuntamente las cepas proporcionadas.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFÍA:

MURRAY P.R.,KOBAYASHI G.S.,PFALLER M.A.,ROSENTHAL K.S. *Microbiología Medica* .Harcourt Brace de España S.A.
 SIDNEY M.F.,ELLEN J.B.,Bayley/Scott.*Diagnostico Microbiológico*.
 Panamericana, Buenos Aires.
 KONEMAN ,E.W.;ALLEN,S.D.;DOWELL,V.R.;Y SOMMERS,H.M.:DOWELL,V.R.;Y SOMMERS,H.M.:*Diagnostico Microbiológico* .Panamericana, Buenos Aires,1983.
 MAC FADDIN,JF. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Panamericana México .1993.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

CATEGORÍA MAYOR II. GRUPO 5.GENERO Haemophilus.

TEMA TEÓRICO: Modulo 7.9. Bacteriología clínica. Haemophilus .

OBJETIVOS: Identificar en el Laboratorio bacterias del Genero Haemophylus de importancia clínica.

FUNDAMENTO:

El genero Haemophilus esta formado por bacilos Gram. Negativos de 1.5 a 0.5 micras, no esporulados, inmoviles, se presentan como formas cocobacilares filamentosas y pleomorficas, forman cápsula en cultivos jóvenes .

Haemophilus influenzae es la especie patógena más frecuente ,provoca infecciones pulmonares secundarias a brotes epidémicos de influenza ,se encuentra asociado a infecciones del aparato respiratorio causando neumonías graves ,laringotraqueitis obstructivas ,principal causa de meningitis bacteriana en niños menores de 4 años,conjuntivitis,sinusitis,endocarditis. Bacteriana y otitis media.

Otras especies de interés medico son:H.parainfluenza.H.haemolyticus,H.segnis,H.aegypticus,H.ducreyi. H.paraahaemolyticus,H.paraphroahaemolyticus,H.paraphrophilus.

Son parásitos estrictos del hombre y otros animales, anaerobio facultativo, requieren para su crecimiento de factores X(hemina)termoestable y V (difosfo piridin nucleótidos) termolábil, presente en la sangre . El factor V puede ser aportado por otros microorganismos como los estafilococos por lo que crece alrededor Presentando el fenómeno de satelitismo. Las reacciones de fermentación son variables y no tienen utilidad diferencial.

Las cepas se clasifican en ocho biovariedades (I-VIII) en base a su acción sobre el triptofano ,Urea,Ornitina y en seis biovariedades relacionadas con su polisacárido capsular (de la a a la f).



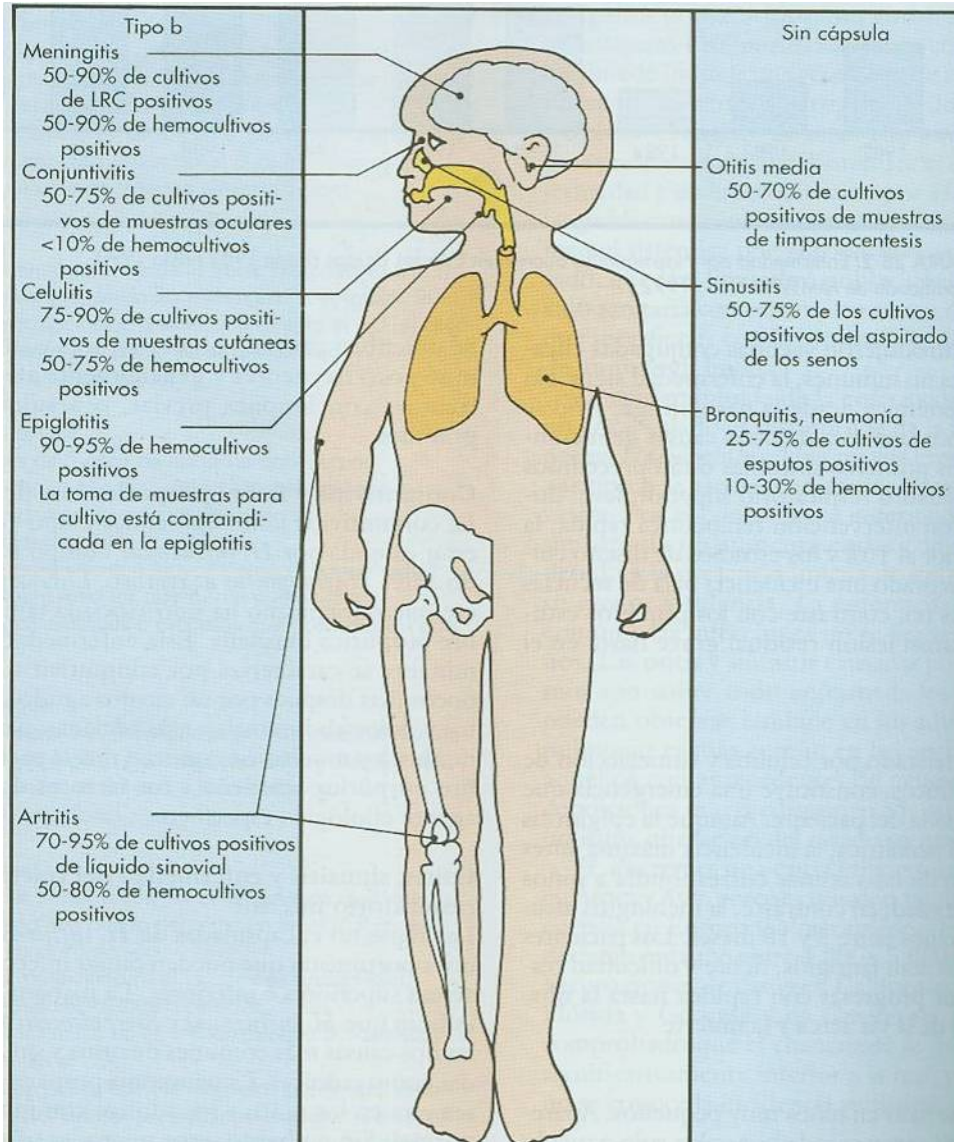
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1



Efectividad: 2008-1



DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

Recolección de muestras: las muestras en las que se pueden aislar las diferentes especies de Haemophilus son: secreciones y lavados bronquiales, exudado nasal o faringes

Crece en Agar sangre de conejo, caballo o cobaya. La sangre fresca humana y la de carnero inhiben el crecimiento. Crece abundantemente en Agar Chocolate enriquecido. En el aislamiento primario algunas cepas crecen mejor en presencia de 5% de CO2. En los medios sólidos las cepas virulentas capsuladas se muestran como colonias pequeñas en forma de gota de rocío. Tras 24 a 48 hrs. desaparecen las cápsulas y se observa auto lisis y una tinción de Gram. variable.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA			
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1	

En la identificación inicial se toma en cuenta la fuente de aislamiento, los requerimientos de factor XyV y el satelitismo(V).La prueba de hinchazón de la cápsula (Reacción de Neufeld) con antisuero específico puede emplearse para tipificar directamente en LCR.

Se pueden realizar pruebas serológicas de aglutinación con antisueros específicos o bien por aglutinación con partículas de látex recubiertas con Anticuerpos es muy sensible y proporciona un diagnostico preciso y rápido

RECURSOS MATERIALES:

Colorantes para tinción de Gram.

Medio de Agar sangre .

Medio de agar chocolate enriquecido.

Medio de Agar soya tripticasa en caja Petri. (TSA)

Medio de nitratos

Reactivo Nitratos

Reactivo de catalasa.

Taxo con factor X

Taxo con factor V

CTA glucosa en tubo.

CTA sucrosa en tubo.

CTA lactosa en tubo.

Cepas:

Cepa de Haemophilus spp.

DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

A la cepa proporcionada realizar:

- Tinción de Gram.
- Describa la morfología microscópica.
- Inocule las placas de agar chocolate y agar sangre.
- De acuerdo a las indicaciones del instructor :
 - Inocule placa de Agar soya tripticasa.(TSA)
 - Aplique sobre la superficie inoculada masivamente los discos o tiras que contienen factores X y V .
 - Inocule los medios de nitratos, glucosa, lactosa,sucrosa.
 - Incube en ambiente de CO₂.

RESULTADOS:

Describa la morfología microscópica.

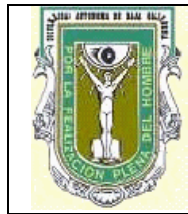
Observar la morfología colonial en los medios en placa.

Realice la prueba de catalasa .

Interpretar cada una de las pruebas.

Identifique presuntamente las cepas proporcionadas utilizando la tabla anexa.

Anote los resultados y elabore sus conclusiones.



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA
MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA**



Código: L3M-N3-002

No.de Revisión: 1

Efectividad: 2008-1



Microorganismo	Necesidad de factores de crecimiento		Hemólisis	Aumento del crecimiento con CO ₂	Catalasa	Fermentación de:			
	X	V				Glucosa	Sucrosa	Lactosa	Manosa
<i>Haemophilus</i>									
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-	-	±	+	+	-	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	+

Características diferenciales de los miembros comunes de la familia Pasteurellaceae.

CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFÍA:

- Murray ,R.P.,Drew,L.W Kobayashi,S.A.& Thompson ,H.T.1990. Medical Microbiology. Ed. The C.V. Mosby Co.USA .p. 180-184
 - Baron,E.L.& S.M.Finegold.1990.Bailey & Scott .Diagnostico Microbiologico.8th ed. Med. Panamericana.p.591-595.
 - García E. C.Ramos,Giono C.S. I.P.N.,Mex.1993.Bacteriología Medica Diagnostica.p116-122.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J.T., WilliamsS.T. **Bergey` s Manual of Determinative Bacteriology** .9th ed.Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. CATEGORÍA CATEGORÍA MAYOR II. GRUPO 21. GENERO Mycobacterium.

Practica No: 13

Tema teórico: Modulo 7.12 .Mycobacterias.

OBJETIVOS:

Al finalizar la practica el alumno:

Realice la obtención y evaluación de las muestras biológicas destinadas a cultivo bacteriológico de Mycobacterias,

Que el alumno conozca los procedimientos para la descontaminación de muestras y los procedimientos de cultivo y tinción de bacterias ácido alcohol resistentes.

FUNDAMENTO:

Varias especies conforman la familia Mycobacteriaceae, se caracterizan por contener ácidos micólicos en su pared, la cual es rica en lípidos, lo que convierte a la superficie en hidrofóbica, resistentes a la decoloración con ácidos (ácido resistentes) y a muchos desinfectantes y colorantes de laboratorio.

Son bacilos delgados de 1 a 4 micras, Gram. Positivos, aerobios, no móviles, no capsulados ni esporulados.

Las propiedades de crecimiento, la morfología de las colonias y la formación de pigmento se utilizan para la identificación preliminar de las Micobacterias.

Algunas especies son patógenas para el hombre, otras son oportunistas y otras saprofitas.

Micobacterium tuberculosis es la especie que se aísla con más frecuencia en casos de Tuberculosis en humanos, pero en los últimos años otras Micobacterias consideradas como potencialmente patógenas ahora conocidas como No tuberculosas o diferentes a M.tuberculosis (MOOTT) producen las llamadas Micobacteriosis que con la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) han ganado importancia.

La tuberculosis es un padecimiento pulmonar (90% de los casos), del sistema nervioso central (6%), del aparato digestivo (2%) y de otras localizaciones (2%).

Para diferenciar los aislamientos de Mycobacterias más comunes se utiliza la clasificación de Runyon (1981) de acuerdo a la siguiente agrupación:

Grupo O: De crecimiento lento:

M.tuberculosis, M.bovis, M.ulcerans, M.africanum.

Grupo I: De crecimiento lento, fotocromógeno (pigmento amarillo o naranja después de la exposición a la luz):

M.kansasii, M.marinum, M.simiae.

Grupo II: De crecimiento lento, escotocromógeno (pigmentadas aun en ausencia de exposición a la luz):

M.scrofulaceum, M.szulgai, M.gordonae, M.flavescens y M.xenopi.

Grupo III: De crecimiento lento, no cromogénico: M.avium, M.intracellulare, M.gastri, M.terrae complex, M.triviale.

Grupo IV: De crecimiento rápido:



M. fortuitum, M.chelonae, M.phlei, M.smegmatis, M.vaccae.

La identificación de las especies por pruebas bioquímicas no es siempre sencilla, que en algunos casos las diferencias son cuantitativas, particularmente las MOOTT (Ej. M.avium y M.intracellulare) cuya identificación no es indispensable a nivel clínico, lo anterior permitió que Runyon (1981) formara grupos denominados complejos que contienen varias especies relacionadas taxonomicamente y presentan en común varias características. Ej. El complejo de bacilos tuberculosos que contiene: M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum, M.microti.

En México los programas de control de la Tuberculosis (TBC) tienen establecido que el diagnóstico de esta enfermedad se realice preferentemente por técnicas bacteriológicas.

Las micobacterias pueden aislarse de una variedad de especímenes clínicos incluyendo esputo, orina, sangre, LCR, tejidos, sangre o de cualquier sitio sospechoso de ser el sitio de infección tuberculosa.

Secreciones respiratorias: Estas muestras son aceptables ya sea que sean obtenidas por expectoración espontánea o inducida con aerosoles, aspiración y lavados bronquiales o gástricos. La mejor muestra se obtiene del material purulento de la primera expectoración productiva por la mañana, debe ser recogido en recipiente

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA		
	Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

estéril de boca ancha, sin contaminación con saliva o secreciones nasales. Los pacientes que no pueden producir esputo pueden ser inducidos a expectorar con la aspiración de aerosol (nebulización) de NaCl al 10 o 15 % durante 10 min, generalmente estas muestras son aceptables y tienen un aspecto acuoso. Otra muestra que puede ser recogida de pacientes incapaces de producir esputo especialmente niños es el aspirado gástrico, los cuales deben ser transportados de inmediato al laboratorio o neutralizar su acidez.

Los esputos para análisis bacteriológicos de rutina son seleccionados para determinar si son aceptables o no en base a la cantidad de menos de 10 células epiteliales escamosas por campo microscópico (aumento x 100). La presencia de células cilíndricas ciliadas o células caliciformes del epitelio bronquial en los lavados bronquiales indican un espécimen profundo.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:

El diagnóstico de Laboratorio incluye:

- Prueba cutánea o intradermoreacción. (P.P.D o Mantoux)
- Microscopia con colorantes carbolfucsinas (Ziehl Neelsen y Kinyoun), o colorantes fluorocromos (Auramina, Rodamina o colorantes fluorocromos ligados a anticuerpos).
- Cultivos: Medios de agar y huevo. (Lowenstein Jensen, Petragnani, Middlebrook y 7H10, Medio de Dubos, Stonebrink, etc.) y medios de cultivo en caldo.
- Identificación definitiva por pruebas bioquímicas. (Niacina, Catalasa a 68 C., Reducción de Nitrato, hidrólisis del Tween, Captación de Hierro, Ureasa, Reducción del Telurito, B-blucosidasa, B-galactosidasa, Crecimiento en NaCl 5%, Arilsulfatasa y Temperatura de crecimiento).
- Sondas de Ac. Nucleicos.
- Análisis cromatográfico de los lípidos de la pared celular.
- Serología.

Prueba cutánea o intradermoreacción:

Consiste en la aplicación de 0.1 ml (5 U) de antígeno tuberculínico (derivado proteico purificado de la pared celular) inyectado por vía intradérmica con aguja fina (calibre 26 o 27). Una aplicación precisa se observa una pequeña ampulla en el sitio de aplicación. La reactividad cutánea se mide después de 48 hrs. a 72hrs. y se manifiesta por la zona de induración (No eritema).

Una prueba positiva es generalmente mayor de 10 mm de induración. La interpretación actual de la prueba varía de acuerdo a las diferentes poblaciones.

Microscopia:

La detección microscópica (Baciloscopia) de los bacilos en muestras clínicas proporciona el método más rápido para confirmar la enfermedad (valor predictivo > 96%)

En las coloraciones con colorantes Carbol fucsinas se tiñen de color rojo intenso resistente a la decoloración con alcohol ácido por esto se les llama ácido alcohol resistentes. (Ziehl Neelsen y Kinyoun)

Los colorantes fluorocromos presentan mas sensibilidad y la especificidad del método resulta superior al 95% cuando se hace cuidadosamente. (Auramina, Rodamina).

El número de bacilos es muy importante ya que se relaciona con el grado de infectividad del paciente. La lectura se hace en forma sistemática empezando del lado izquierdo superior del frote, moviendo hacia la derecha hasta terminar en ese largo, si no se encuentran bacilos o se ven pocos se continúa en zig-zag.

El observador tomara nota del No. De bacilos encontrados en cada campo. Si la preparación contiene mas de 20 bacilos por campo, es suficiente observar 20 campos, si contiene 1 a 10 bacilos se deben observar por lo menos 50 campos. Muestras con escaso número de bacilos 100 o más campos.

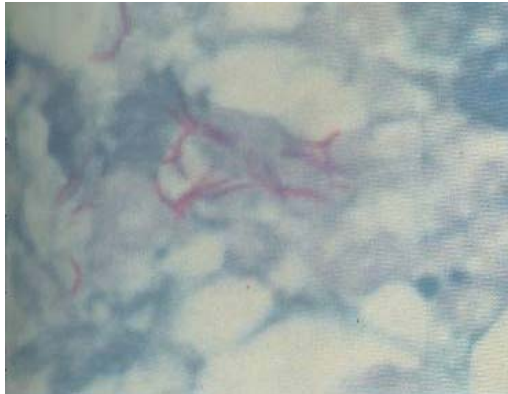
Informe de la Baciloscopia.

(-) No se encuentran BAAR en 100 campos microscópicos observados.

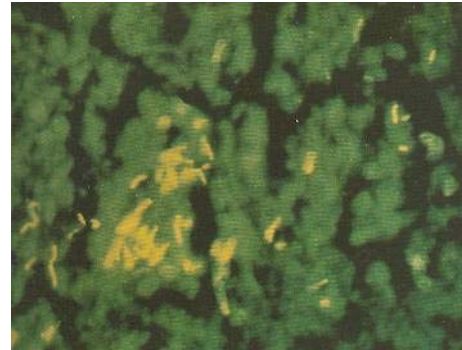
(+) Menos de 1 BAAR por campo, en 100 campos observados.

(++) Uno a 10 BAAR por campo en 50 campos observados.

(+++) Más de 10 BAAR por campo, en 20 campos observados.



Tinción ácido resistente de M.tuberculosis.



Tinción acidorresistente fluorocromo.

Cultivo:

Las muestras de los pacientes con tuberculosis contienen generalmente flora bacteriana mixta (Ej. Expectoración, orina). El aislamiento efectivo depende de la recolección de las muestras y de la supresión de las bacterias contaminantes. Las muestras procedentes de lugares normalmente colonizados, son tratadas con agentes descontaminantes antes de la inoculación de los medios de cultivo para reducir el exceso bacteriano y licuar el moco así como para facilitar la concentración por medio centrifugación (FCR:3000 a 4000 por 30 min.). Los métodos de descontaminación dependen del tipo de muestra siendo los más empleados el NaOH al 2 o 4 % y la N-acetil L-cisteína.

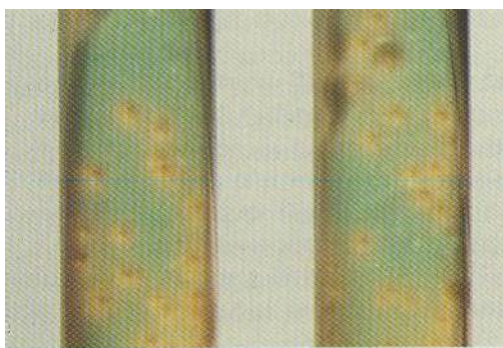
Posteriormente se inoculan en los medios de cultivo apropiados: Medios de agar y huevo. (Lowenstein Jensen, Petragnani, Middlebrook y 7H10, Medio de Dubos, Stonebrink, etc.)

Deben inocularse 4 tubos, de los cuales 2 se cubren con papel negro y 2 descubiertos.



Se incuban uno cubierto y uno destapado a 37 C y los restantes a temperatura ambiente. Esto es con el objeto de observar la formación de pigmento por influencia de la luz o de la oscuridad y el crecimiento a Temperatura ambiente y 37 C.

M.tuberculosis es de crecimiento lento y no forma pigmento, además no crece a temperatura ambiente. Las colonias empiezan a observarse a las 3 o 4 semanas de incubación, sin pigmento y solo en los tubos incubados a 37C.

En la actualidad existen métodos para detectar en menos tiempo el crecimiento con el uso de cultivos radiométricos que permiten detectar el metabolismo del ac. Palmítico y la producción de CO₂ (BACTEC) Identificación.



Cultivo en medio de Lowenstein Jensen Mycobacterias No Foto cromógenas.

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

La identificación definitiva requiere el uso de pruebas bioquímicas.(Niacina,Catalasa a 68 C.,Reducción de Nitrato, hidrólisis del Tween,Captación de Hierro,Ureasa,Reducción del Telurito,B-blucosidasa,B-galactosidasa,Crecimiento en NaCl 5%,Arisulfatasa y Temperatura de crecimiento).Otros métodos de identificación es el uso del Análisis cromatografico de los lípidos de la pared celular

Sondas de Ac. Nucleicos:

El uso de sondas moleculares para detectar secuencia de los Ac. Nucleicos específicas de las Micobacterias y la amplificación de genes que codifican para el ARN ribosomal utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten ahora su detección directa en muestras clínicas y su identificación a partir de cultivos.

Serología:

Se utilizan varias pruebas para el diagnóstico serológico de enfermedad micobacteriana activa (Latex, ELISA, RIA etc.), sin embargo las pruebas para detectar los antígenos o los anticuerpos presentan baja sensibilidad y especificidad.

RECURSOS MATERIALES:

Equipos de coloración de Kinyoun .

Portaobjetos

Guantes,cubre bocas.

Asas.

Aplicadores de madera.

Microscopio óptico

Preparaciones de Micobacterias previamente elaboradas de cultivo y muestras biológicas



Los alumnos aportaran muestra de expectoración.

DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD.

Extreme las medidas de protección para efectuar los siguientes procedimientos:

1. Evalúe la muestra de Esputo mediante la observación microscópica de un extendido directo de la muestra.
2. Prepare 2 extendidos en portaobjetos del material purulento usando aplicador de madera .Extender en una superficie de 2 cm 2. Deseche el aplicador en frasco que se le indique para esterilizarlo posteriormente.
3. Deje secar los frotis al aire (15 a 30 min.)
4. Fije al calor (60 seg.).
5. Tiña las preparaciones por la técnica de Kinyoun
6. Observe al microscopio e informe de acuerdo a lo propuesto por la Unión Internacional contra la tuberculosis.
7. Observar las laminillas de cultivos y muestras de pacientes previamente teñidos.
8. Elabore un informe de Laboratorio de la preparación que observe.

RESULTADOS:

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGIA MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA	
Código: L3M-N3-002	No.de Revisión: 1	Efectividad: 2008-1

CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFÍA:

1. Vestal,A.L.1975.Procedures for the Isolation and identification of Micobacteria.Public Health Service Publication No. 1995.U.S.A.
2. Manual de Normas y Procedimientos, técnica para la bacteriología de la Tuberculosis .Parte II .El cultivo de Mycobacterium tuberculosis .OPS/OMS.(Monografía No.27) 1985.
3. La muestra, El Examen Microscópico .Parte I OPS/OMS. (Monografía No.26) ,1988.
4. Guía Técnica para la recolección Conservación y Transporte de la muestra de Esputo y Examen por Microscopia Directa para la Tuberculosis.1978.Bol.Un.Int.Tuberc.Suplemento No. 2.
5. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J.T., WilliamsS.T. **Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology** .9th.ed.Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1994