



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA DE PRIMER AÑO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA.



Licenciatura Médico Cirujano

Manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de
Primer Año

Coordinación Área Biomédica

Aprobado por el Comité Académico de Carrera: 03/08/23

Vigente hasta: 03/08/26



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA DE PRIMER AÑO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	02	3 de 187

PROFESORES QUE ELABORARON EL MANUAL

PINEDA PEÑA ELIZABETH

JOSE FERNANDO ARELLANO COBIAN

VERONICA TORRES CABALLERO

MARTHA ADELINA LÓPEZ HERNÁNDEZ

EMELINA MARÍA DEL CARMEN AMIL ESTRADA †

HUMBERTO RAMIREZ LOPEZ

LINA ORTÍZ IBARRA

EDGAR IVÁN TORRES CORIORILES

YESSICA LÓPEZ



Contenido

INTRODUCCIÓN.....	5
Objetivos Generales	7
Reglamento General de los Laboratorios	8
Reglamento Interno del Laboratorio de Microbiología de la Licenciatura Médico Cirujano	9
Manejo de Residuos Biológico – Infecciosos	14
Normatividad.....	17
Consentimiento informado.	18
Rúbrica de evaluación del Reporte de Prácticas de Laboratorio de Microbiología	22
MÓDULO 1. La Salud del Hombre y sus Entornos.	24
Descripción y uso del microscopio.....	24
Tinciones simples.	34
Tinción de Gram y Ziehl-Neelsen.....	38
Medios de cultivo y técnicas de aislamiento de bacterias.	46
Morfología bacteriana y colonial.	54
Análisis bacteriológico de aguas para la determinación de coliformes.....	62
Microcultivo de hongos.....	67
Ecología bacteriana.....	72
Requerimiento gaseoso y temperaturas para el crecimiento bacteriano.....	78
Obtención y aislamiento de cultivos puros.....	84
Mecanismos de patogenicidad y virulencia.	88
Fisiología o metabolismo bacteriano.....	92
Acción de agentes físicos y químicos sobre el crecimiento bacteriano.	97
Antibiograma.....	105
Microorganismos patógenos y enfermedad.....	110
MÓDULO 2. Crecimiento y Desarrollo Intrauterino.	117
Reacciones de precipitación en gel (Ouchterlony).	117
Reacciones de precipitación en capilar.	123
Reacciones de aglutinación.	127
Gonadotropina Coriónica Humana.....	131
Fagocitosis.....	136
Demostración de la lisozima en secreciones.....	144



MÓDULO 3. Parto, Puerperio y Periodo Perinatal	148
Antiestreptolisinas.	148
Complemento.	152
Proteína C Reactiva.	159
MÓDULO 4. Crecimiento y Desarrollo Extrauterino.	164
Determinación del grupo sanguíneo y pruebas cruzadas.	164
Factor Reumatoide.	170
Inmunidad específica.....	175
Choque Anafiláctico.....	180
ANEXOS.....	185
Reporte de Práctica	185



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	5 de 187

INTRODUCCIÓN

El manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de Primer Año ha sido elaborado como material didáctico del componente de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Carrera de Médico Cirujano de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y dirigido a los alumnos de primer semestre de la carrera.

Este manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de Primer Año de la Carrera Médico Cirujano tiene por propósito que el alumno conozca los aspectos fundamentales de la microbiología y la inmunología que se manejan durante la asignatura de primer año, además de guiarlos mediante una metodología estandarizada. De manera que el alumno se involucre activamente en conocer las características morfofisiológicas básicas de los microorganismos a través de las diversas técnicas de tinción, las condiciones adecuadas para su desarrollo mediante las técnicas correctas de siembra y cultivo, el manejo de los métodos de esterilización, asepsia y control microbiológico, así como evidenciar la capacidad de patogenicidad y virulencia de los microorganismos de importancia médica y sanitaria. Por otra parte, este manual también pretende que el alumno se favorezca adquiriendo habilidades y destrezas en el desarrollo de experimentos del área de microbiología e inmunología para que pueda realizar un análisis e interpretación de los resultados obtenidos de manera que aplique los conocimientos adquiridos.

Este manual abarca practicas del área microbiológica en conjunto con la información teórica que se maneja durante la Módulo I y posteriormente los aspectos inmunológicos que son vistos en las Módulo II, III y IV, de forma tal que el alumno pueda comprender cada una para finalmente poder integrarlos en su práctica médica diaria. Cada practica se ha organizado en los siguientes apartados: Objetivo(s), Fundamento teorico, Materiales (equipo, reactivos y servicios), Procedimiento, Resultados, Cuestionario y Referencias bibliográficas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	6 de 187

Es importante resaltar que los conceptos incluidos en este manual no pretenden sustituir a los que el alumno adquiere en clases teóricas y tampoco sustituyen a la investigación bibliográfica que los estudiantes deben realizar para el desarrollo de las actividades en el laboratorio, por lo que este manual de procedimientos debe considerarse como una guía general que apoya el trabajo en el laboratorio y complementa el trabajo teórico de la asignatura. Por ello, se sugiere que la información manejada en la introducción y los cuestionarios de cada practica deben ser discutidos y enriquecidos en el dialogo entre estudiantes y profesores, favoreciendo la adquisición de conocimiento por parte del alumno mediante un pensamiento crítico. Además, la actividad practica en el laboratorio será supervisada por el profesor de forma continua para asegurarse que el procedimiento se lleve a cabo de manera segura, correcta y que el análisis de resultados sea realizado por parte de los alumnos de manera confiable.

Finalmente, la evaluación del componente práctico estará apegada en todo momento al programa académico vigente aprobado para el componente Microbiología, Parasitología e Inmunología de la carrera, considerando que se requiere un 80% de asistencia mínimo y que para llevar a cabo las practica en su totalidad la tolerancia de entrada será de 10 minutos máximo. En la evaluación se tendrá en cuenta: examen de conocimientos escrito semanal previo a la práctica, presentación de seminario (en caso de que aplique), participación activa durante la práctica y la entrega de reporte de práctica. La dinámica de evaluación será explicada a profundidad por los profesores en la sesión de introducción al laboratorio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	7 de 187

Objetivos Generales

- I. Proporcionar a los alumnos una herramienta didáctica para llevar a cabo las diversas técnicas microbiológicas que les permitan cultivar, caracterizar e identificar microorganismos de importancia médica y sanitaria. Así como comprender los fundamentos de las pruebas inmunológicas utilizadas en el diagnóstico clínico de enfermedades inmunológicas y en la evaluación del sistema inmune.
- II. Reafirmar los conocimientos adquiridos en las sesiones teóricas mediante su vinculación con los fenómenos observados en las prácticas.
- III. Estimular el aprendizaje significativo de los alumnos por medio del desarrollo de habilidades y destrezas prácticas en el manejo u uso adecuados de técnicas y aparatos usados en investigación básica y aplicada en el laboratorio de microbiología e inmunología.
- IV. Capacitar al alumno para realizar observaciones de manera adecuada y registrarlas apropiadamente, insistiendo en los aspectos cuantitativos de la ciencia y en el juicio clínico basado en evidencia científica.
- V. Desarrollar en los alumnos la capacidad de análisis mediante una actitud crítica ante la evidencia científica obtenida.
- VI. Contribuir en la formación de profesionistas que colaboran de manera armoniosa con todos los integrantes del equipo de salud a través del trabajo en equipo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	8 de 187

Reglamento General de los Laboratorios

1. Uso obligatorio de bata o uniforme.
2. Uso obligatorio de zapatos cerrados
 3. No trabajar solo.
 4. Trabajar con asesoría continua.
 5. Uso obligatorio de identificación.
 6. Prohibido fumar, usar audífonos.
7. Prohibido consumir bebidas y alimentos.
8. Prohibido correr y jugar dentro del laboratorio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	9 de 187

Reglamento Interno del Laboratorio de Microbiología de la Licenciatura Médico Cirujano

L-123, L-124

1. Será obligatorio el uso de bata blanca de manga larga y algodón que cubra hasta la rodilla para toda persona que permanezca dentro del laboratorio y durante la realización de las practicas se deberá utilizar el equipo de protección personal que sea necesario, así como el cabello recogido.
2. Por seguridad, se debe evitar el uso de lentes de contacto, zapato abierto, gorras, falda, short o bermuda, joyería, audífonos y cabello suelto dentro del laboratorio.
3. Está prohibido consumir alimentos, ingerir bebidas y fumar dentro del laboratorio.
4. El alumno deberá conducirse con ética, responsabilidad y de manera adecuada (no correr, no empujarse, no jugar) durante la realización de las practicas, así como en el manejo de animales de experimentación en caso de utilizarse.
5. El alumno deberá reportar a sus profesores si sufre alguna condición de salud que ponga en riesgo su participación en la práctica (crisis convulsivas, alteraciones cardiacas, toma de medicamentos antidepresivos, etc.), de manera que se tomen las precauciones necesarias para su seguridad dentro del laboratorio.
6. Se requiere de un 80% de asistencia mínimo para tener derecho a evaluación en el componente practico, por lo que una ausencia de más de 10 minutos será considerada como falta.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	10 de 187

7. Para una óptima realización cada práctica, la tolerancia de entrada será de 10 minutos máximo.
8. Las puertas de acceso, las áreas comunes y pasillos deberán estar libres de objetos que eviten el libre tránsito (bancos, mochilas, etc), así como no colocar mochilas o loncheras sobre la mesa de trabajo, estas deberán colocarse en el lugar destinado para este fin.
9. Para el trabajo en el laboratorio, los integrantes del grupo formaran 5 equipos con el número de alumnos que determine el profesor titular de laboratorio.
10. El grupo en general es responsable de la limpieza y conservación del equipo, materiales y áreas comunes del laboratorio durante la práctica. En caso de encontrar sucio el laboratorio se deberá reportar al personal a cargo o mediante el formato del Sistema de Gestión de la Calidad correspondiente.
11. Todos los alumnos deberán asegurarse de dejar cerradas las llaves de gas, agua y aire de su mesa de trabajo al finalizar la práctica. Mientras que todos los profesores se aseguraran de dejar cerrada la llave de gas principal del laboratorio al final de la práctica.
12. El alumno deberá limpiar con desinfectante la mesa de trabajo al inicio y al término de la práctica, dejándolo limpio (sin basura).
13. Todos los alumnos deberán realizar lavado de manos al inicio y al final de la práctica.
14. Solamente se podrá utilizar teléfono celular, computadora u otro dispositivo electrónico para realizar actividades propias de laboratorio con autorización del profesor a cargo del grupo.
15. El alumno designado solicitará el material necesario para desarrollar la practica al personal del interlaboratorio, usando un vale impreso expresamente para dicho fin y adjuntando una credencial vigente que lo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	11 de 187

acredite como alumno de la facultad. El listado del material se publicará en la puerta de acceso del interlaboratorio al inicio de la práctica.

16. Al recibir el material, el alumno designado revisará que el material se encuentre limpio, en buen estado y completo, deberá ser transportado de forma segura a su mesa de trabajo. En caso de que el material este deteriorado o incompleto deberán reportarlo de inmediato al personal de interlaboratorio y no transportarlo a su mesa de laboratorio hasta que le sea reemplazado.
17. Al recibir el microscopio, el alumno designado verificará que se encuentre en condiciones óptimas y limpio registrando en la bitácora correspondiente cualquier observación. Al finalizar la practica el alumno anotará en la bitácora correspondiente las condiciones en las que lo entrega.
18. El uso de aceite de inmersión en el microscopio solo se realizará bajo la supervisión del profesor de mesa y solamente se utilizará en el objetivo de inmersión (100x), mientras que alumnos y profesores verificarán que se limpie apropiadamente el objetivo antes de entregar el microscopio.
19. Durante el transcurso de la práctica, los alumnos solo podrán utilizar los aparatos, equipos y reactivos disponibles en el laboratorio si están siendo asesorados por un profesor.
20. El material utilizado durante la práctica, deberá ser entregado/devuelto al interlaboratorio máximo 10 minutos antes de que concluya el horario asignado. Dicho material deberá estar completo, sin daño y tal como se recibió.
21. Si por alguna razón, el material que se devuelve al interlaboratorio está deteriorado o incompleto, el usuario deberá hacer un vale adicional por ese material y dejar su credencial hasta que se reponga lo dañado o faltante; teniendo como límite dos semanas para reponer dicho material. Cumplido es



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	12 de 187

tiempo, si no se ha repuesto el material, no se le permitirá el acceso al laboratorio a todos los integrantes del equipo deudor.

22. En el caso de que algún material (como cultivos, bioquímicas, etc.) requiera ser incubado o guardado en el interlaboratorio para su posterior observación, deberá ser etiquetado claramente con una leyenda que incluya número de equipo, grupo y fecha, presentándose a la lectura de resultados en el tiempo establecido para cada uno.
23. Los alumnos (máximo 2 por equipo) deberán presentarse a la lectura de resultados con su bata puesta y en el horario establecido para ello (horario publicado en las puertas de acceso al interlaboratorio) y anotándose en la bitácora correspondiente. El material incubado o guardado para lectura que no sea revisado por el alumno será desechado a los 3 días de haber realizado la practica (salvo casos específicos), el equipo que no realice lectura será anotado en la bitácora para la sanción correspondiente.
24. Queda estrictamente prohibido el paso al interlaboratorio para cualquier alumno o persona ajena al área, sin autorización.
25. Queda prohibido que los alumnos se queden con laminillas de tinciones o frotis hechos en el laboratorio o cualquier material biológico.
26. Se deberá reportar al profesor responsable cualquier accidente/incidente por pequeño que sea.
27. En caso de romper algún material con contenido biológico el alumno deberá avisar inmediatamente al profesor y al personal de interlaboratorio, para llevar a cabo la contención correspondiente (inactivación con cloro por 15 minutos y limpieza).
28. El alumno deberá desocupar totalmente el laboratorio de preferencia 5 minutos antes de que concluya el horario asignado, con la finalidad de permitir la ventilación adecuada del mismo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	13 de 187

29. Al término de la práctica, al abandonar el profesor el laboratorio, ningún alumno podrá permanecer en el interior de este.
30. Cada reporte de practica deberá incluir el código generado en la evaluación de la actividad de laboratorio, mediante el sistema de gestión de calidad, el cual debe generarse máximo a los 4 días de haber realizado la práctica y será responsabilidad del jefe de mesa y de grupo vaciarlo en la bitácora correspondiente.
31. Cada mesa/equipo de trabajo podrá disponer de una gaveta para el resguardo del material básico (solución desinfectante, toallas desechables, algodón en rollo, marcador indeleble, rollo de masking tape u otro material adicional que se requiera), colocando su propio candado y siendo su responsabilidad desocupar dicha gaveta al finalizar el ciclo escolar, de lo contrario serán abiertas (rompiendo los candados). Queda prohibido utilizar la gaveta para guardar artículos personales de valor u otro material ajeno a las practicas, ya que no tendrán acceso a ella en horario diferente a clase, con la finalidad de no interrumpir las actividades de otros alumnos.
32. Es obligación del alumno realizar disposición de los residuos acorde a lo establecido para para tal fin. Los frotis realizados no deben lavarse si no colocarse en solución inactivadora, lo mismo con asas utilizadas para inocular hongos.
33. Será responsabilidad de todo usuario del laboratorio leer cuidadosamente este reglamento al inicio del semestre e identificar las salidas de emergencia, las zonas de seguridad, los protocolos de emergencia y el manejo de los residuos, para un optimo uso de las instalaciones y recursos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	14 de 187

Manejo de Residuos Biológico – Infecciosos

NOM-087-Ecol-SSA1-2002- Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

OBJETIVOS

- Entender de manera clara las disposiciones generales de la NOM-087-Ecol-SSA1-2002 y su terminología relacionada.
- Enlistar las normas aplicables al trabajo dentro del laboratorio.
- Aplicar las normas vigentes relacionadas al trabajo en el laboratorio.

INTRODUCCIÓN

El trabajo en el laboratorio es un proceso definido que comienza con la planificación cuidadosa de la práctica/experimento a realizar y concluye con el análisis de los resultados y elaboración de conclusiones; en este camino, una parte muy importante son los cuidados que se deben tomar en el laboratorio con todos los residuos producidos durante la parte experimental, así como su disposición final. Para ello, existen Normas Oficiales Mexicanas destinadas a regular el manejo de estos residuos, así como La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, la cual define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas, que representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; mismos que serán manejados en términos de la propia ley, su Reglamento y normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia, correspondiéndole a la citada SEMARNAT su regulación y control.

Tomando en consideración la NOM-087-Ecol-SSA1-2002- referente a la Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Es pertinente tener en cuenta los siguientes conceptos:

Agente biológico-infeccioso: cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	15 de 187

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

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

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

Cepa: cultivo de microorganismos procedente de un aislamiento.

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

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

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

Sangre: el tejido hemático con todos sus elementos.

Separación: segregación de las sustancias, materiales y residuos peligrosos de iguales características cuando presentan un riesgo.

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

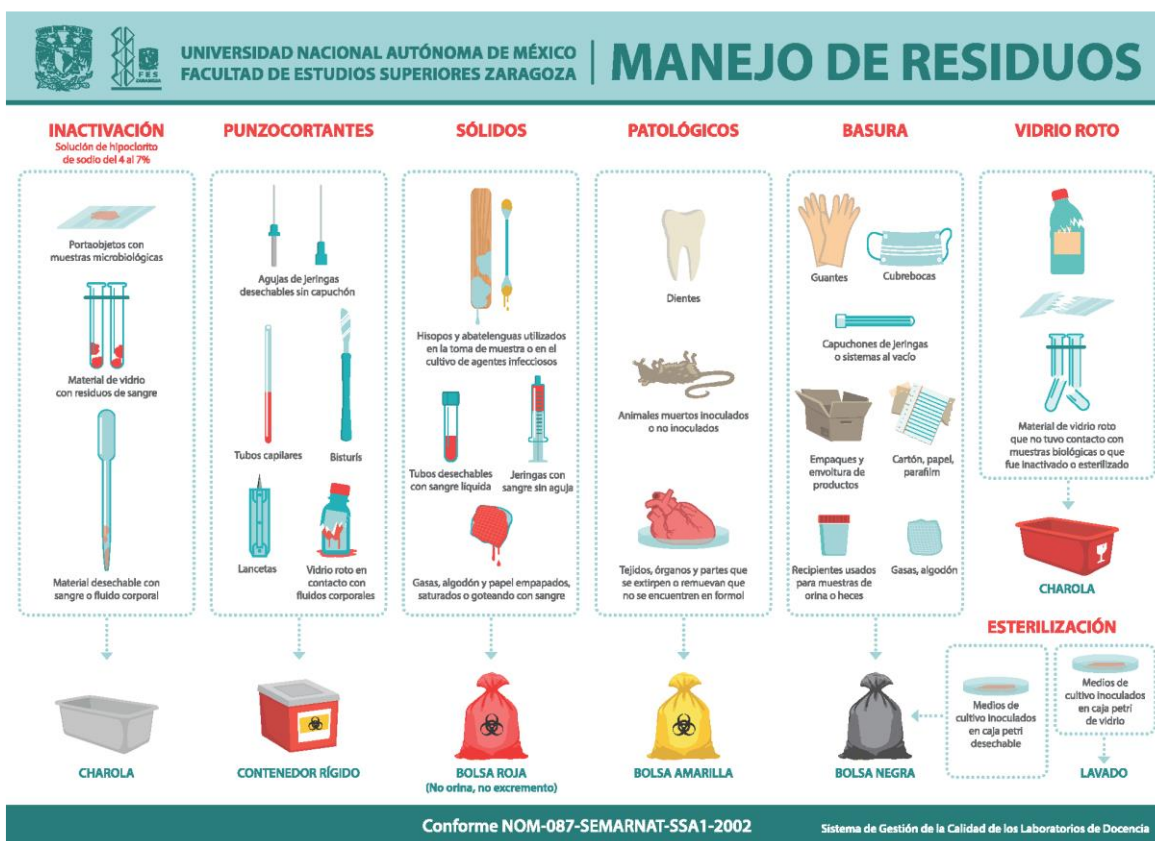


MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE PRIMER AÑO

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	16 de 187

La NOM-087-Ecol-SSA1-2002, establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infeccioso, así como las especificaciones para su manejo. Esta NOM es de observancia obligatoria para los establecimientos que generen residuos biológicos-infecciosos y los prestadores de servicios a terceros que tengan relación directa con los mismos.

Los desechos deberán ser separados de acuerdo con sus características biológicas y estado físico, tal como se muestra en la siguiente tabla:



INACTIVACIÓN DE MUESTRAS

Cuando se carezca de recipientes herméticos y se tengan que desechar tubos con sangre,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	17 de 187

ya sea anticoagulada o coagulada, o bien cuando se trate de otro fluido, estos deberán ser inactivados antes de ser eliminados, para lo cual se utiliza una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, se vierte el contenido del tubo y se deja por unos 30 minutos, transcurrido este tiempo se desecha por el desagüe. Hay que considerar que para evitar que los posibles coágulos tapen la cañería, se debe hacer pasar el contenido inactivado por un colador. El tubo así podrá ser desechada a la basura municipal y los restos de los coágulos serán envueltos en papel periódico y desechados en bolsa roja.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NOM-087-ECOL-SSA1. (2003, 17 de febrero). Norma Oficial Mexicana, NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Diario Oficial de la Federación.

Normatividad

Las normas que rigen el buen funcionamiento del laboratorio de Bioquímica del primer año de la Carrera de Médico Cirujano de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, son:

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA DE PRIMER AÑO

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	18 de 187

Consentimiento informado.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Carrera Médico Cirujano



Título de la Práctica: _____

Alumno responsable de la toma de muestra: _____

Fecha: _____

Antes de aceptar la participación en esta práctica es importante que este usted enterado en qué consistirá su participación y que esta es totalmente voluntaria.

Participarán en esta práctica, todo aquel alumno inscrito oficialmente en el grupo _____ perteneciente al primer año de la carrera Médico Cirujano de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, sin importar sexo, ni edad, que de preferencia se encuentre en ayuno máximo de 6 horas, y que no se encuentre tomando medicamentos que interfieran con la coagulación.

El propósito de la toma de muestra es: que las muestras biológicas obtenidas sean sometidas a pruebas bioquímicas, cultivos microbiológicos, pruebas inmunológicas o cualquier otra prueba especializada que aporte información valiosa, con la finalidad de que los alumnos realicen la interpretación de la misma para el correcto diagnóstico o la evolución de una enfermedad determinada.

La participación de la persona en estudio consistirá en: permitir la toma de una muestra biológica de su organismo. Las muestras biológicas solicitadas son: sangre, exudado faríngeo, orina, heces entre otras. Por lo que la obtención de la misma dependerá de su naturaleza, en todos los casos se efectuará por personal capacitado/supervisado y bajo condiciones de seguridad y de asepsia rigurosa.

Los riesgos de su participación en esta práctica: En el caso de la toma de muestra sanguínea, puede producirse un mínimo hematoma en la zona del pinchazo, por lo que será conveniente que después se realice presión sobre la zona puncionada. En algunos pacientes, por sus características individuales, resulta difícil extraer la muestra de sangre, por lo que tal vez sea preciso puncionarles repetidas veces hasta obtener la muestra de sangre. El resto de las muestras habitualmente recogidas (orina, esputos, exudados, heces) no presentan riesgos.

Los beneficios que obtendrá por participar en el estudio serán: aunque no habrá beneficio directo para el participante, el beneficio se reflejará a nivel grupal pues estará contribuyendo a la enseñanza del componente Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Carrera Médico Cirujano en la que participa como alumno.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	19 de 187

Confidencialidad de los datos: los datos como sexo y edad serán los únicos solicitados en caso de que sean relevantes para la prueba utilizada, mientras la identidad del participante se mantendrá en el anonimato y no será difundida. En caso de que alguna prueba arroje una utilidad diagnóstica para el paciente, se le informará de manera verbal en privado.

Antes de firmar este documento: El participante en el estudio debe estar de acuerdo en participar en el proyecto de investigación, se le deben de haber contestado todas sus preguntas con claridad y debe saber que puede retirarse del estudio en cualquier momento si usted así lo desea.

Antes de firmar este documento: El participante en el estudio debe estar de acuerdo en participar en el proyecto de investigación, se le deben de haber contestado todas sus preguntas con claridad y debe saber que puede retirarse del estudio en cualquier momento si usted así lo desea.

CONSENTIMIENTO

Tras haber recibido información verbal clara y sencilla y leer este escrito explicativo sobre la TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS, he podido hacer preguntas y aclarar mis dudas sobre qué es, cómo se hace, para qué sirve, qué riesgos conlleva y por qué es importante en mi caso. Así, tras haber comprendido la información recibida, doy libremente mi consentimiento para la realización de dicho procedimiento. También se me ha indicado que puedo tener una copia de este documento y que puedo revocar el consentimiento en cualquier momento.

Declaración del paciente o alumna (o).

Yo, _____
_ declaro que es mi decisión participar en la práctica de laboratorio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento de la práctica. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Nombre del alumno (a). Fecha y firma

Nombre del profesor responsable de la práctica Fecha y firma



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	20 de 188

Criterios de Evaluación de la Asignatura Microbiología Laboratorio

Estará apegada en todo momento al Plan de Estudios de la licenciatura de Médico Cirujano 21-94

1. Evaluaciones Parciales (acorde al criterio interno de profesores del grupo), destinadas a evaluar el desempeño (conocimiento adquirido) del alumno en cada práctica, consistiendo de:

- 1) Examen parcial aplicado al inicio de la práctica (70 %) duración máxima 10 minutos.
- 2) Seminario de la Práctica (2º año) o Actividad/Participación (1er Año) (15%)
- 3) Entrega de Reporte de Práctica (15 %)

2. Acreditación/Aprobación por promedio de los exámenes parciales, como un incentivo hacia el alumno, el alumno podrá acreditar/aprobar la asignatura al haber presentado todos los exámenes parciales con calificación aprobatoria mínima de 8 (ocho), cumpliendo con entrega de todos los reportes de práctica del módulo correspondiente, asistencia mínima del 80%. Siendo designada como su calificación final.

3. El estudiante que no cumpla con la acreditación/aprobación por promedio en los exámenes parciales, es decir que tenga una calificación promedio menor a 8 (ocho), no cumpla con el 80% de asistencia, o entrega de reportes o seminarios, deberá presentar el examen ordinario final (1ª vuelta) y esta calificación será designada como su calificación final, es decir sin promediar ni la calificación del seminario o reporte de práctica. El examen incluirá los conceptos teóricos y metodología, resultado e interpretación vistas en la práctica, y será realizado por el profesor designado por el rol interno establecido.

4. En caso de que el estudiante no obtenga calificación mínima aprobatoria 6 (seis) en el examen ordinario final (1ª vuelta), deberá presentar el examen ordinario final 2 (2ª vuelta). Que abarcará la totalidad del programa práctico se llevará a cabo en las fechas designadas por el grupo de profesores acorde al rol. Sólo podrán presentarlo aquellos estudiantes que hayan cumplido con asistencia 80%, entrega de reportes y seminario del módulo correspondiente.

5. Alumno que no obtenga calificación mínima aprobatoria 6 (seis) en el examen 2ª vuelta, presentara examen extraordinario del módulo correspondiente. Acorde a las fechas programadas por la Carrera e incluirá los contenidos teóricos y prácticos del módulo correspondiente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	21 de 187

Observaciones Importantes

- Será motivo de anulación de cualquier examen cuando el estudiante utilice materiales escritos o dispositivos electrónicos o de comunicación como: teléfonos celulares, tabletas, computadoras portátiles, entre otros. Y cuando se le encuentre realizando practicas antiéticas durante el examen. El alumno que incurra en los señalamientos anteriores tendrá que presentar directamente examen extraordinario del módulo correspondiente.
- En todos los casos, la calificación del examen parcial será expresada en la escala de 0 a 10 con un entero y un decimal (si aplica), y deberá ser entregada al profesor correspondiente o asentado en la lista correspondiente a más tardar 7 días posteriores a la aplicación del examen o 5 días previos a la aplicación del examen final correspondiente.
- Importante señalar que en el caso que el alumno no cuente con el 80% de asistencias, se asentará NP en la lista correspondiente, el alumno no tendrá derecho a presentar los exámenes ordinarios de 1ª y 2ª vuelta presentando directamente examen extraordinario.
- En el caso de que el estudiante que aun habiendo acreditado la asignatura (con mínimo de 6) en el examen ordinario final de la 1ª vuelta y decida intentar mejorar su calificación, deberá renunciar a su calificación alcanzada y solicitar presentar examen ordinario final 2 (2ª vuelta). Para ello, deberá presentar dicha solicitud por escrito al profesor correspondiente y entregarlo para la fecha del segundo examen ordinario final.
- La calificación del seminario se asentará en la lista correspondiente después de la presentación del mismo y será el promedio por consenso de todos los profesores del grupo.
- En caso de que el equipo de estudiantes no haya acudido a la lectura de resultados en tiempo especificado para la lectura de pruebas y registrado su asistencia en tiempo y forma en la bitácora, y entregue un reporte se le anulará la calificación del reporte de práctica. Así mismo si entregan resultados apócrifos será motivo de sanción tendrá que presentar directamente examen extraordinario del módulo correspondiente.
- Toda calificación obtenida en cualquiera de los exámenes igual o inferior a 5.9 (cinco puntos nueve) será reprobatoria y se asentará en el Sistema Integral Universitario (SIU) como 5.0 (cinco).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	22 de 187

Rúbrica de evaluación del Reporte de Prácticas de Laboratorio de Microbiología

Parámetro	Excelente	Bueno	Regular	Insuficiente
1. Portada	Institución, Carrera, Disciplina/Materia Título de la práctica, mesa/equipo, Nombre de los Alumnos (en orden alfabético, comenzando por apellidos), Profesor, y Folio de Evalab. 0.5	Faltan solo 2-3 datos de identificación. 0.25	Faltan más de 3 datos de identificación. 0.12	Sin portada 0
2. Objetivos	- Los del manual - Agrega uno nuevo, pertinente, congruente y redactado claramente. 1	Solo copia los del manual. 0.75	Objetivos incompletos. 0.5	Sin objetivos. 0.25
3. Introducción	Información que sustenta teóricamente en forma clara y completa la práctica y cuenta con las citas bibliográficas. 1	Información que sustenta teóricamente en forma clara y completa la práctica, no cuenta con las citas bibliográficas. 0.8	Información que sustenta teóricamente en forma incompleta la práctica, no cuenta con las citas bibliográficas. 0.6	Información que sustenta teóricamente 50 % o menos la práctica, no cuenta con las citas bibliográficas. 0.25
4. Material y métodos	-Material y servicios completos. -El procedimiento está escrito claro y completo. -Los pasos están numerados y en secuencia lógica. -En caso de diagrama de flujo se respeta la secuencia lógica y se hace uso de la simbología correcta. 0.5	-Material y servicios completos. -Mas 50 % del procedimiento está escrito claro y está completo. -Los pasos no están numerados ni en secuencia lógica. -En caso de diagrama de flujo no se respeta la secuencia lógica y se hace uso de la simbología correcta. 0.25	-Material y servicios incompletos. -Menos del 50 % del procedimiento está escrito claro y está completo. -Los pasos no están numerados ni en secuencia lógica. -En caso de diagrama de flujo no se respeta la secuencia lógica y no se hace uso de la simbología correcta. 0.12	No se mencionan el material, servicio, ni procedimiento. 0.6
5. Resultados	-Reportados ordenadamente, describiendo detalladamente lo obtenido haciendo referencia a las tablas, figuras, imágenes o dibujos. - Los resultados registrados en las tablas, figuras, imágenes o dibujos	-Reportados desordenadamente, describiendo más del 50% de los datos obtenidos, haciendo referencia a las tablas, figuras, imágenes o dibujos. - Mas del 50% de los resultados registrados en las tablas, figuras, imágenes o dibujos están numerados	-Reportados desordenadamente, describiendo menos del 50% de los datos obtenidos, no hacen referencia a las tablas, figuras, imágenes o dibujos. - Menos del 50% de los resultados registrados en las tablas, figuras, imágenes o dibujos están numerados	-Reportados desordenadamente e incoherentes. -No hace uso de tablas, figuras, imágenes o dibujos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	23 de 187

	están numerados acorde al orden de aparición, cuentan con pies de figura, con el formato correcto, agrega flechas señalando el dato importante de la imagen.	acorde al orden de aparición, cuentan con pies de figura incompletos, con el formato correcto, cuentan con flechas señalando el dato importante de la imagen.	acorde al orden de aparición, cuentan con pies de figura, con el formato correcto, cuentan con flechas señalando el dato importante de la imagen	
	2	1.8	1.5	0.7
6. Análisis de resultados	Se basa en todos sus resultados y los contrasta con datos teóricos para explicar por qué se obtuvieron los resultados. Da contexto a sus resultados.	Se basa en sus resultados más del 50% de resultados y los contrasta con datos teóricos pero la explicación es incompleta.	Se basa en sus resultados menos del 50% de resultados y no logra contrastar con datos teóricos sin llegar a una explicación de resultados.	No identifica correctamente el resultado y no contrasta con teoría ni hace explicaciones coherentes y congruentes.
	2	1.8	1.5	0.7
7. Conclusiones	Capacidad de síntesis y congruencia al enlazar teoría-práctica con los objetivos.	Capacidad de síntesis y congruencia al enlazar teoría-práctica con solo el 50% de los objetivos.	Capacidad de síntesis y congruencia al enlazar teoría-práctica con menos del 50% de los objetivos.	Sin conclusión coherente ni congruente con los objetivos.
	1.5	1.3	1	0.7
8. Cuestionario	Responde todas las preguntas en forma completa y lo sustenta con información teórico-práctica en forma coherente y referenciada.	Responde el 80 % de las preguntas en forma completa y lo sustenta con información teórico-práctica en forma coherente y referenciada.	Responde el 50 % de las preguntas en forma completa y lo sustenta con información teórico-práctica en forma coherente y referenciada.	Menos del 50 % de las preguntas se responden en forma adecuada, la mayoría no cuenta con sustento claro, congruente y coherente.
9. Referencia Bibliográfica	-Presenta 3 o más referencias de libros pertinentes. -La bibliografía se encuentran numeradas o acorde al orden de aparición o estilo requerido. -Las referencias bibliográficas se encuentran en el formato adecuado (APA, Vancouver, Harvard, etc.), sin mezclar.	-Presenta 2 referencias de libros pertinentes. Mas del 50% bibliografía se encuentran numeradas o acorde al orden de aparición o estilo requerido. -Mas del 50% de las referencias bibliográficas se encuentran en el formato adecuado (APA, Vancouver, Harvard, etc.), sin mezclar.	-Presenta 1 referencias de libros pertinentes. -Menos del 50% bibliografía se encuentran numeradas o acorde al orden de aparición o estilo requerido. -Menos del 50% de las referencias bibliográficas se encuentran en el formato adecuado (APA, Vancouver, Harvard, etc.), sin mezclar.	Sin referencias de libros.
TOTAL	10	8	6	5



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	24 de 187

MÓDULO 1. La Salud de las Personas en sus Entornos.

Descripción y uso del microscopio.

OBJETIVOS

- Conocer los antecedentes históricos del microscopio.
- Identificar las partes fundamentales del microscopio.
- Conocer el manejo del microscopio.
- Observar con el microscopio.
- Revisar los cuidados que se deben tener con el microscopio.
- Identificar los factores que dañan al microscopio.
- Revisar las principales aplicaciones de otro tipo de microscopios.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El descubrimiento del microscopio hacia finales del siglo XVI e inicios del XVIII, que no puede atribuirse con seguridad a un sabio determinado, señala el inicio de la biología moderna. Los grandes microscopistas Leeuwenhoek, Hooke, Swammerdam, etc., impulsaron prodigiosamente nuestros conocimientos y revelaron a los ojos maravillados de sus contemporáneos el universo de lo infinitamente pequeño.

El descubrimiento de los microorganismos se debe, principalmente a Leeuwenhoek, esto abrió a las investigaciones un campo de acción nuevo e insospechado; hizo retroceder las fronteras del mundo viviente hasta los límites extremos de la pequeñez y puso también de manifiesto el infinito poder de expansión de la vida. Del conocimiento de los microorganismos al de sus estructuras sólo había un paso y este se dio. El descubrimiento



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	25 de 187

de la organización y de la universalidad de la célula fueron sus consecuencias lógicas y fecundas.

El descubrimiento del microscopio no ha dirigido a las investigaciones médico/biológicas en un solo sentido; por lo contrario, la ha diversificado y le ha dado acceso a un mundo de seres vivos que nuestros sentidos, abandonados a sus posibilidades naturales, son incapaces de manifestarnos.

CONOCIMIENTO DE LAS PARTES FUNDAMENTALES DEL MICROSCOPIO

Un microscopio simple es un lente de aumento ordinario, con la cual se pueden observar múltiples objetos microscópicos. El microscopio compuesto (de micros: pequeño y scopio: observar), difiere del microscopio simple, en que tiene dos sistemas de lentes, uno conocido como objetivo y el otro como ocular, montados en un tubo o cuerpo del microscopio, la imagen que ve el ojo tiene un aumento igual al producto de la multiplicación de los aumentos de los dos sistemas de lentes.

Las diferentes partes del microscopio pueden clasificarse en cuatro sistemas:

- A. Sistema de soporte
- B. Sistema de aumento
- C. Sistema de iluminación
- D. Sistema de ajuste

A. Sistema de soporte.

El sistema de soporte comprende:

- 1) El pie
- 2) El brazo
- 3) El revólver (porta objetivos)
- 4) La platina
- 5) El carro (no todos los microscopios)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	26 de 187

B. Sistema de aumento.

Se constituye por una combinación de lentes; el tubo, el ocular y los objetivos. Los lentes del microscopio están fijados en dos conjuntos, cada uno de la extremidad de un tubo largo. El primer conjunto de lentes abajo del tubo y arriba de la preparación a examinar es el lente objetivo. El segundo conjunto de lentes está en lo alto del tubo, donde se colocan los ojos, son los lentes oculares. Los microscopios binoculares (dos oculares) permiten exámenes prolongados sin fatigar la vista una iluminación eléctrica es muy indispensable para utilizar el objetivo de inmersión.

- a) *Los Objetivos.* Son el elemento óptico que recoge la luz del objeto observado y enfoca la luz para lograr producir una imagen real. El coeficiente de aumento de un lente se indica por medio de un número que se encuentra grabado en su tubo, además de tener en la circunferencia del tubo cercano una banda de algún color y nos indica poder de aumento que tiene. Donde le objetivo 5x aumenta 5 veces (tiene una banda color Rojo), el objetivo 10x aumenta 10 veces (tiene una banda color Amarillo), el objetivo 40x aumenta 40 veces (tiene una banda color Azul) y el objetivo 100x aumenta 100 veces (tiene una banda color Blanco y es el único objetivo donde se utiliza el aceite de inmersión).
- b) *Distancia frontal útil de objetivo.* Es la distancia frontal que separa el objetivo de la preparación a examinar cuando se tiene una imagen nítida. Entre más largo es la lente objetiva distancia frontal disminuye.

Objetivo 5x... distancia frontal= 20-25 mm

Objetivo 10x... distancia frontal= 5-6 mm

Objetivo 40x... distancia frontal= 0.51.5mm

Objetivo 100x ... distancia frontal= 0.15-0.20mm



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	27 de 187

c) *Poder de resolución.* Es la capacidad de observar lomas pequeño. Mientras que el poder de resolución del ojo humano es de 0.25 mm, el poder de resolución máximo de un microscopio es de 0.25 micras. Por lo tanto, mientras el poder de resolución del objetivo sea mayor, más nítida se vera la imagen; por lo tanto pueden verse dos puntos separados por distancias mínimas.

d) *Los lentes oculares.* El aumento está indicado sobre las lentes oculares. Un aumento de 10x aumenta 10 veces la imagen producida por el lente objetivo. Para conocer el aumento del objeto observado, basta multiplicar el aumento de la lente objetiva por el aumento de la lente ocular. Los microscopios utilizados en el laboratorio médico generalmente aumentan 50 a 1000 veces las imágenes. Hoy en día también se les puede nombrar a los objetivos como sigue: al de 5x lupa, al de 10x seco débil, al objetivo de 40x seco fuerte y al de 100x inmersión.

	OCULAR R	OBJETIVO O	AMPLIFICACIÓN N	DIÁMETRO O CAMPO
SECO DÉBIL	10x	10x	100x	1500 micras
SECO FUERTE	10x	40x	400x	900 micras
INMERSIÓN EN ACEITE	10x	100x	1000x	120 micras



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	28 de 187

C. Sistema de iluminación.

- a) *La fuente luminosa.* De preferencia iluminación eléctrica, para compartir un manejo más fácil. Está compuesta por una lámpara integrada al microscopio debajo de la platina.
- b) *El condensador.* Sirve para concentrar los rayos luminosos, y dirigirlos hacia la preparación a examinar. El condensador está situado entre la fuente luminosa y la platina. Puede aumentarse luminosidad máxima o bajarse luminosidad mínima.
- c) *El diafragma.* Sirve para disminuir o aumentar la cantidad de luz que pasa en el condensador. Es un obturador cuya apertura tiene un diámetro variable. Está colocado en el condensador.

D. Sistema de ajuste

El sistema de ajuste está integrado por:

- a) *Tornillo micrométrico.* Tornillo de enfoque rápido. Es el tornillo más rápido y se utiliza primero.
- b) *Tornillo micrométrico.* Tornillo de enfoque fino. Cuenta con un desplazamiento muy lento. Permite enfocar después del ajuste aproximado obtenido con el tornillo de enfoque rápido.
- c) *Tornillo de carro móvil.* Sirven para desplazar la laminilla sobre la platina. Un tornillo para desplazar hacia atrás a un tornillo para desplazar de izquierda a derecha.

MANEJO DEL MICROSCOPIO

Una buena observación a través del microscopio requiere paciencia poniendo cuidado en los detalles; para un óptimo manejo del microscopio se deberán tomar en cuenta las



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	29 de 187

siguientes recomendaciones, ya que el esfuerzo excesivo y la fatiga deben evitarse. Por ello, se recomienda:

- A. Transportar el microscopio con ambas manos una sujetando la base y la otra el brazo, colocándolo en una superficie plana y lejos de las orillas; para moverlo deberán tomarlo de la misma manera y nunca arrastrarlo.
- B. El banco y la mesa deben estar a una altura que le permita al observador el uso del microscopio en posición vertical (sin estar encorvado o agachado), pues la observación a través del microscopio debe realizarse sentado de preferencia.
- C. Al utilizar el microscopio, el ocular y las lentes objetivas deben estar limpias, la limpieza de las mismas se hará usando solo papel para este propósito (papel seda), no se debe extraer el ocular o desarmar los objetivos.
- D. Encender la fuente de iluminación al mínimo (después regularla) para evitar una fatiga visual.
- E. Montar la preparación que se va a observar, la identificación de dicha preparación suele ir hacia arriba y del lado derecho.
- F. *Separar los binoculares.* En los microscopios binoculares se ajusta la separación interpupilar y se adapta a cada conformación. Enfoque entre el ojo izquierdo y derecho. Los dos tubos porta oculares son susceptibles de ajustarse. Esto se logra tratando de enfocar la imagen, con el tornillo macrométrico y micrométrico, con el lente objetivo de menor aumento, si la imagen no es clara subir o bajar el ocular, mediante el movimiento que rodea al tubo porta ocular, hasta que se vea nítido y el microscopio que de ajustado a su propia visión binocular. Observar con un solo ojo cansará la vista rápidamente y no permitirá una adecuada distinción de estructuras, por lo que requiere tiempo adaptarse a ambos ojos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	30 de 187

- G. *Enfoque de imágenes.* Para enfocar con cualquier objetivo (especialmente con el seco fuerte 40x y con el de inmersión 100x) deberá acercarse el objetivo a la preparación observando de lado para controlar el descenso hasta que la lente frontal de dicho objetivo que de dentro de la distancia focal, esto es conocido como *Enfoque grueso* y se realiza con el tornillo macrométrico. Posteriormente se deberá mirar por el ocular alejando lentamente el objetivo hasta el enfoque correcto, que se afinará con movimiento cuidadosos del tornillo de enfoque lento, esto es conocido como *Enfoque fino* y se realiza con el tornillo micrométrico.
- H. *Para el enfoque con el objetivo de inmersión 100x.* Colocar la laminilla perfectamente seca y observar a 40x para centrar el campo que se desea observar, posteriormente mover los objetivos de tal forma que queden entre el de 40x y 100x. Agregar solo una gota de aceite de inmersión sobre la región de la preparación a examinar. Mover los objetivos hasta que el de 100x quede en posición correcta, luego con ayuda del tornillo macrométrico acercar el objetivo 100x hasta que quede lo más cerca posible del aceite sin llegar a romperse, para ello se puede observar de lado hasta que el aceite toque por capilaridad el objetivo. Observar por el ocular, mover lentamente el tornillo micrométrico hasta que se vea la imagen. Una vez observado con aceite de inmersión NO se puede cambiar (regresar) a otro objetivo hasta limpiar completamente la preparación y el objetivo.
- I. *Cambio de objetivos.* Los microscopios modernos son fabricados de tal manera que se puede pasar de un objetivo a otro para ver el mismo objeto más grande. El enfoque para la nitidez de la imagen queda casi hecho.
- J. Al terminar sus observaciones los alumnos deberán limpiar nuevamente los objetivos y las preparaciones, mediante papel seda y a toques (sin frotar).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	31 de 187

PRECAUCIONES GENERALES DEL MICROSCOPIO

- A. NUNCA lavar las lentes oculares y de los objetivos con alcohol.
- B. NUNCA mojar los objetivos en xilol o alcohol.
- C. NUNCA utilizar papel ordinario o algodón para limpiar las lentes.

- D. NUNCA ponga los dedos sobre los objetivos.
- E. NUNCA limpie el soporte y la platina con xilol o sustancias corrosivas.
- F. NUNCA limpie las lentes interiores de los oculares y objetivos con tela o papel (solo pincel de pelos finos).
- G. NUNCA deje el microscopio sin sus oculares.
- H. NUNCA guarde el microscopio con aceite inmersión en los objetivos de 100x
- I. NUNCA transporte el microscopio con una sola mano.
- J. NUNCA lo deje sin algo que lo cubra totalmente del polvo.
- K. NUNCA deje prendida la lampara del microscopio cuando nadie lo esté usando

MATERIAL Y REACTIVOS

- Microscopio óptico.
- Frotis preparado de bacterias.
- Frotis preparado de hongos.
- Frotis preparado de sangre.
- Preparación de letras.
- Papel seda.

SERVICIOS

- Agua y Luz.

PROCEDIMIENTO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	32 de 187

1. El profesor realizará la demostración del manejo y uso del microscopio con una de las preparaciones.
2. Los alumnos enfocaran las preparaciones proporcionadas enfocarlas con los diferentes objetivos (5x, 10x, 40x).
3. Los alumnos con la supervisión del profesor utilizaran el aceite de inmersión en el objetivo 100x, solamente el frotis preparado de bacterias.
4. Los alumnos con la supervisión del profesor realizaran el aseo del objetivo de inmersión y la laminilla, utilizando el papel seda.
5. Se registrarán las imágenes observadas de las diversas muestras y objetivos.

RESULTADOS.

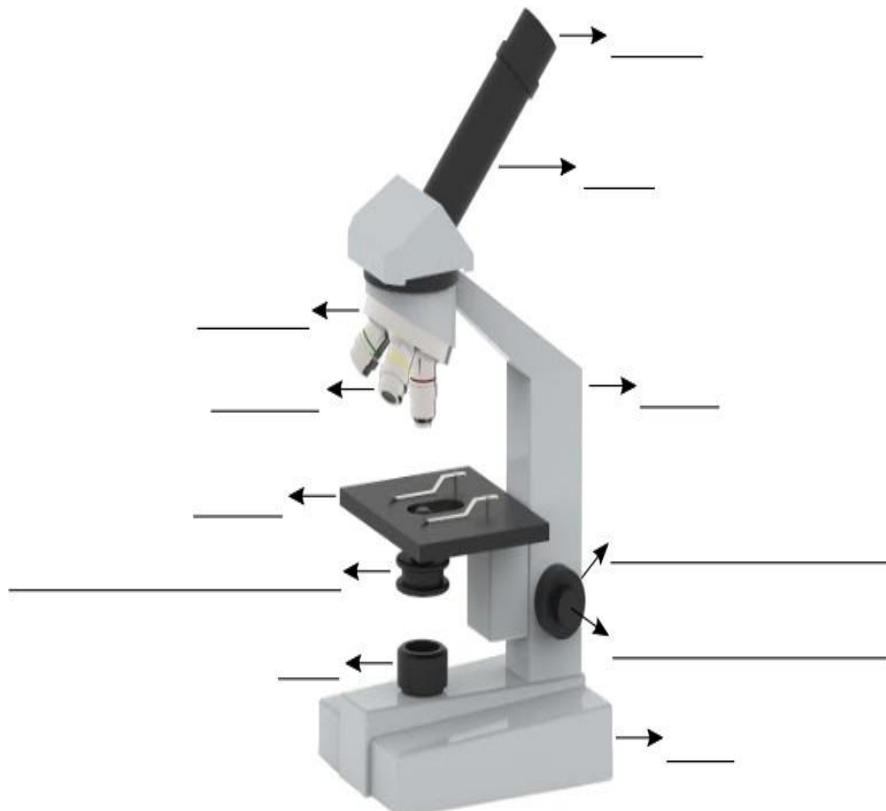
Observar cada preparación al microscopio y describir los resultados.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Mencione 3 microscopistas importantes en la evolución del microscopio y su obra?
- 2) ¿Cuál es la aplicación clínica del microscopio?
- 3) ¿Menciones 5 factores que dañan al microscopio y 5 cuidados?
- 4) ¿Mencione 5 tipos de microscopio y su funcionamiento?
- 5) ¿Qué significa microscopio simple y compuesto?
- 6) ¿Qué es poder resolución?
- 7) Defina distancia frontal mínima o útil.
- 8) Señale las partes del microscopio en la siguiente figura.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	33 de 187



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). Mc GrawHill.

MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (3ª ed.). Editorial Médica Panamericana.

Ryan, K. J., y Ray, C. G. (2017). Sherris Microbiología Médica (6ª ed.). McGraw Hill.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	34 de 187

Tinciones simples.

OBJETIVOS

- Conocer diversas técnicas de coloración.
- Observar diferentes preparaciones a diferentes objetivos.
- Conocer la forma y estructura de una bacteria.
- Realizar un frotis con tinción en una bacteria.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los colorantes se combinan químicamente con el protoplasma bacteriano: Si la célula no ha muerto, el proceso mismo de la tinción la mata. El método, por consiguiente, es bastante severo y pueden producir artefactos.

Los colorantes más comúnmente usados son las sales. Los básicos consisten en un catión coloreado, unido a un anión incoloro, (ejemplo, clorhidrato de azul de metileno). Los ácidos constituyen exactamente lo contrario, (ejemplo, eosinato de sodio).

Las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos, los cuales portan cargas negativas en forma de grupos fosfato, éstos se combinan con los colorantes básicos cargados positivamente, lo cual les hace ser de los más usados en citología bacteriana. Los colorantes ácidos no tiñen a la célula bacteriana y, por lo tanto, pueden ser usados para impartir al fondo un color de contraste.

Los colorantes básicos tiñen las células bacterianas uniformemente, a menos que previamente sea destruido el RNA del citoplasma. Sin embargo, se pueden usar técnicas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	35 de 187

especiales para diferenciar flagelos, cápsulas, paredes celulares, membranas celulares, gránulos, núcleos y esporas, como se podrá observar en prácticas más adelante.

Para observar los microorganismos al microscopio empleamos técnicas de coloración para observarlos mejor o hacer estudios más detallados de los mismos. Las técnicas de coloración las podemos dividir de una manera general en dos grupos principales, que son:

- a) *Técnicas de coloración simples.* Se da el nombre de técnica de coloración simple a aquellas en donde se emplea un solo colorante para teñir, ejemplo azul de metileno, safranina, verde de malaquita, etc.
- b) *Las técnicas de coloración especial o diferentes.* Se da el nombre de técnica de coloración especial o compuesta en las que se usan combinaciones de dos o más colorantes, ejemplo Gram, Ziehl-Neelsen, Giemsa, etc.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Microscopio óptico.
- Papel seda.
- Porta y cubre objetos.
- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Colorantes: Azul de metileno de Loeffler, KOH al 10 %, Rojo Congo, Verde de malaquita.

CEPAS

- *Sacharomyces cerevisiae.*
- *Bacillus subtilis.*
- *Staphylococcus aureus.*
- *Streptococcus mutans.*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	36 de 187

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Generar zona aséptica acuerdo a las indicaciones del profesor de mesa.
2. El profesor de mesa realizara una demostración del manejo del asa bacteriológica, el manejo de los tubos con cepas y como tomar un inculo utilizando la técnica aséptica.
3. Los alumnos realizarán 4 frotis para cada cepa, para ello se coloca una gota de agua sobre un portaobjetos limpio, con el asa se toma una muestra del cultivo de una de las cepas.
4. Esta muestra se coloca sobre el portaobjetos, emulsionar sobre la gota de agua.
5. Fijar la muestra al calor.
6. Secar al aire.
7. La coloración se efectúa agregando una gota del colorante, dejar 2-3 minutos.
8. Lavar con agua (chorro leve y no directo sobre la muestra).
9. Secar y observar al microscopio con el objetivo adecuado para cada muestra.
10. Efectuar la tinción con cada colorante para cada una de las bacterias.
11. Reportar las diferencias morfológicas observadas y efectuar esquemas.
12. El asa bacteriológica deberá ser esterilizada al calor antes y después de cada paso.

RESULTADOS

Observar cada preparación al microscopio y describir los resultados en un cuadro comparativo.

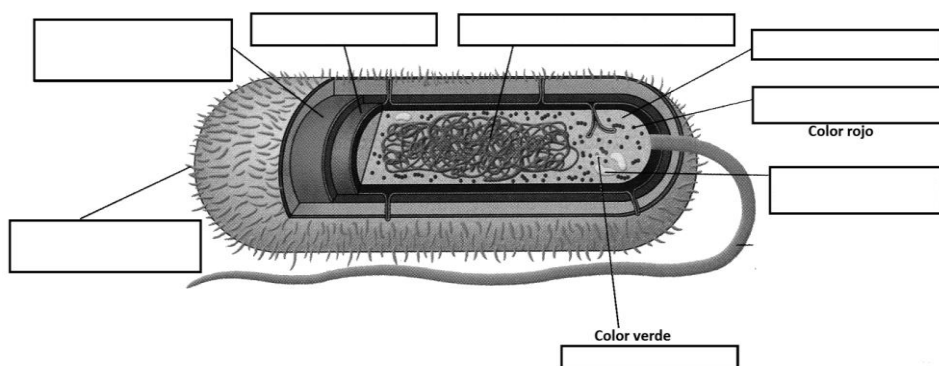
CUESTIONARIO

- 1) Definir colorante.
- 2) Enuncie que son las tinciones simples y especiales y diferencias entre las dos.
- 3) ¿Cuál es el tamaño promedio de las bacterias?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	37 de 187

- 4) ¿Qué ventajas se tienen en una preparación entre porta y cubreobjetos y que desventajas?
- 5) ¿En qué consiste un colorante básico y un colorante ácido?
- 6) ¿Cuál es la importancia de las técnicas de coloración?
- 7) Enuncie tres bacilos patógenos para el humano.
- 8) Enuncia los componentes de la siguiente bacteria en toda su estructura.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.
- MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (3ª ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Riedel, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., y Miller, S. (2020). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (28ª ed.). McGrawHill Interamericana.
- Ryan, K. J., y Ray, C. G. (2017). Sherris Microbiología Médica. (6ª ed.) McGraw Hill.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., y Case, C. L. (2017). Introducción a la microbiología. (12ª ed.). Editorial Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	38 de 187

Tinción de Gram y Ziehl-Neelsen.

OBJETIVOS

- Reconocer la importancia bacteriológica y médica de la tinción de Gram y Ziehl-Neelsen.
- Aplicar en la práctica las tinciones mencionadas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En su estado natural los microorganismos unicelulares como las bacterias, bajo el microscopio se presentan como pequeñas esferas incoloras, circulares, en forma de bastoncillos, espirales, difíciles de observar netamente. Para verlas con nitidez y estudiarlas bien debemos teñirla, una coloración simple (azul de metileno), muestra muy bien la forma y dimensión de los organismos, pero hay otros métodos que dan más información. Entre las tinciones diferenciales; la tinción de Gram y la tinción para microorganismos ácido-resistentes, son las más utilizadas.

El método generalmente utilizado para identificar bacterias fue creado por el científico danés Hans Christian Joachim Gram, en 1884. Este es un método de tinción diferencial en el cual se utilizan varios colorantes, que nos permiten dividir a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas.

El método de Gram nos permite clasificar a las bacterias en dos clases:

- a. Los llamados organismos *Gram positivos*, que conservan el color morado de la sustancia violeta de genciana.
- b. Los llamados organismos *Gram negativos*, que pierden el color morado de la violeta de genciana cuando se lava el frotis con alcohol o cetona, y por lo tanto se colorean sólo por contraste.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	39 de 187

Cuando este proceso de tinción se realiza adecuadamente los organismos Gram positivos tienen coloración morada y los Gram negativos coloración de contraste es decir rojo o rosa.

Tinción de Gram

En la primera parte de la tinción, esta se baña con cristal violeta (denominando colorante primario), quedando todas las bacterias teñidas de color morado intenso. Después de un breve lapso, se lava y se le cubre con yodo, un mordiente. Cuando se lava el yodo, tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas aparecen de color violeta oscuro o púrpura. Al cubrirse posteriormente con una mezcla de alcohol y acetona (solución decolorante), algunas bacterias conservan dicha coloración, mientras que otras se decoloran y la pierden totalmente.

En la segunda parte de la tinción se hace actuar un colorante básico de contraste, la safranina, para teñir a las bacterias gramnegativas que se verán de color rosa. Las que conservan la coloración morada se denominan Gram positivas, y las que la pierden Gram negativas.

Pero si el alcohol se le permite actuar durante largo rato, los organismos Gram positivos pueden teñirse también, de manera que después que la tinción se completa, aparecerán como gramnegativos. Por otra parte, si la coloración no se lleva a cabo durante tiempo suficiente, los organismos Gram negativos, pueden aparecer como Gram positivos.

Las condiciones de cultivo pueden afectar *la coloración de Gram*, por ejemplo, en medio ácido casi todos los tipos de bacterias, tienden a ser Gram negativas. También en frotis de cultivos viejos de organismos Gram positivos vemos a menudo células que aparecen Gram negativas. Estas células representan formas degeneradas, que no retuvieron intactos sus componentes estructurales originales. Sin embargo, en cultivos jóvenes todas las células de cualquier tipo de bacterias ordinariamente reaccionan del mismo modo a la coloración de Gram, y la mayoría de las especies se podrá clasificar en una forma definitiva como Gram positivas o Gram negativas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	40 de 187

Mecanismo de coloración de Gram: diferencias entre bacterias gran positivas y gran negativas.

El mecanismo de la coloración de Gram, ha sido extensamente estudiado. Se sabe que la capacidad de los organismos grampositivos para retener el color del cristal violeta, durante una breve exposición al alcohol o acetona, depende de la integridad estructural de las células bacterianas.

En las bacterias grampositivas se puede formar, dentro de las células tratadas con yodo, un complejo, magnesio-ribonucleico-proteína carbohidrato, no presente en las gramnegativas. El colorante cristal violeta y el yodo, parece que forman un complejo con el material ribonucleico resistente al alcohol.

Lo más reciente señala como el factor determinante a las paredes celulares de los organismos gramnegativos, dichas paredes son relativamente delgadas y contienen abundante material graso, quizá diez veces más de lípidos que en las paredes de las células grampositivas.

Se ha supuesto que la permeabilidad de las paredes celulares de los organismos grampositivos puede disminuirse por efecto de la deshidratación al entrar en contacto con alcohol, el alcohol puede aumentar la permeabilidad de los gram negativos por la extracción de los lípidos de la pared celular, hecho que permite el escape rápido del complejo yodo-cristal violeta.

No debemos olvidar que los términos gram positivos y gram negativos, solo aluden a este método de coloración, y que en cada clase encuentran microorganismos de distintos tipos, patógenos y no patógenos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	41 de 187

Sin embargo, hay propiedades que solo comparten los organismos gramnegativos y que difieren de las especies grampositivas.

Algunas bacterias más comunes según su reacción con colorante de Gram, se enumeran en el siguiente esquema.

GRAM-POSITIVAS	GRAM-NEGATIVAS
<ul style="list-style-type: none">• Todos los miembros comunes de los géneros <i>Bacillus</i> incluyendo, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus anthracis</i>.• Todos los miembros del género <i>Clostridium</i>, incluyendo, <i>Clostridium tetani</i>, <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium botulinum</i>.• Todos los estreptococos.• Todos los micrococcos, y estafilococos.• Neumococos y Enterococos.• <i>Corynebacterium diphtheriae</i> y <i>difteroides</i> relacionados.• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y especies relacionadas.• Levaduras.	<ul style="list-style-type: none">• Todos los bacilos intestinales del grupo tifoidea-disentería-paratifoidea (enterobacteriaceae), incluyendo, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Shigella dysenteriae</i>, <i>Escherichia coli</i>.• <i>Vibrio cholerae</i>.• Todos los del género <i>Neisseria</i> y <i>Moraxella</i>.• Todas las brucelas, incluyendo <i>Brucella abortus</i>.• Todos los del género <i>Haemophilus</i> y <i>Bordetella</i>.• Todos los del género <i>Pasteurella</i> y <i>Yersinia</i>.

Método de coloración Ácido – Resistente (técnica de Ziehl-Neelsen).

Existe un importante número de bacterias que se distingue de las otras por el hecho de teñirse con dificultad, pero una vez coloreadas con un tinte fuerte, resisten la acción



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	42 de 187

decolorante de los ácidos. Por esto se dice que toman un tinte acidorresistente. No sueltan el colorante cuando el portaobjetos se sumerge en alcohol, como sucede con la mayoría de las bacterias.

Estas bacterias atípicas en términos de tinción, como las micobacterias, que constituyen un grupo de importancia médica. El diagnóstico se ve influido por dos características: la lentitud de su crecimiento y el alto contenido de lípidos en su pared. Los gérmenes de la tuberculosis y otros miembros del género *Mycobacterium*, son acidorresistentes, y esta es una de sus características más sobresaliente.

El método más utilizado para demostrar las propiedades de tinción acidorresistente de un organismo es la técnica de Ziehl-Neelsen. Para la tinción de Ziehl-Neelsen se prepara un frotis. En la primera parte se baña con rojo carbolfucsina, se calienta suavemente el portaobjetos durante algunos minutos. Los elementos de la preparación quedan teñidos de color rojo de las bacterias no acido-alcohol-resistentes y las micobacterias conservan el color rojo. En la segunda parte se hace actuar el azul de metileno, que contrasta los elementos no acido-alcohol-resistentes. Las bacterias se observan teñidas de rojo intenso contra un fondo azul.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Microscopio óptico.
- Papel seda.
- Porta y cubre objetos.
- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Tripie.
- Pinzas de disección.
- Colorantes: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Alcohol ácido, Safranina, Fucsina de Ziehl y Azul de metileno.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	43 de 187

CEPAS

- *Bacillus subtilis*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Serratia marcescens*.
- *Mycobacterium phlei*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Técnica de coloración de Gram.

1. Generar zona aséptica y tener precaución de esterilizar el asa y boca de tubos, antes y después de cada paso.
2. Preparar un frotis con cada una de las cepas, fijando al calor.
3. Cubrir la preparación con cristal violeta durante un minuto.
4. Lavar con agua, a chorro indirecto.
5. Cubrir con Lugol, durante un minuto.
6. Lavar con agua, a chorro indirecto.
7. Cubrir con alcohol-acetona, durante 30 segundos.
8. Lavar con agua, a chorro indirecto.
9. Cubrir con safranina durante 30 segundos a 1 minuto.
10. Lavar con agua, a chorro indirecto y dejar secar al aire.
11. Observar al microscopio a 4x, 10x y 40x. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos)

B. Técnica de coloración de Ziehl – Neelsen.

1. Generar zona aséptica y tener precaución de esterilizar el asa y boca de tubos, antes y después de cada paso.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	44 de 187

2. Preparar un frotis con cultivo de *Mycobacterium phlei*.
3. Cubrirlo con Fucsina de Ziehl y dejar reposar durante 30 segundos.
4. Colocar en el tripie y la rejilla de asbesto, un vaso de precipitados con agua y calentar hasta que hierva, colocar la preparación con cuidado encima del vaso de precipitado hasta la emisión de vapores durante 4-6 minutos.
5. Cuidar que el colorante no se seque, y no hierva, agregando más colorante.
6. Dejar enfriar y lavar con agua a chorro indirecto.
7. Decolorar con Alcohol Ácido.
8. Lavar con agua a chorro indirecto.
9. Cubrir la preparación con azul de metileno, durante 1-3 minutos.
10. Lavar con agua a chorro indirecto, dejar secar.
11. Observar al microscopio a 4x, 10x y 40x. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos)

RESULTADOS

Anotar los resultados de la práctica, llenando el cuadro siguiente y efectuando dibujos.

MICROORGANISMO	MORFOLOGÍA	COLOR	TIPO DE GRAM
<i>Bacillus subtilis</i>			
<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Serratia marcescens</i>			
<i>Proteus vulgaris</i>			
<i>Mycobacterium</i>			



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	45 de 187

CUESTIONARIO

- 1) ¿A qué se llama microorganismos ácido-resistentes?
- 2) ¿Qué papel desempeña la pared celular en la tinción de Gram?
- 3) ¿Qué papel tiene el colorante secundario en la tinción de Gram?
- 4) ¿Qué factores pueden variar la tinción de Gram?
- 5) ¿Qué importancia tiene la tinción de Gram?
- 6) Mencione 3 nombres de bacterias que sean acidorresistentes.
- 7) Defina los términos Gram-positivo y Gram-negativo.
- 8) Enumerar algunos tipos de bacterias gram-positivas y gram-negativas.
- 9) ¿Qué es un mordiente y cuál se utiliza en la tinción de Gram?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.
- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12ª ed.). Editorial Panamericana.
- Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., McKerrow, J. H., y Sakanari, J. A. (2016). Microbiología médica de Jawetz, Melnick & Adelberg (27ª ed.). McGrawHill.
- Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelin, D., Williams, R., y Clark, B. (1999). Microbiología Médica (2ª ed.). Elsevier.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). Microbiología médica (9ª ed.). Elsevier.
- Ordoñez Smith de Danies, M. (2014). Guías prácticas para los laboratorios de Bacteriología clínica. Editorial Médica Panamericana.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A. (2009). Microbiología (3a ed.). McGraw Hill Interamericana.
- Vullo, D. L., Wachsmann, M. B., y Alché, L. B. (2000). Microbiología en práctica: manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica y aplicada. (1ª ed.). Editorial Atlante.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	46 de 187

Medios de cultivo y técnicas de aislamiento de bacterias.

OBJETIVO

- Conocer y realizar los diferentes métodos de aislamiento de microorganismos a partir de diferentes tipos de medios de cultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las distintas mezclas de sustancias nutritivas empleadas en el laboratorio para facilitar el crecimiento (y así un mejor estudio) de microorganismos se denominan genéricamente medios de cultivo. La introducción de medios sólidos por Koch constituyó un avance muy importante. Al principio las sustancias utilizadas daban resultados muy pobres, por ejemplo la superficie de patatas cortadas que favorecían el crecimiento confluyente, la gelatina que conservaba su consistencia sólida sólo a temperaturas relativamente bajas, y muchos organismos eran capaces de liquenizarla.

El mundo de los microbiólogos está en deuda con Frau Hesse, esposa de un médico alemán aficionado a la bacteriología, puesto que introdujo el agar, producto japonés de utilidad doméstica que se emplea para espesar las sopas.

El agar es el polisacárido ácido derivado de ciertas algas marinas y que consta principalmente de galactosa, con un derivado de sulfato. No es tóxico para las bacterias y proporciona una superficie suficientemente húmeda como para facilitar el crecimiento y lo bastante seca para mantener separadas las colonias.

Las bacterias, los hongos, levaduras y muchos protozoarios pueden desarrollarse en medios de cultivo inertes; mientras que los virus y las rickettsias, no se reproducen en



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	47 de 187

cultivos a menos que tengan células de tejidos vivos, como en el cultivo en tubo de ensayo con células de riñón de mono o con células de cáncer humano.

Al principio, la mayoría de los medios de cultivo utilizados en bacteriología y micología eran mezclas preparadas empíricamente de las cuales no se tenía el conocimiento exacto de su composición o de un valor nutritivo. Sin embargo, los medios de cultivo artificiales, de composición química definida y reproducible, han aumentado con el fin de resolver problemas especiales en la investigación y en microbiología industrial. Cada investigador es libre para idear sus medios, de acuerdo con lo que se propone estudiar.

Los medios de cultivo se pueden dividir según su consistencia en tres grupos principales.

- a) Medios líquidos
- b) Medios sólidos
- c) Medios semisólidos

A) Medios líquidos, aquellos que permiten el estudio del crecimiento bacteriano en términos de masa celular, con cambios que sufren estos medios es su color, turbidez, a simple vista, la forma de efectuar la siembra en el caldo mediante “agitación” de asa dentro de él y en ellos se suele estudiar las curvas de crecimiento bacteriano “ideal”.

B) Medios sólidos, permiten el aislamiento, la identificación y la diferenciación de los microorganismos, es el tipo de medio más empleado en cualquier laboratorio con fines muy variados, por las características tanto en su contenido, por manejo, como por la facilidad de efectuar en ellos la morfología colonial.

C) Medios semisólidos, es un tipo de medio que se emplea para conservar por largos periodos de tiempo a las cepas en ellos depositadas. También son muy importantes para observar la movilidad.

En cuanto a su composición química y sus usos se pueden dividir en varios e importantes grupos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	48 de 187

-Medios simples.

Un ejemplo es el Agar simple, este medio de agar se maneja fácilmente en estado líquido, también puede permitirse que solidifique en tubos de ensayo mantenidos en posición casi horizontal, formando así una superficie inclinada extensa para poder sembrar y se llama agar inclinado o de tope inclinado. Los medios simples se utilizan muy frecuentemente y universalmente para cultivos en placa en cajas de Petri. Los más empleados son el agar nutritivo y caldo nutritivo.

-Medios especiales o enriquecidos.

Ejemplos de los medios de especiales o enriquecidos son los que se hacen con suero sanguíneo coagulado (como el medio de suero de Loeffler para bacilos difteroides), o mezclas coaguladas de glicerina y huevo (medio de Lowenstein-Jensen, para bacilos de tuberculosis). Y los que se preparan enriqueciendo caldo o agar simples con la adición de carbohidratos, sangre (agar sangre), suero sanguíneo, caseína digerida, extracto de levadura u otra sustancia nutritiva especial.

-Medios diferenciales y selectivos.

Para el cultivo primario los bacteriólogos a veces utilizan un medio preparado de modo que ponga de manifiesto las diferencias, cuando se inicia el desarrollo, entre aquellos organismos que queremos estudiar y otros gérmenes que puede haber.

Un ejemplo de medio diferencial es el agar con eosina azul de metileno (EMB). Si inoculamos este medio con las heces de un enfermo de fiebre tifoidea, podremos diferenciar colonias de bacilos de tifoidea de otros gérmenes no patógenos del colon normal. Pues estos últimos fermentan la lactosa con la formación de ácido y sus colonias adquieren un color púrpura brillante, debido a su reacción con el colorante que actúa como indicador. Los gérmenes de la tifoidea no fermentan este azúcar y por tal motivo las colonias permanecen incoloras.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	49 de 187

Otros ejemplos de medios de diferenciales son el Endo y el MacConkey, el agar sulfito de bismuto, el agar Salmonella-Shigella (SS) y el agar verde brillante (VB) son ejemplos de medios que, a la vez son diferenciales y selectivos. Contienen azúcar y una sustancia indicadora que cambiara de color en medio ácido y también otras sustancias químicas o colorantes, de efecto inhibidor sobre el desarrollo de los bacilos ordinarios del colon y organismos Gram-positivos, presentes siempre en las heces.

Medios que son selectivos para estafilococos, por ejemplo, el medio *Staphylococcus* No. 110 (S-110); para hongos, agar-dextrosa de Sabouraud de pH 5.6, para espirilos del cólera, caldo de peptona alcalina, etc. Con frecuencia se añade penicilina, estreptomina, actidiona u otro antibiótico adecuado para evitar el desarrollo de gérmenes indeseables, mientras crecen libremente las especies que nos interesan.

-Medios sintéticos

Para hacer estudios precisos de nutrición y metabolismo se utilizan soluciones nutritivas, repetibles a partir de una mezcla de sustancias químicamente conocidas, planeada cuidadosamente. Otro empleo importante de los medios sintéticos está en la preparación de ciertos productos biológicos, especialmente toxina diftérica y tuberculina.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Lápiz graso o marcador.
- Gradilla.
- Hisopos estériles.
- Un tubo con caldo nutritivo.
- Un tubo con agar simple inclinado.
- Un tubo con medio de SIM.
- Una caja de Petri con agar nutritivo.
- Una caja de Petri con agar sangre.
- Una caja de Petri con agar S-110.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	50 de 187

CEPAS

- *Staphylococcus aureus*.
- *Klebsiella pneumoniae*.
- *Pseudomonas spp.*

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Técnica de transferencia aséptica.

El profesor de laboratorio hará una demostración del empleo adecuado del asa bacteriológica, de la correcta técnica para destapar tubos, técnica para el manejo de la caja de Petri y manejo de zona estéril. Recordando que el asa se esteriliza en el mechero calentándola al rojo vivo, la boca de los tubos se flamea antes y después de su uso.

B. Siembra en medio inclinado.

1. Asegurarse que los tapones de los tubos giren y salgan fácilmente.
2. Sostener el tubo del cultivo y el que se va a inocular con la mano izquierda, (tomar el de *Staphylococcus aureus*).
3. Esterilizar el asa en el mechero al rojo vivo, dejar enfriar.
4. Sin soltar el asa bacteriológica quitar los tapones de ambos tubos usando para ello diferentes dedos de la mano derecha.
5. Flamear ligeramente las bocas de los tubos.
6. Introducir el asa bacteriológica en el tubo de cultivo y tomar una asada de bacterias.
7. Sembrar el tubo de agar inclinado por estría superficial, en ligeros movimientos en zigzag.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	51 de 187

8. Retirar el asa, flamear brevemente las bocas de los tubos y colocar los tapones de algodón nuevamente en su sitio.
9. Esterilizar el asa en el mechero nuevamente.
10. Colocar el material en la gradilla.
11. Etiquetar los tubos.
12. Incubar a 37°C por 24-48 horas.

C. Siembra en caldo nutritivo.

1. Tomando en cuenta la técnica de transferencia aséptica, tomar una asada del cultivo (emplear de la cepa de *Staphylococcus aureus*).
2. Sembrar agitando brevemente el asa, dentro del tubo con caldo nutritivo.

D. Siembra por picadura.

1. Para sembrar el asa deberá estar totalmente recta.
2. Tomando en cuenta la técnica de transferencia aséptica, tomar una asada del cultivo (de la cepa de *Klebsiella pneumoniae*) y utilizar el medio SIM.
3. Lo importante en esta técnica es tratar de meter y sacar el asa por el mismo lugar (después de tomar una asada de bacterias) para que la picadura quede lo más recto posible.
4. Etiquetar el tubo e incubar a 37°C por 24-48 horas.

E. Siembra en cajas de Petri por el método de Estría cruzada.

1. Se sembrará en los medios sólidos Agar nutritivo (*Pseudomonas spp.*), Agar S-110 (*Staphylococcus aureus*).
2. Primero se trazará con el lápiz graso por detrás de una de las cajas de Petri, quedando 3 cuadrantes.
3. Esterilizar el asa al rojo vivo y dejar enfriar (dentro de la zona estéril).
4. Tomar el tubo con la cepa indicada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	52 de 187

5. Tomando en cuenta la técnica de transferencia aséptica, se toma una asada (inoculo) de la cepa.
6. Con la mano izquierda levantar parcialmente la tapa de la caja de Petri y se deposita el inoculo en el cuadrante número 1.
7. Trazar una serie de zigzags muy cerrados a todo lo largo del sector 1.
8. Esterilizar el asa.
9. Sin volver a tomar inóculo, trazar un zigzag más abierto en el segundo cuadrante, invadiendo al sector 1 solo en las primeras líneas, pero no en las últimas.
10. Esterilizar el asa.
11. Sin inóculo hacer un tercer zigzag en el cuadrante 3 invadiendo al sector 2 en las primeras líneas. Sin tocar al primer cuadrante.
12. Esterilizar el asa.
13. Incubar a 37°C por 24-48 horas, guardar las cajas para la siguiente práctica.

F. Siembra de exudado en cajas de Petri por el método de Estría cruzada.

1. Se utilizará la caja Petri con agar sangre.
2. Se tomará una muestra de la cavidad oral (exudado faríngeo) de un voluntario con un hisopo estéril, siguiendo las indicaciones del profesor.
3. Se depositará la muestra en el primer cuadrante y se desechará el hisopo correctamente (quema en el mechero).
4. En el resto de los cuadrantes se utilizará un asa bacteriológica estéril, como en el procedimiento anterior.
5. Etiquetar las cajas e incubar a 37°C por 24-48 horas, guardar las cajas para la siguiente práctica.

RESULTADOS

Leer los resultados a las 24 y 48 horas, acorde a las instrucciones del profesor. Recordando poner atención en la turbidez del medio, el cambio de coloración, aparición de sedimento. Se sugiere tomar un registro fotográfico de las cajas y tubos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	53 de 187

CUESTIONARIO

- 1) Explique el significado de los términos: Medios simples, enriquecidos, diferenciales y selectivos.
- 2) ¿Cuándo están indicados cada una de estas técnicas y cuál es su importancia en medicina?
- 3) ¿Cuándo se prefiere un medio de cultivo líquido?
- 4) ¿Cuándo se prefiere un medio de cultivo sólido?
- 5) ¿Cómo se encuentra constituida la gelatina nutritiva?
- 6) ¿Qué bacterias esperarías encontrar de la muestra tomada de cavidad oral, si en ese momento no existe patología agregada?
- 7) Explique por qué los medios selectivos solo permiten el crecimiento de bacterias.
- 8) Defina medio de cultivo.
- 9) Explique ¿por qué después de efectuar las diferentes técnicas, todo su material fue incubado a 37°C?
- 10) Explique ¿cuál es la razón de mantenerlos a la temperatura ya señalada por no menos de 24 horas?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Forbes, B. A., Sam, D., y Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico* (12ª ed.). Editorial Medica Panamericana.
- Granados, P. R., y Villaverde, P. M. (2003). *Microbiología Tomo I Bacteriología características y clasificación bacteriana, Virología características y técnicas bioquímicas*. (1ª ed.). Thompson Parainfo.
- Madigan, M. T., Martinko, M. J., y Parker, J. (2006). *Brock Biología de los microorganismos* (10ª ed.). Pearson Educación.
- Procop, G. W., Church, D. L., y Hall, G. S. (2018). *Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas* (7ª ed.). Wolters Kluwer.
- Washington, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., y Woods, G. L. (2007). *Diagnóstico microbiológico* (6ª ed.). Editorial Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	54 de 187

Morfología bacteriana y colonial.

OBJETIVOS

- Conocer diversas técnicas de coloración.
- Reconocer por medio de tinciones, diferentes estructuras bacterianas.
- Conocer los parámetros empleados para estudiar la morfología colonial.
- Comprender la importancia de la curva de crecimiento.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El método más común para examinar bacterias es hacer primero un frotis, es decir una película delgada de los organismos sobre un portaobjetos limpio y después aplicar colorantes al frotis seco. Los colorantes se combinan químicamente con el protoplasma bacteriano, si la célula no ha muerto, el proceso mismo de la tinción la mata. El método, por consiguiente, debe hacerse cuidadosamente o se pueden producir artefactos.

Los colorantes más comúnmente usados son sales. Los básicos consisten en un catión coloreado unido a un anión incoloro (ejemplo, clorhidrato de azul de metileno), mientras que los ácidos, constituyen exactamente lo contrario, (ejemplo eosinato de sodio).

Las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos, los cuales portan cargas negativas en forma de grupos fosfato, éstos se combinan con los colorantes básicos cargados positivamente, lo cual, les hace ser de los más usados en citología bacteriana.

Los colorantes ácidos no tiñen la célula bacteriana y, por lo tanto, pueden ser usados para impartir al fondo de un color contraste (coloraciones negativas).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	55 de 187

Los colorantes básicos tiñen las células bacterianas uniformemente, a menos que previamente sea destruido el RNA del citoplasma. Sin embargo, se pueden usar técnicas especiales para diferenciar flagelos, cápsula, paredes celulares, membranas celulares, gránulos, núcleos y esporas.

Solo algunos de los muchos compuestos orgánicos que actúan como colorantes se usan para teñir microorganismos. Se trata de modificaciones de las primeras anilinas obtenidas de productos de alquitrán, introducidas alrededor de 1880 por Koch, Weigert y Ehrlich.

La estructura química de los colorantes se encuentra dividida en dos grupos principales:

A. Grupo cromóforo. El grupo químico, que confiere a la molécula la propiedad de proporcionar color.

B. Grupo auxocromo. El grupo químico que suministra las propiedades de formar sales y de transferir el color de un colorante a una sustancia sobre la que actúa. Los más ampliamente usados en microbiología son los del grupo auxocromo y se dividen en dos clases, colorantes básicos y colorantes ácidos, de éstos los más usados son los de naturaleza básica.

La curva de crecimiento

Dado que dos células producidas por el crecimiento y división de una sola célula son capaces de crecer a la misma velocidad que la célula progenitora, el número de células en un cultivo aumenta con el tiempo de progresión geométrica, es decir exponencialmente.

La velocidad de crecimiento de un cultivo en un momento dado es directamente proporcional al número de células presentes en ese momento.

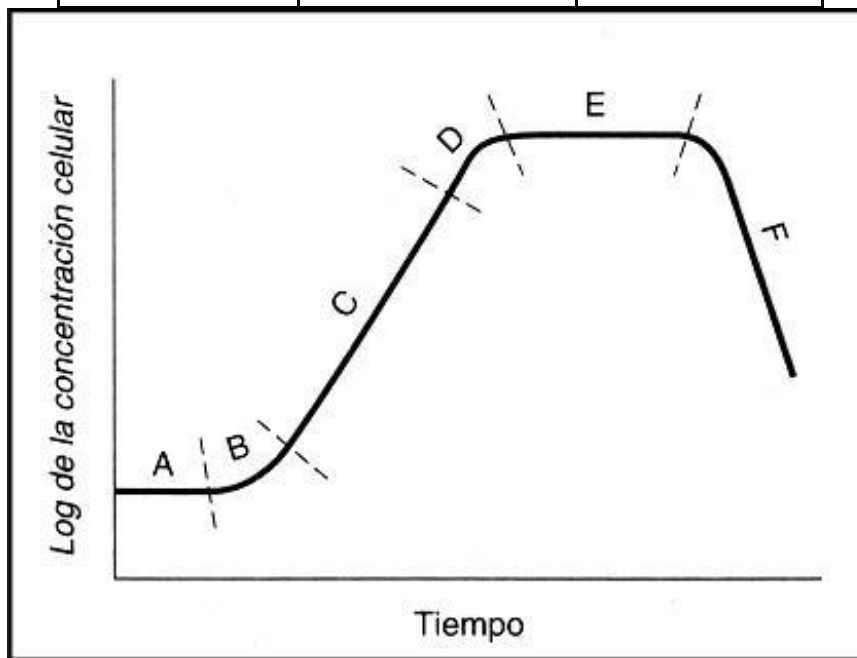
Si se inocula un medio líquido con células microbianas, tomadas de un cultivo que previamente ha crecido hasta la saturación, en el cual periódicamente se ha determinado



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	56 de 187

el número de células viables por mililitro y trazado una gráfica de él, generalmente se obtiene una curva como la que se muestra en la figura número 1, además se puede describir la curva en términos de 6 fases que se representan por las letras A a F.

Sección de la curva	FASE	Velocidad de crecimiento
A	Rezago	Cero
B	Aceleración	Creciente
C	Exponencial	Constante
D	De retardo	Decreciente
E	Estacional máxima	Cero
F	Declinación	Negativa (muerte)





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	57 de 187

Morfología colonial

Además de las diferencias estructurales de una colonia, debidas a las múltiples especies, las bacterias de una sola especie pueden formar diferentes tipos de colonias. Estas diferencias en la forma de la colonia son importantes, porque son la expresión visible de diferencias morfológicas y fisiológicas importantes relacionadas con cada microorganismo en particular.

Como guía para la descripción de la morfología colonial se suele emplear la siguiente terminología.

Forma	PUNTIFORME	IRREGULAR
	CIRCULAR	RIZOIDE
	FILAMENTOSA	FUSIFORME
Elevación	PLANA	ACUMINADA
	PLANOCONVEXA	UMBILICADA
	CONVEXA	PAPILADA
Borde	REDONDEADO	ESPICULADO
	ONDULADO	FILAMENTOSO
	LOBULADO	RIZOIDE

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Microscopio.
- Porta y cubre objetos.
- Gradilla.
- Colorantes: Rojo Congo, Colorante de Albert, Verde de malaquita, Mordiente de Knaysi, Mordiente de cápsula, Fucsina, Lugol y Safranina.
- Una caja de Petri con agar nutritivo de la práctica anterior.
- Una caja de Petri con agar sangre de la práctica anterior.
- Una caja de Petri con agar S-110 de la práctica anterior.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	58 de 187

CEPAS

- *Klebsiella pneumoniae*.
- *Bacillus megaterium*.
- *Corynebacterium spp.*
- *Bacillus subtilis*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. *Demostración de cápsula (Método de Rojo Congo).*

1. Colocar una gota de colorante rojo congo en un portaobjetos limpio.
2. Hacer una suspensión con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*.
3. Dejar secar al aire y fijar al calor.
4. Agregar mordiente de cápsula y dejar por tres minutos.
5. Lavar con agua corriente (sin que pegue directamente en la muestra).
6. Dejar secar y observar a 10X y 40X. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos).

B. *Demostración de pared celular (Método técnica de Knaysi).*

1. Preparar un frotis empleando la cepa de *Bacillus megaterium*.
2. Fijar al calor.
3. Colocar mordiente de Knaysi por 10 minutos.
4. Lavar con agua corriente (sin que pegue directamente en la muestra).
5. Colocar una gota de Fucsina y colocar un cubreobjetos.
6. Dejar secar y observar a 10X y 40X. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	59 de 187

C. *Demostración de gránulos (Método Técnica de Albert).*

1. Preparar un frotis empleando la cepa de *Corynebacterium spp.*
2. Fijar al calor.
3. Cubrir el frotis con colorante de Albert por 5 minutos.
4. Calentar un poco el portaobjetos, con pases sobre la flama del mechero, cuidar de no secar, por medio minuto.
5. Lavar con agua (sin que pegue directamente en la muestra).
6. Aplicar lugol durante un minuto.
7. Lavar con agua (sin que pegue directamente en la muestra) y dejar secar.
8. Observar a 10X y 40X. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos).

D. *Demostración de endoesporas (Método técnica de Scheffer – Futton).*

1. Preparar un frotis con la cepa de *Bacillus subtilis*.
2. Dejar secar y fijar al calor.
3. Cubrir la preparación con verde de malaquita.
4. Calentar con pases sobre la flama del mechero, hasta que se formen vapores, durante un minuto.
5. Lavar con agua (sin que pegue directamente en la muestra).
6. Agregar safranina durante medio minuto.
7. Lavar con agua (sin que pegue directamente en la muestra) y dejar secar.
8. Observar a 10X y 40X. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos).

E. Observación de morfología colonial.

- F. Con las cajas Petri de las practicas anteriores evaluar y leer los parámetros de morfología colonial, anotando los datos encontrados de cuando menos tres colonias y anotar el tipo de medio de cultivo de la colonia estudiada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	60 de 187

RESULTADOS

Reportar lo observado en cada tinción (tipo de tinción, microorganismo empleado y a que objetivo se observó), recordando que en la demostración de capsulas las capsulas deben aparecer como zonas claras, mientras que las células y fondo de color rojo. En la demostración de gránulos metacromáticos, los gránulos aparecen de color azul oscuro y el citoplasma verde pálido. Finalmente, en la demostración de endosporas las endosporas se tiñen de color verde y el citoplasma de rojo.

CUESTIONARIO

- 1) Defina colonia bacteriana.
- 2) ¿Cómo podemos saber si dos colonias de un mismo medio pertenecen a un mismo microorganismo?
- 3) ¿Qué aspectos se toman para leer morfología bacteriana?
- 4) ¿Cómo puede ser la superficie y la elevación de una colonia?
- 5) ¿Por qué algunos microorganismos requieren de gelosa sangre para desarrollarse?
- 6) Describir el procedimiento para preparar y fijar un buen frotis.
- 7) ¿Qué otro nombre recibe los gránulos metacromáticos?
- 8) ¿Qué bacterias poseen gránulos metacromáticos en su citoplasma?
- 9) Mencione el nombre de 3 microorganismos capaces de formar esporas.
- 10) Escriba el nombre de 3 microorganismos que poseen cápsula.
- 11) ¿Cuál es la función de la cápsula?
- 12) ¿Cuál es la función de la pared celular bacteriana?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	61 de 187

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011).

Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.

Dulbecco Davis (2003). Tratado de Microbiología (3ª ed.). Editorial Salvat.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). Microbiología médica (9ª ed.).
Elsevier.

Pelczar, M. J., Reid, R. D., y Chan, E. C. S. (2001). Microbiología (3ª ed.). McGraw Hill.

Riedel, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., y Miller, S. (2020). Microbiología médica de Jawetz,
Melnick y Adelberg (28ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	62 de 187

Análisis bacteriológico de aguas para la determinación de coliformes.

OBJETIVOS

- Conocer la importancia del análisis bacteriológico del agua.
- Realizar la técnica del número más probable en muestras de agua local, tanto la prueba presuntiva y prueba confirmativa.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El agua como líquido vital debe reunir algunas características muy importantes para poder ser utilizada por el hombre. Dentro de estas características se encuentran las referentes a la potabilidad, existen diversos métodos para potabilizarla, de los cuales algunos son muy accesibles y otros muy complejos.

El objetivo de dichos métodos es eliminar a cualquier tipo de microorganismo patógeno que se encuentre en el agua. El control y vigilancia de la calidad del agua es clave para reducir la transmisión de enfermedades infecto contagiosas que perjudican al hombre. Para dicho control se utilizan técnicas de laboratorio.

Sin embargo, no hay duda de que existe una flora bacteriana normal y características de las aguas naturales. Las bacterias que se encuentran frecuentemente en aguas naturales son:

1. Bacterias superiores, frecuentemente las formas encapsuladas que incluyen bacterias de azufre, de hierro y formas similares.
2. Prostecados o bacterias con apéndices que se encuentran en lagos y otras colecciones de agua, adheridas a algún objeto inanimado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	63 de 187

3. Las formas espirales que se encuentran en gran número en el agua, algunas pueden ser muy grandes en comparación con los espirilos parasitarios.
4. Gran variedad de bacilos, que incluyen:
 - a. Formas pigmentadas (*Serratia marcescens* y *Chromobacterium violaceum*).
 - b. Diversas formas no pigmentadas como: *Pseudomonas fluorescens*, bacterias azufrosas, termófilas, bacilos aerobios formadores de esporas, bacilos anaerobios formadores de esporas.
5. Formas de cocos:
 - a. Pigmentadas: Generalmente amarillas, con gran frecuencia *Sarcina lútea*.
 - b. No pigmentados.
 - c. Bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia *Azotobacter*.
6. Bacteria nitrificante, nitrosomas y *Nitrobacter*. Estas bacterias del agua se encuentran en el agua dulce de pantanos, arroyos y lagos.

Además de las bacterias del agua, esta puede y suele contener una diversidad de bacterias que la contaminan desde fuentes externas como el aire, suelo y excreciones. Puede deducirse, que, en el análisis bacteriológico del agua, que ciertas bacterias permiten conocer la calidad de agua. Las bacterias asociadas a las heces (mayormente bacilos coliformes), son las que pueden utilizarse como indicador de la calidad de agua ya que nos indican si esta ha sido contaminada. El examen bacteriológico del agua para buscar bacilos coliformes se apoya con el hecho de que estos microorganismos fermentan lactosa.

Análisis bacteriológico

Existen diversos métodos para determinar organismos indicadores de contaminación con los cuales se juzga la calidad sanitaria del agua, incluyendo:

- Presencia o ausencia de coliformes.
- Número y tipo de bacterias que existen.
- Tipo de agua, superficial o profunda.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	64 de 187

- Condiciones locales.
- Análisis químico.

Existen formas basadas en el recuento de coliformes, determinado por la formación de ácido gas, por lo que las aguas se dividen en clase según las siguientes bases:

Clase 1: Es considerada como altamente satisfactoria, contiene menos coliformes por 100 mL.

Clase 2: Agua considerada como satisfactoria, contiene de 1-2 coliformes por 100 mL.

Clase 3: Agua considerada sospechosa, contiene de 3-10 coliformes por 100 mL.

Clase 4: Agua no satisfactoria, contiene más de 10 coliformes por 100 mL.

Mediante el examen bacteriológico se sabe que el agua no es apta para el consumo humano, se plantea el problema de las formas y medios de purificación del agua, que difieren según la cantidad, calidad y carácter del agua a tratar y pueden reunirse como sigue:

Métodos mecánicos:

- Almacenamiento.
- Filtración.
- Coagulación y filtración por arena.

Métodos químicos:

- En gran escala: Hipocloritos y cloro líquido.
- En escala menor: Hipoclorito, luz ultravioleta, ozono, etc.

El método más simple y sencillo para tratar el agua familiar o individual es simplemente hervirla, la ebullición durante 5 minutos destruye bacilos y forman similares patógenas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	65 de 187

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Guantes (para los que manipulen el agua o los frascos).
- 3 tubos de caldo lactosado con rojo de fenol con campana de Durham.
- 3 cajas Petri de agar eosina azul de metileno (EMB).
- 3 muestras de agua local destinada a consumo humano y etiquetadas.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Tomar una muestra del agua con el asa bacteriológica estéril y sembrar en el tubo con caldo lactosado rojo de fenol y campana de Durham. La persona que siembra NO usará guantes, solo los ayudantes que abrirán los frascos de las muestras de agua deben usarlos.
2. Tomar nuevamente muestra del agua con el asa bacteriológica estéril y sembrar por estría cruzada en la caja de EMB.
3. Emplear otras dos muestras de agua de diferente origen para los dos restantes tubos (efectuar la misma técnica).
4. Etiquetar de acuerdo con el tipo de muestra.
5. Incubar a 37 °C, 24-48 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	66 de 187

RESULTADOS

Observar la formación de ácido (cambio de coloración) y gas en el tubo y crecimiento de coliformes en el medio EMB.

CUESTIONARIO

- 1) Describa tres aspectos importantes del Análisis de agua.
- 2) ¿En qué consiste la técnica por filtración con millipore y con qué fin se emplea?
- 3) Enumere algunas técnicas para la obtención de agua con menos carga bacteriana.
- 4) ¿Qué es el agua potable y que características presenta?
- 5) Enumere 3 enfermedades transmitidas por el agua.
- 6) Además del agua EMB, que otro método diferencial puede usarse.
- 7) ¿Cuáles son los procesos utilizados en la purificación y desinfección artificiales en los suministros de agua potable?
- 8) Defina Agua para uso y consumo humano, acorde a la 01-18-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., McKerrow, J. H., y Sakanari, J. A. (2016). Microbiología médica de Jawetz, Melnick & Adelberg (27ª ed.). McGrawHill.
- Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana.
- Walker, T. S. (2006). Microbiología (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	67 de 187

Microcultivo de hongos.

OBJETIVOS

- Conocer la técnica para la obtención de hongos en el laboratorio (microcultivo).
- Comprender e identificar las características generales de los hongos (crecimiento, estructuras, importancia, etc.).
- Identificar la morfología colonial de los hongos.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los hongos son la causa más frecuente de enfermedades en las plantas, pero solamente alrededor de 50 de los millares de especies conocidas provocan procesos patológicos en el hombre.

Por lo general los hongos patógenos no producen toxinas. con pocas excepciones, la mayoría de los hongos patógenos para el hombre se clasifican como “fungi imperfecti”, denominados así debido a que producen solo esporas asexuales y no tiene desarrollo esporular asexuales algún conocido que da lugar a las estructuras tan especializadas que se encuentran en otras especies de hongos.

Estructuras de los hongos.

Cuando crecen en medios adecuados, muchos hongos producen largos filamentos ramificados; cada filamento es llamado: “Hifa”.

Pueden estar divididas por tabiques transversos constituyendo una cadena de células a estas se les da el nombre de “hifas septadas o tabicadas”. A medida que las hifas continúan creciendo y se ramifican se desarrolla un conjunto de filamentos que se denomina “micelio”. la parte del crecimiento que se proyecta por sobre la superficie del sustrato se le llama



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	68 de 187

“micelio aéreo”, en tanto que la parte que penetra en el sustrato y absorbe los alimentos se le conoce como “micelio vegetativo”.

Los hongos se reproducen por esporas de diversos tipos, muchas de las cuales se originan en el micelio aéreo, entonces denominado micelio reproductivo.

Las esporas son denominadas asexuales cuando no se verifica una fusión de los núcleos para su formación; cuando se lleva a cabo tal fusión se le conoce como sexual. En la mayoría de los hongos de importancia no ha sido identificada la capacidad de formar esporas sexuales.

Los hongos incluyen 4 clases:

- Phycomycetes (los hongos inferiores): La raíz de esta palabra (phyco) significa alga, y los ficomicetos reciben a veces el nombre de hongos algáceos de los que unos son acuáticos y otros terrestres. Los ficomicetos difieren de los hongos superiores en que poseen esporas asexuales endógenas que se forman en estructuras sacciformes, llamados: Espongiarius, que sus micelios no son tabicados.

Los hongos superiores se caracterizan por esporas asexuales exógenas, llamadas: Conidios, que se forman fuera de las hifas y por la presencia de los micelios tabicados con poros que permiten los pasos de núcleos y citoplasma de una parte del micelio a otra.

- Ascomycetes: La palabra asca, significa bolsa o estructura en forma de saco, y los ascomicetos se denominan así por contener sus esporas asexuales en un asca.
- Basidiomycetes: Hongos superiores que producen esporas sexuales sobre una base o basidio.
- Deuteromycetes: Hongos inespecíficos; estos hongos no pueden clasificarse tomando como su base su reproducción sexual, ya que sus etapas son desconocidas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	69 de 187

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Caja de Petri con medio PDA (agar papa dextrosa) por grupo.
- Mango y hoja de bisturí por grupo.
- Marcador.
- Regla de plástico graduada.
- Glicerol al 10%.
- Dos equipos para microcultivo estéril (cajas de Petri 100 x 20 con triangulo de vidrio, porta y cubre objetos)
- Pinzas de disección sin dientes.

CEPAS

- *Penicillium spp.*
- *Aspergillus spp.*

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Por grupo se realizará una cuadrícula de 1 cm por el reverso de la caja de que contiene el medio PDA con el marcador.
2. Con el bisturí previamente flameado, se cortará el medio PDA siguiendo las líneas del marcador en el vidrio.
3. Utilizando el mismo bisturí, colocar un cuadrito de agar de PDA en el centro del portaobjetos que esta sobre el triángulo de vidrio dentro de la caja de Petri para el microcultivo, hacer lo mismo para la otra caja.
4. Utilizando el asa doblada en ángulo recto, inocular con la colonia del hongo proporcionada los cuatro lados del medio PDA.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	70 de 187

5. Con las pinzas flameadas, coloque el cubreobjetos sobre el agar.
6. Colocar el glicerol al 10% (5-10 mL) en la caja de Petri, procurando no mojar el microcultivo.
7. Etiquetar la caja y cultivar a temperatura ambiente, por 5 días, teniendo cuidado de que siempre tenga glicerol al 10%.
8. En la siguiente sesión, se observarán al microscopio las preparaciones fijas de hongos. Para ello, en presencia del mechero se debe extraer con una pipeta todo el glicerol al 10% (colocándolo en un vaso de precipitado adecuado) e inactivar el microcultivo 30 minutos antes de la lectura colocando formaldehído al 10% a la caja del microcultivo. Con ayuda de las pinzas de disección, separar la laminilla cubreobjetos del microcultivo.
9. Colocar una gota de azul de algodón sobre un portaobjetos limpio y colocar sobre la gota del colorante el cubreobjetos con la muestra del hongo. Observar a 10x y 40x e identificar las estructuras reproductivas del hongo.
10. Se debe desechar el glicerol al 10% y la caja del Petri del microcultivo con el medio de PDA conforme a las instrucciones del profesor.

RESULTADOS

Efectuar dibujos de las estructuras de los hongos observados, describir el tipo de crecimiento, sus características en la caja de microcultivo, y los cambios que presentó en cada una de sus lecturas macroscópicamente.

CUESTIONARIO

- 1) Defina que es un hongo, hifa, micelio y espóra.
- 2) ¿Cómo se clasifican los hongos?
- 3) Mencione hongos clasificados como Fungi Imperfecti.
- 4) ¿Qué es un microcultivo?
- 5) ¿Qué importancia tienen los microcultivos?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	71 de 187

- 6) Enuncie enfermedades producidas por hongos en el hombre y qué tipo de hongo las producen.
- 7) ¿Qué diferencias terapéuticas encuentra entre una patología producida por hongos y otra por bacterias?
- 8) ¿Cómo es la reproducción de hongos?
- 9) Mencione 5 características del hongo "Aspergillus".
- 10) Mencione 5 características del hongo "Penicillium".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bonifaz, J. A. (2020). *Micología médica básica* (6ª ed.) McGraw Hill.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). *Microbiología médica* (9ª ed.). Elsevier.

Romero, C. (2018). *Microbiología y Parasitología Humana* (4ª ed.). Editorial Panamericana.

Walker, T. S. (2006). *Microbiología* (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	72 de 187

Ecología bacteriana.

OBJETIVO

- Conocer las relaciones de los microorganismos, entre ellos y con el medio ambiente.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El estudio completo de los efectos del medio natural sobre el conjunto de poblaciones de organismos vivos constituye la importante rama de la ciencia llamada ecología.

Durante toda su vida, el cuerpo humano alberga una gran variedad de microorganismos que potencialmente pueden producir enfermedades. En el estudio de las enfermedades infecciosas es muy importante conocer los tipos de microorganismos que normalmente están presentes en diversos sitios del cuerpo y las condiciones en que pueden ser identificados y cultivados de forma óptima para diferenciar a aquellos que son capaces de producir una infección. La microbiota del cuerpo se puede clasificar en dos tipos:

- A. Microbiota residente (microflora normal).
- B. Microbiota transitoria

La microbiota residente está constituida por los gérmenes que, por métodos de cultivo, tinción e inmunológicos, se les encuentra constantemente en ciertas áreas del cuerpo, en cada edad y que, si se les altera, se restablecerá por sí mismos.

La localización de la microbiota residente en sitios definidos depende de las condiciones nutricionales y fisiológicas como temperatura, humedad, tensión de oxígeno y la presencia o ausencia de sustancias inhibitorias.

La microbiota transitoria consiste en aquellos tipos de microorganismos que pululan en el huésped, particularmente en la piel y membranas mucosas, durante corto tiempo (de horas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	73 de 187

a días). Esta microbiota proviene del ambiente y no es necesariamente patógena; tampoco se establece de forma permanente. Si la microbiota residente se altera, la biota transitoria puede incrementar y producir enfermedad.

La microbiota suplementaria, es una microbiota normal suplementaria que representa a los microorganismos que pueden identificarse solo en algunos individuos. Las personas que poseen microorganismos suplementarios en general los albergan en escaso número, pero durante mucho tiempo.

Relaciones entre microorganismos.

Los factores del ambiente parecen favorecer a los microorganismos que tienen las mismas o similares características químicas, físicas y biológicas. De entre los factores ambientales, la nutrición parece favorecer o dificultar al tipo y número de bacteria en una comunidad. Las relaciones nutricionales de poblaciones bacterianas mixtas pueden entenderse en mejor modo si se conocen los requerimientos de los gérmenes individuales. El tipo de nutriente en un sistema microbiano como el cuerpo humano es uno de los factores más importantes que determinan y regulan los grupos de microbios que han de desarrollarse en cada sitio. Las comunidades microbianas varían por su complejidad, dependiendo del tipo de nutriente disponible, así como la localización del germen en ciertos nichos específicos del organismo por la capacidad de algunos microorganismos de adherirse a ciertas estructuras del cuerpo.

La asociación entre diferentes microorganismos puede ser:

- Beneficiosa para ambos.
- Útil solo para uno de ellos.
- Inconveniente para uno o más miembros de la comunidad.

Estas complejas relaciones entre bacterias se designan como:

- Mutualismo (Simbiosis o Comensalismo).
- Antibiosis.
- Sinergismo.

Una forma de relación del tipo simbiótica es el mutualismo, que es una interacción mutuamente beneficiosa para las dos especies de microorganismos. Un ejemplo, es el



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	74 de 187

crecimiento de *Lactobacillus arabinosus* y *Streptococcus faecalis*, donde el primero produce ácido fólico y el segundo produce fenilalanina, cada microorganismo produce cantidad suficiente del factor indispensable para el crecimiento del otro, así ambos se benefician y pueden desarrollarse.

Una segunda forma de relación del tipo simbiótica es el comensalismo, en esta forma, una de las especies se beneficia mientras que la otra no se altera ni obtiene ventajas. Un ejemplo es cuando crecen juntos *Bacteroides melaninogenicus* y *Difteroides*, el primero necesita de un compuesto parecido a la vitamina K, el cual es provisto por el *difteroides*, este último no recibe ningún beneficio.

La antibiosis es una relación antagónica, por ejemplo, los *Lactobacillus* generan un estado de acidez por su metabolismo y los microorganismos de tipo proteolítico no pueden desarrollarse bien en tal acidez. Otro ejemplo es la producción de penicilina, por un hongo, que es inhibitoria para algunas bacterias como *Streptococcus pyogenes*, cepas de estafilococos, algunos cocos Gram negativos del género *Neisseria* y espiroquetas.

El antagonismo entre los microorganismos es importante para el huésped porque regula la población microbiana e impide el crecimiento exagerado de algunas bacterias.

Otra relación entre bacterias se denomina sinergismo, donde los microorganismos actúan juntos y se complementan metabólicamente para sobrevivir. Es decir, diversos microorganismos generan una reacción metabólica que no lograrían producir si crecieran solos. Por ejemplo, cuando *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*, crecen por separado, ambos fermentan lactosa con producción de ácido, y cuando crecen juntos en un tubo con caldo y lactosa, forman ácido y gas.

Acorde a Rene Dubos, las relaciones entre los microorganismos no son permanentes. El ambiente y otros factores pueden cambiar una relación de simbiosis al antagonismo. Más aún, en condiciones relativamente constantes de los factores del ambiente, es difícil clasificar el tipo de relación que esté ocurriendo entre los microorganismos que puede ser



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	75 de 187

de beneficio o dañina, y aún en la relación de simbiosis pudiera existir el estado de contienda o lucha permanente entre los elementos de la población mixta.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Caja de agar soya tripticasa.
- 9 tubos con caldo glucosa rojo de fenol con campana de Durham.
- 9 tubos con caldo sacarosa rojo de fenol con campana de Durham.
- 9 tubos con caldo manitol rojo de fenol con campana de Durham.

CEPAS

- *Bacillus subtilis*.
- *Bacillus spp.*
- *Streptococcus spp.*
- *Micrococcus lysodeikticus*.
- *Serratia marcescens*.
- *Klebsiella pneumoniae*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Experimento Antibiosis

1. En la caja de soya tripticasa sembrar una estría de *Micrococcus lysodeikticus* y otra estría con *Bacillus spp.*, de tal manera que se crucen. Es muy importante respetar la técnica aséptica y esterilizar el asa antes y después de tomar cada muestra.
2. Etiquetar la caja equipo/mesa, grupo, fecha y cepas.
3. Incubar a 37°C por 24-48 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	76 de 187

B. Experimento Sinergismo

1. Identificar cada tubo y sembrar por agitación las siguientes combinaciones de cepas en cada caldo, es decir cada combinación se debe sembrar en el caldo glucosa, el caldo sacarosa y caldo manitol. Recordar respetar la técnica aséptica y etiquetar cada tubo para identificarlo fácilmente.
2. Incubar a 37°C por 24-48 horas.

Tubo	Cepa
1	<i>Streptococcus spp.</i>
2	<i>Serratia marcescens.</i>
3	<i>Bacillus subtilis.</i>
4	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>
5	<i>Streptococcus spp. + Serratia marcescens.</i>
6	<i>Streptococcus spp. + Bacillus subtilis.</i>
7	<i>Streptococcus spp. + Klebsiella pneumoniae.</i>
8	<i>Serratia marscensces + Bacillus subtilis.</i>
9	<i>Klebsiella pneumoniae. + Serratia marcescens.</i>

RESULTADOS

En el experimento de antibiosis, se observará si hay o no inhibición del crecimiento de *Micrococcus lysodeikticus*. En el experimento de sinergismo se observará si en cada tubo hay cambio de color que indica que existe fermentación de azúcares, se sugiere reportar los resultados en una tabla.

CUESTIONARIO

- 1) Defina ecología, ecosistema, hábitat y nicho ecológico.
- 2) Establezca la distinción entre simbiosis y comensalismo.
- 3) Defina oportunismo y parasitismo.
- 4) Enuncie una definición de microorganismo anfibionte.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	77 de 187

- 5) Enuncie los tipos de microbiota del cuerpo humano.
- 6) ¿De qué depende la adquisición de microbiota residente de un individuo?
- 7) ¿Qué importancia tiene la flora residente?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011).

Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.) McGraw Hill.

Dulbecco Davis (2003). Tratado de Microbiología (3ª ed.). Editorial Salvat.

Nolte, W. (1982). Microbiología odontológica (2ª ed.). Nueva editorial Interamericana.

Picazo De La Garza, J. J. (2016). Compendio de Microbiología (2ª ed.). Elsevier.

Williams, B. (1976). Microbiología (3ª reimpresión). Editorial Publicaciones Cultural.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	78 de 187

Requerimiento gaseoso y temperaturas para el crecimiento bacteriano.

OBJETIVO

- Conocer las necesidades de oxígeno y efectos de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano, para poder cultivarlos en condiciones óptimas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los factores como temperatura, pH, presión osmótica, concentración de sustancias nutritivas, etc., son cruciales para que los microorganismos presenten un desarrollo y reproducción normal.

Efectos de la temperatura

Temperaturas de crecimiento óptimo, para cada especie de bacterias hay una temperatura en la que el crecimiento y multiplicación se produce con mayor rapidez, se llama temperatura óptima, es decir es la temperatura ordinaria del hábitat natural en la que las enzimas bacterianas esenciales funcionan mejor.

Para la gran mayoría de organismos saprófitos que habitan en el suelo y otros lugares fuera de los cuerpos vivos, la temperatura óptima es de 25-30°C, que es precisamente un poco más elevada que la temperatura ambiente normal.

Hay algunas especies que se encuentran en el suelo, en fuentes de aguas termales y en el contenido intestinal de animales, cuya temperatura puede ser de 60-90 °C o más elevadas. Se llaman termófilas (amantes del calor).

En el extremo opuesto encontramos unas pocas especies excepcionales que crecen mejor al punto próximo a la congelación, son llamadas bacterias psicrófilas (amantes del frío).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	79 de 187

Los organismos que crecen bien a temperaturas intermedias de 25-27 °C se dice que son mesófilos (amantes de la moderación).

Clases de bacterias según las relaciones de temperatura.

Clase	Mínima	Óptima	Máxima
Psicrófila	0°C	15 - 20 °C	30 °C
Mesófila	15 °C - 25 °C	30°C - 37 °C	40 - 55 °C
Termófila	25 °C - 45 °C	50 °C - 60 °C	60 - 90 °C

Temperaturas aproximadas al crecimiento.

La temperatura óptima para que las bacterias parásitas del hombre y otros animales de sangre caliente es de 37 °C, que es la temperatura normal del cuerpo humano.

Las incubadoras de laboratorio en que se cultivan microorganismos patógenos procedentes del cuerpo humano deben regularse, para mantener constante la temperatura entre 35 °C y 37 °C. Las bacterias parásitas en el cuerpo de las aves se desarrollan mejor a temperaturas elevadas, es decir de 41- 45 °C, debido a que es la temperatura normal de estos animales.

Temperaturas mínimas y máximas de crecimiento.

A temperaturas por encima o por debajo de la óptima, los microorganismos se muestran menos activos, crecen y se multiplican lentamente.

Para cada especie hay un límite más o menos definido en ambos sentidos, más allá del cual no se realiza el crecimiento. Para la mayoría de los microorganismos que viven en el



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	80 de 187

cuerpo humano, la temperatura mínima se encuentra alrededor de los 20 °C, la máxima de 42 a 45 °C aproximadamente.

Relación con el oxígeno atmosférico.

Todos los seres vivos necesitan oxígeno, aunque las bacterias difieren de su capacidad para utilizar el oxígeno. La mayoría utiliza directamente el oxígeno atmosférico, de la misma manera que lo hace el ser humano y los animales, estas reciben el nombre de aerobias que contienen enzimas como los citocromos.

Por otro lado, para un grupo importante de bacterias, el oxígeno libre en el aire es realmente tóxico. No pueden utilizar el oxígeno atmosférico ni sobrevivir en contacto con él y son llamadas anaerobias. Estos microorganismos generan una serie de reacciones metabólicas complejas en ausencia del oxígeno (hidrolisis, fermentación, acetogénesis y metanogénesis) en donde otros compuestos sirven como aceptores finales de electrones.

Los anaerobios estrictos sólo crecerán donde no hay oxígeno en lo absoluto, a no ser que se hallen presentes sustancias fuertemente reductoras, como el glicolato, o bien, que se encuentren junto a organismos aerobios que absorban oxígeno.

Entre los aerobios estrictos y anaerobios estrictos se encuentran las facultativas que pueden utilizar el oxígeno libre o combinado.

La relación de microorganismos con el oxígeno es sutil, ya que los procesos de la respiración bacteriana son complicados, pero solo se necesita comprender que las diferentes variedades de las bacterias están delicadamente adaptadas a una forma determinada de provisión de oxígeno y se desarrollan mejor bajo presión particular del mismo.

Es conveniente hacer notar que muchas bacterias patógenas, aunque crecen bien en condiciones aerobias ordinarias, se desarrollan mucho mejor, en su primera o segunda



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	81 de 187

generación, en medios de cultivo artificiales o al menos parcialmente anaerobios, en otras palabras, la mayoría de los microorganismos son generalmente microaerófilos, prefieren poco aire.

El crecimiento de muchos agentes patógenos se facilita suministrando una atmósfera de contenido de dióxido de carbono aumentada en un 10% aproximadamente.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- 2 pipetas de 1 mL graduadas estériles.
- 8 tubos de caldo nutritivo.
- 1 tubo de agar tioglicolato.
- 1 tubo con gelatina nutritiva.

CEPAS

- *Escherichia coli*.
- *Bacillus subtilis*.
- *Pseudomonas spp.*

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Siembra en tubos con caldo nutritivo

1. Con una pipeta estéril inocular 4 tubos de caldo nutritivo con 1 mL. de suspensión de *Escherichia coli* (recordar no pipetear con la boca). En caso de que no exista suficiente suspensión del cultivo, se podrá utilizar el asa bacteriológica para tomar un inculo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	82 de 187

2. Con una segunda pipeta estéril inocular los otros 4 tubos de caldo nutritivo con 1 mL. de *Bacillus subtilis* (recordar no pipetear con la boca). En caso de que no exista suficiente suspensión del cultivo, se podrá utilizar el asa bacteriológica para tomar un inculo.
 3. Etiquetar cada uno de los tubos claramente. Cada tubo de caldo nutritivo (inoculado con *Bacillus subtilis* y con *Escherichia coli*, respectivamente) se incubará a las siguientes temperaturas:
 - 4 °C
 - 37 °C
 - 55 °C
 - Temperatura ambiente.
 4. Después de 24-48 horas, efectuar la lectura de los resultados.
- B. Siembra en tubos con tioglicolato y gelatina nutritiva
1. Para los tubos con tioglicolato y gelatina nutritiva, sembrar por picadura con las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*
 2. Recordar mantener la técnica de transferencia estéril. flameando el asa antes y después de la inoculación.
 3. Incubar los tubos a 37 °C por 24-48 horas. Lectura de resultados.

RESULTADO

Para los tubos con caldo nutritivo, se debe observar la turbidez e indicar a que temperatura se produjo el máximo desarrollo, reportando que sucede en cada uno de los tubos. Para los tubos de tioglicolato y gelatina nutritiva se debe reportar la localización de crecimiento de las bacterias.

CUESTIONARIO

- 1) Mencione 2 ejemplos de microorganismos patógenos que sean aerobios, anaerobios y facultativos.
- 2) Realice una tabla comparativa los rangos de temperatura para las bacterias: mesófilas, termófilas y psicrófilas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	83 de 187

- 3) Enuncie por lo menos 2 bacterias que puedan crecer a temperaturas mayores a los 7 °C.
- 4) Enumere algunos microorganismos psicrófilos causantes de descomposición de alimentos de refrigeración.
- 5) Menciona ¿Qué importancia médica tiene conocer los rangos de temperatura de las bacterias?
- 6) En los tubos de caldo nutritivo ¿A qué temperatura espera un mejor desarrollo y por qué?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Casillas Vega, N., Mendoza Olazarán, S., y Flores Aréchiga, A. (2020). Procedimientos de Microbiología (1ª ed.). McGrawHill.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). Microbiología médica (9ª ed.). Elsevier.

Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana.

Walker, T. S. (2006). Microbiología (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	84 de 187

Obtención y aislamiento de cultivos puros.

OBJETIVOS

- Identificar los procedimientos y precauciones que deben sugerirse para efectuar las técnicas de cultivo (técnica aséptica).
- Identificar la importancia de la obtención de cultivos puros.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El aislamiento de cultivos es técnica especial, que requiere gran cuidado y atención a numerosos e importantes detalles. En cada paso de la preparación, manejo y examen de cultivos es importante tener cuidado para no contaminar con otros microorganismos. Esta técnica es indispensable para estudiar, en condiciones de seguridad, microorganismos peligrosos y para evitar contaminaciones de los cultivos y otros materiales utilizados con los microbios que se encuentran en el polvo, en los dedos y en otras muchas partes.

La técnica microbiológica es esencialmente una técnica aséptica, es decir, un procedimiento por el cual el investigador excluye de su cultivo todos los microorganismos que no desea estudiar, previene la infección de su propio organismo y evita la contaminación. Crea para sí mismo, en su lugar de trabajo, un medio aséptico.

Al iniciar sus actividades debe esterilizarlo todo: Objetos de cristal, medios de cultivo y todo el material que se vaya a utilizar en el laboratorio.

Una vez preparado el cultivo, debe manejarse siempre de manera que ningún microorganismo pueda entrar o salir del cultivo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	85 de 187

En la naturaleza, casi todos los tipos de bacterias u hongos, incluyendo las especies patógenas, conviven en relación más o menos estrecha con otro tipo de bacterias y hongos, por esta razón, casi siempre el cultivo primario de cualquier procedencia será un cultivo de tipo mixto de organismos de tipos distintos. Pero en el laboratorio, las diversas especies se pueden separar unas de otras y cultivar aisladamente.

Un cultivo de una sola especie se llama "cultivo puro" o "cultivo axénico", para conocer las propiedades particulares de un organismo se debe estudiar éste en un cultivo puro.

Se llama "aislamiento del organismo" al proceso seguido para obtener un cultivo puro, separando un tipo de bacterias u hongos de una mezcla en que hay otros tipos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- 2 pipetas de 1 mL graduadas estériles.
- Matraz con agar nutritivo por grupo.
- 1 placa de Petri con agar S-110.
- 1 placa de Petri con agar nutritivo.
- 3 tubos con 9.9 mL de solución salina 0.9 %.

CEPAS

- *Staphylococcus aureus*.
- *Pseudomonas spp.*

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	86 de 187

PROCEDIMIENTO

A. Aislamiento por dilución o vaciado en placa

1. Utilizando el equipo de protección personal necesario, se fundirá el agar nutritivo a baño maría.
2. En condiciones estériles o asépticas, se tomará una asada de cultivo mixto y se suspenderá en un tubo con solución salina y se etiquetará como tubo 1.
3. Se tomará 1 mL del tubo 1 y se colocará en otro tubo con solución salina, se etiquetará como tubo 2, se tomará 1 mL del tubo 2 y se colocará en y se colocará en otro tubo con solución salina, se etiquetará como tubo 3. De tal forma que se realicen diluciones en serie, recordando que siempre se utilizaran condiciones estériles o asépticas.
4. Tomar un milímetro de las 2 últimas diluciones (tubo 2 y 3) con las pipetas utilizadas anteriormente, cuidando de flamearlas previamente y se vaciará en las cajas Petri respectivas.
5. Se verterá el agar fundido (tibio no caliente) sobre las dos cajas Petri estériles.
6. Agitar suavemente, con movimientos circulares.
7. Dejar solidificar.
8. Incubar a 37°C por 24-48 horas.

B. Aislamiento en caja de Petri por Estría cruzada

1. Esterilizar el asa y dejarla enfriar.
2. Tomar una asada del cultivo mixto y sembrar en la placa de agar nutritivo por estría cruzada (siguiendo la técnica señalada en prácticas anteriores y las indicaciones del profesor).
3. Incubar a 37° por 24-48 horas.

C. Aislamiento con medio selectivo

1. Flamear el asa y dejarla enfriar.
2. Tomar una asada del cultivo mixto.
3. Sembrar por estría cruzada sobre la placa de agar S-110.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	87 de 187

4. Incubar a 37°C por 24-48 horas.

RESULTADOS

Para leer los resultados se deberá identificar la morfología colonial para identificar de que bacteria se trata y también comparar con las cajas Petri sembradas por los diferentes métodos para diferenciar las características de su crecimiento.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Qué factores deben cuidarse al realizar el cultivo de un microorganismo?
- 2) ¿Qué es un cultivo puro?
- 3) ¿Qué tipos de nutrientes debe tener un medio de cultivo?
- 4) ¿Cuál sería la importancia de obtener cultivos puros?
- 5) ¿Cómo podemos lograr cultivos puros?
- 6) Mencione que es un cultivo primario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). Microbiología médica (9ª ed.). Elsevier.
- Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana.
- Walker, T. S. (2006). Microbiología (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	88 de 187

Mecanismos de patogenicidad y virulencia.

OBJETIVO

- Identificar los factores que determinan en cada caso si un microorganismo puede o no provocar infección.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Virulencia de los organismos.

Se debe pensar siempre que el poder patógeno de un microorganismo está en relación con un determinado huésped (hombre, animal, planta). Para expresar los diferentes grados de poder patógeno, se usa al término “virulencia”.

Evidentemente, cuanto mayor sea el número de microorganismos patógenos que penetran a los tejidos, mayor será la probabilidad de que acontezca la infección. La vía de entrada puede determinar si se producirá o no la infección

Resistencia individual al huésped.

Determina si la infección se producirá o no, así como la gravedad de la enfermedad. Un organismo virulento para algunos seres humanos, no necesariamente producirá enfermedad en otras personas.

La relación entre los factores que acabamos de exponer, se puede expresar como sigue:

E , es una función de NV/R .

Donde “E” significa enfermedad, “N” número de microorganismos patógenos, “V” virulencia y “R” resistencia del huésped.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	89 de 187

Indica que en cualquier caso de infección el poder total patógeno de los organismos (que dependen de su número y virulencia) equilibrado con la resistencia del individuo, es lo que determina la naturaleza de gravedad de la enfermedad.

En términos más simples, la patogenicidad de virulencia de los microorganismos está relacionada con su capacidad para:

- Invadir y multiplicarse en los tejidos del cuerpo.
- Intoxicar tejidos.

Cada variedad de microorganismos patógenos tiene su propio conjunto de estructuras superficiales, hábitos metabólicos y actividades enzimáticas, que se combinan para darle un determinado poder patógeno, entre ellas destacan la producción de toxinas, que se pueden clasificar en 2 categorías:

- Endotoxinas.
- Exotoxinas.

Asociado a la propiedad invasora se encuentra el poder para formar varios productos dentro de los cuales tenemos: Hemolisinas, Leucocidinas, Factores Coagulasa, Estreptoquinasa y Hialuronidasa, entre otros.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Hisopo estéril.
- Solución salina 0.9 %.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- 3 cajas de Petri con agar sangre.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	90 de 187

CEPAS

- *Staphylococcus aureus*.
- *Streptococcus pyogenes*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Siembra por estría cruzada en las cajas Petri con agar sangre

1. Respetando la técnica aséptica y esterilizando el asa antes y después de tomar cada muestra. Sembrar por estría cruzada en la caja de agar sangre cada cepa respectivamente.
2. Etiquetar e incubar a 37°C por 24 horas.
3. Observar el tipo de hemólisis y morfología colonial.
4. Se tomará una muestra de la cavidad oral (exudado faríngeo) de un voluntario con un hisopo estéril, siguiendo las indicaciones del profesor. Y se sembrará en la tercera caja de agar sangre efectuar (empleando el hisopo).
5. Etiquetar e incubar 24 hrs., a 37°C.
6. Observar el tipo de hemólisis y comparar resultados.

B. Prueba de la coagulasa

1. Obtener por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario sano, previo consentimiento del mismo.
2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100.
3. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
4. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo nuevo.
5. Respetando la técnica aséptica, tomar un inóculo (muestra) de *Staphylococcus aureus* con el asa bacteriológica estéril y suspenderla en el tubo que contiene plasma, incubar a 37°C por 90 minutos. Como paso opcional, se puede diluir 1:5 en



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	91 de 187

solución salina el *Staphylococcus aureus* antes de inocular en el plasma (pregunte a su profesor).

6. Incubar a 37°C entre 90 minutos a 4 horas.

RESULTADOS

En las cajas de agar sangre se debera reportar la morfología colonial y el tipo de hemolisis que presenta cada caja, comparando los resultados. En la prueba de la coagulasa se debera observar si se forma el coagulo entre los 90 minutos y las 4 horas, pasado este tiempo podrian darse falsos negativos.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Defina patogenicidad y virulencia?
- 2) ¿Cuántos tipos de hemólisis existen y por qué se caracteriza cada tipo?
- 3) Enuncie cuatro características de las endotoxinas.
- 4) Mencione cuatro características de las exotoxinas.
- 5) Describa brevemente 3 productos agresivos (exotoxinas) que puedan co-ayudar a la propiedad invasora de las bacterias.
- 6) ¿En qué circunstancias se puede aumentar o disminuir la virulencia de un microorganismo?
- 7) Explique la importancia de la virulencia de los microorganismos, la vía de entrada y el número de gérmenes que penetran a los tejidos, así como la resistencia del huésped.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). Microbiología médica (9ª ed.). Elsevier.
- Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana.
- Walker, T. S. (2006). Microbiología (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	92 de 187

Fisiología o metabolismo bacteriano

OBJETIVOS

- Analizar metabolismo y su importancia.
- Conocer algunas de las reacciones fisiológicas de los microorganismos mediante sembrado en diferentes medios de cultivo.
- Conocer la composición química de las células bacterianas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El metabolismo son el conjunto de reacciones o transformaciones químicas que ocurren dentro de una célula, destinadas a transformar moléculas, esto se debe llevar a cabo para que la célula o microorganismo pueda mantenerse vivo y reproducirse.

Los procesos metabólicos pueden dividirse en:

- Anabolismo, que son todas aquellas reacciones químicas dirigidas a la biosíntesis de moléculas (consumen ATP).
- Catabolismo, aquellas reacciones químicas dirigidas a la degradación de macromoléculas (producen ATP).

Composición química de las células bacterianas.

Los microorganismos, al igual que otros organismos vivos, están formados por compuestos de carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre y fósforo, junto con pequeñas cantidades de otros elementos y contienen del 80 al 90 % de agua.

Los ácidos nucleicos, son componentes esenciales de las células vivas. Pueden ser de dos tipos. Un tipo, el ácido desoxirribonucleico (DNA), transporta la información genética o hereditaria que se halla en el núcleo. El otro tipo, es el ácido ribonucleico (RNA) que se



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	93 de 187

encuentra mayormente en el citoplasma e interviene íntimamente en la síntesis de las proteínas. Los dos tipos de ácidos nucleicos contienen tres componentes iguales; un compuesto nitrogenado cíclico, llamado base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato.

Mientras que los macronutrientes (aquellos que proporcionan la mayor parte de a energia metabolica) consisten en carbohidratos, lípidos y proteínas.

Los carbohidratos en las bacterias estan presentes en forma de almidón, glucógeno y azucares mas simples (glucosa, fructosa, manosa). Los polisacáridos y los compuestos formados por combinación de carbohidratos y aminoácidos forman parte de la estructura básica de las paredes celulares bacterianas. Esto ultimo es importante ya que para la la diferenciación bacteriana son importantes los polisacáridos que se encuentran en las paredes celulares de algunos bacilos Gram negativos y en las cápsulas de gérmenes como los neumococos.

Los lípidos conformados por los ácidos grasos, ademas se pueden encontrar en forma de ceras y fosfolipidos. En muchos microorganismos, esencialmente en bacterias Gram positivas, se encuentran gotitas de sustancia lípida teñible como inclusiones celulares visibles, parece que se forman principalmente de poli-B-hidroxibutiratos. La proporción total de lípidos en los microorganismos es muy diferente según el tipo de bacteria que se trate, algunos llegan a tener hasta un 42% de su peso.

Las proteínas se componen de aminoacidos (existen 21 aminoacidos esenciales) que presentan un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino terminal (-NH₂), dentro de un microorganismo tienen funciones estructurales, pero tambien conforman a las enzimas que ayudan a catalizar (acelerar) una reaccion quimica y por lo tanto son parte importante del metabolismo. Estos compuestos orgánicos complejos que contienen nitrógeno están en las bacterias como proteínas simples (albúmina o globulina), como proteínas parcialmente degradadas (polipéptidos, peptonas), como nucleoproteínas y como proteínas conjugadas con carbohidratos o lípidos (glucoproteínas o lipoproteínas).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	94 de 187

Las enzimas en el metabolismo bacteriano

El metabolismo implica muchas reacciones integradas que no pueden realizarse sin enzimas. Se puede decir en realidad que sin enzimas no hay vida. Actúan como agentes catalíticos que permiten que las reacciones bioquímicas se realicen rápidamente con su presencia; puesto que de otra manera se realizan con extrema lentitud, o no se realizan. Un catalizador es una sustancia que acelera la velocidad de una reacción química.

Las reacciones enzimáticas de las bacterias son necesarias para que el organismo pueda:

1. Disponer de alimento en forma soluble para que pueda penetrar en las células.
2. Tener un suministro de energía necesaria para la síntesis del protoplasma, y para la respiración, reproducción, motilidad y otros procesos mentales.
3. Utilizar estos elementos nutritivos para la síntesis del protoplasma del cuerpo.

Una forma de conocer a un microorganismo es identificando que enzimas produce, de esta manera se sabe si puede o no llegar a ser patógeno.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Dos tubos con Caldo Urea.
- Dos tubos con Citrato de Simmons.
- Dos tubos con manitol rojo de fenol.
- Dos tubos glucosa rojo de fenol.
- Dos tubos con *medio* de sulfuro indol para movilidad (SIM).

CEPAS

- *Escherichia coli*.
- *Proteus vulgaris*.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página	
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	95 de 187	

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica y esterilizando el asa antes y después de tomar cada muestra. Se sembrarán los tubos con los diferentes medios de cultivo, con cada una de las cepas facilitadas y etiquetar apropiadamente cada tubo. Ejemplo, de los dos tubos del medio de SIM, uno se sembrará con *Escherichia coli* y el segundo tubo con *Proteus vulgaris*.
2. Se deberán inocular de dos en dos, en igual forma los demás tubos, de tal manera que sea comparativo.
3. Emplear la técnica de sembrado correspondiente para cada uno de los tipos de medios de cultivo, seguir indicaciones del profesor en caso de duda.
4. Incubar los tubos a 37°C por 24-48 horas.

RESULTADOS

Para la lectura del tubo con medio SIM, se observará a las 24 horas los cambios y agregaran dos gotas del reactivo de Ehrlich o el de Kovacs (dependiendo del que esté disponible), para observar si hay producción de indol y se observará a las 48 horas para verificar si hay o no producción de sulfuro de hidrogeno. La lectura de resultados se hará de manera comparativa si hay cambio de coloración del medio o no, donde se interpretarán los resultados de cada cepa, y se anotarán los resultados en un cuadro, con las características de cada una de las bacterias que se emplearon en la práctica.

CUESTIONARIO

- 1) Definir metabolismo bacteriano.
- 2) En la prueba de fermentación indique: que indicador se utilizó, que azúcar se utilizó y como se efectuó la lectura o interpretación de resultados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	96 de 187

- 3) Defina metabolismo energético y cuál es su función.

- 4) ¿Con qué fin se empleó el medio de SIM?
- 5) ¿En qué consiste el reactivo de Ehrlich y el de Kovacs?
- 6) Defina a las bacterias: autotróficas, heterótrofas, saprófitas y parásitas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2021). Microbiología médica (9ª ed.). Elsevier.
- Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana.
- Walker, T. S. (2006). Microbiología (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	97 de 187

Acción de agentes físicos y químicos sobre el crecimiento bacteriano.

OBJETIVOS

- Analizar y enumerar los factores relacionados con desinfección eficaz.
- Explicar la forma y eficacia de los métodos físicos para el control microbiano.
- Identificar los métodos de acción y usos preferidos de desinfectantes químicos.
- Interpretar los resultados del método de difusión en disco.

FUNDAMENTO TEÓRICO

A mediados de la década de 1800 Ignaz Semmelweis y Joseph Lister desarrollaron algunas de las primeras prácticas de control microbiano en los procedimientos médicos. Por ejemplo, el lavado de manos con cloruro de calcio para destruir microbios y el empleo de la asepsia quirúrgica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	98 de 187

Terminos relacionados con el control microbiano

Término	Definición
Esterilización	Proceso que destruye o elimina un objeto o ambiente todas las formas de vida microbiana, incluyendo esporas bacterianas resistentes.
Desinfección	Proceso que elimina de un objeto o ambiente gran parte, o la totalidad, de los microorganismos patógenos (excepto esporas bacterianas).
Pasteurización	Método que consiste en aplicar calor, por lo general a productos lácteos, durante un periodo específico para matar o retrasar el desarrollo de bacterias patógenas.
Biocida	Agente químico o físico, por lo común de amplio espectro.
Bactericida	Propiedad mediante la cual un biocida es capaz de matar bacterias.
Bacteriostático	Propiedad mediante la cual un biocida es capaz de inhibir la multiplicación de bacterias; al remover el agente, la reproducción reinicia.
Séptico	Estado que se caracteriza por la presencia de microbios patógenos en tejidos vivos o en fluidos relacionados.
Aséptico	Material libre de microorganismos o método para evitar el crecimiento de patógenos.
Antiséptico	Agente que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos en tejidos vivos o en fluidos biológicos
Antibiótico	Sustancia que interfiere con un paso particular del metabolismo celular; puede ser bactericida o bacteriostático.

Entre los principales metodos de control microbiano se pueden distinguir:

I. *Métodos físicos.*

- a) *Calor.* La aplicación de calor es el método más simple para esterilizar materiales, dado que estos son resistentes. Una temperatura de 100°C matará a todas las eubacterias (sin incluir esporas) en 2 o 3 minutos en cultivos de laboratorio; una temperatura de 121°C durante 15 minutos matará las esporas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	99 de 187

Calor húmedo: Es la variante más empleada. Debido a que las bacterias resultan más vulnerables en la medida en que estén más húmedas. Bajo estas condiciones, el calor generado provoca la desnaturalización y coagulación de las proteínas, en consecuencia, los puentes de hidrógeno de la membrana citoplasmática son destruidos.

b) *Radiación*. La radiación ultravioleta (UV) con una longitud de onda cercana a 260 nm genera dímeros de timidina que impiden la replicación del ADN bacteriano. Por lo general es bactericida pero no esporicida (que elimina esporas).

Existen dos tipos de radiaciones:

- Radiación ionizante: Los rayos gamma, rayos x y rayos catódicos, ejercen acción letal por su capacidad de modificar diversas estructuras, el ADN y las proteínas celulares, no solo por sus propiedades ionizantes, sino, además, por su elevada capacidad de penetración.
- Radiación no ionizante: Las radiaciones no ionizantes tienen poca capacidad de penetración. Su efecto esterilizante depende de que la energía propagada, procedente de sus radiaciones electromagnéticas (luminosas) sea absorbida por la célula microbiana, oxidando las proteínas y los ácidos nucleicos, para dar lugar a la inactivación de las enzimas, mutación genética o muerte.

II. Métodos químicos.

a) Alcoholes. Estos agentes remueven de manera efectiva el agua de los sistemas biológicos. La actividad germicida de los alcoholes aumenta al aumentar la longitud de su cadena (máximo de 5 a 8 átomos de carbono). El alcohol etílico, el alcohol isopropílico y el n-propanol tienen un espectro rápido y amplio de actividad antimicrobiana contra bacterias, virus y hongos. La actividad es mayor en presencia de agua. Por lo tanto, el alcohol al 70% es más efectivo que el alcohol al 90%.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	100 de 187

- b) Aldehídos. Los aldehídos ejercen su efecto mediante alquilación. El glutaraldehído o el formaldehído se utilizan para desinfectar y esterilizar instrumentos, endoscopios y herramientas quirúrgicas a baja temperatura. Por lo general, se aplican en forma de solución de 2% para lograr una actividad esporicida. Estos compuestos por lo común son bactericidas y esporicidas.
- c) Bisfenoles. Se utilizan en jabones antisépticos y enjuagues para manos. En general tienen actividad microbicida de amplio espectro, pero su efecto es limitado contra *Pseudomona aeruginosa* y mohos. El triclosan y el hexaclorofeno son bactericidas y esporostáticos (no esporicidas).
- d) Agentes liberadores de halógenos. Los tipos más importantes de agentes liberadores de cloro son el hipoclorito de sodio, el dióxido de carbono y el dicloroisocianurato sódico, los cuales son moléculas oxidantes que impiden la actividad celular de las proteínas. El ácido hipocloroso es el compuesto activo responsable del efecto bactericida de estos compuestos.
- El yodo (I₂) es un bactericida y esporicida de acción rápida. Los yodóforos (por ejemplo: la povidona yodada) son complejos de yodo y un agente portador o para disolución, que actúa como reservorio del I₂ activo.
- e) Peroxígenos. Como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que tiene una actividad de amplio espectro contra virus, bacterias, levaduras y esporas bacterianas. La actividad esporicida requiere de concentraciones mayores (de 10% a 30%) de H₂O₂ y un tiempo de contacto más prolongado.
- f) Fenoles. El fenol y los compuestos fenólicos tienen propiedades antisépticas, desinfectantes o preservativas. En general, no son esporicidas (lo es a temperaturas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	101 de 187

próximas a 100°C). Es poco activo frente a virus que no contienen lípidos. Se utilizan rara vez como desinfectantes.

Se cree que el fenol actúa desorganizando las membranas que contienen lípidos, lo que da lugar a la salida del contenido celular. Los compuestos fenólicos son eficaces frente a las micobacterias (que generalmente son resistentes), porque su pared celular tiene una concentración muy elevada de lípidos.

g) Compuestos de amonio cuaternario. Estos compuestos tienen dos estructuras en sus regiones moleculares, un grupo que repele el agua y otro que es afín al agua (hidrófobo e hidrófilo). La actividad germicida de estos compuestos está determinada por la naturaleza de los grupos orgánicos, de modo que la mayor actividad se observa con compuestos que tiene grupos de 8 a 18 átomos de carbono de longitud.

Los detergentes catiónicos, como los compuestos de amonio cuaternario (QAC, por sus siglas en inglés), son antisépticos y desinfectantes eficientes. Son esporostáticos; inhiben el crecimiento de esporas, pero no el proceso de germinación.

Otros ejemplos de los compuestos de amonio cuaternario son el cloruro de benzalconio y el cloruro de cetilpridinio. Estos compuestos actúan desnaturalizando las membranas celulares para liberar sus componentes intracelulares. Son bacteriostáticos a concentraciones bajas y bactericidas a concentraciones elevadas; sin embargo, bacterias como *Pseudomonas* y *Mycobacterium* y el hongo *Trichophyton* son resistentes a ellos.

Metodo de difusión en disco.

Este metodo se utiliza en laboratorios de práctica para evaluar la eficacia de un agente químico. Un disco de papel filtro se impregna con una sustancia química y se coloca sobre una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo de prueba. Si la sustancia química es eficaz después de la incubación se puede observar un halo que representa la inhibición del crecimiento alrededor del disco, como una zona clara.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	102 de 187

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- 4 cajas de Petri con agar nutritivo.
- Tubo con discos de papel filtro.
- Pinzas de disección.
- Regla de plástico graduada.
- Cajas de petri estériles o tubos de ensayo estériles.
- Fenol al 5%.
- Lugol al 5%.
- Alcohol 70%.
- Detergente.

CEPAS

- *Bacillus subtilis*.
- *Staphylococcus aureus*.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica y esterilizando el asa y tubos antes y después de tomar cada muestra.
2. Sembrar por estría masiva *Bacillus subtilis* en una caja Petri y *Staphylococcus aureus* en otra caja Petri ambas con agar nutritivo.
3. Colocar en una caja Petri limpia o un tubo, una cantidad suficiente de cada solución.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	103 de 187

4. Sumergir un disco de papel filtro en una de las soluciones. Recordar flamear las pinzas antes de manipular el disco.
5. Coloca el disco (impregnado y sin escurrir) en cada una de las siembras en caja Petri con agar nutritivo. Procurando que tengan una separación entre disco y disco (2 cm aproximadamente) de tal forma que se puedan leer los resultados y no haya confusiones. Presiona el disco para que quede firme.
6. Repetir los pasos anteriores con cada solución y con cada caja Petri sembrada.
7. Incubar a 37° C por 24 horas.
8. Para realizar la lectura utilizaremos una regla. Mediremos el campo que creó nuestra sustancia (en milímetros).

RESULTADOS

Para realizar la lectura se utilizara una regla y se medira el diametro que creo la sustancia (en milimetros), a esto se le resta el diametro del papel filtro y el resultado se considera como el halo de inhibicion. Tambien se observara si hay o no crecimiento.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es la acción de la luz ultravioleta sobre el material genético de las bacterias?
- 2) ¿Cuáles son los riesgos de la sobreexposición al uso de la luz ultravioleta?
- 3) ¿Cuáles son los principales agentes químicos utilizados en los hospitales?
- 4) Si la pasteurización no logra la esterilización, ¿Por qué los alimentos se tratan por pasteurización?
- 5) Mencione cinco factores que deben considerarse antes de seleccionar un desinfectante.
- 6) Indique el mecanismo de acción y al menos un uso habitual de cada uno de los siguientes tipos de desinfectantes: Yodo, Cloro, Alcohol y Derivados fenólicos.
- 7) ¿Cómo es el mecanismo de acción de los detergentes?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	104 de 187

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011).

Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.

González Alfaro, J. (2004). Laboratorio de microbiología: Instrumentación y principios básicos. Editorial Ciencias Médicas.

Murray, P. R., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2017). Microbiología médica (7ª ed.). Elsevier.

Riedel, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., y Miller, A. (2020). Microbiología medica Jawetz, Melnick y Adelberg (28ª ed.). McGrawHill.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	105 de 187

Antibiograma.

OBJETIVOS

- Analizar la acción de los antibióticos *in vitro* para conocer la sensibilidad bacteriana.
- Conocer pruebas para una mejor selección de antibióticos.
- Comprender la técnica e interpretación de un antibiograma.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los antibióticos difieren de los desinfectantes corrientes, porque muestran una toxicidad selectiva para los microorganismos patógenos, sin causar graves daños a la mayoría de las células de los tejidos.

Algunos antibióticos son efectivos contra un número más o menos importante de organismos patógenos; mientras que otros conocidos como antibióticos de amplio espectro, actúan sobre una gama extensa de diferentes microorganismos patógenos.

Cuando el médico reconoce por primera vez un paciente con enfermedad infecciosa, puede prescribir de momento un antibiótico, escogiendo el que parece más indicado para el cuadro clínico basado en la epidemiología de la enfermedad.

En caso de que el paciente no presente mejoría después de completar el esquema de antibiótico o incluso cuando presente infecciones repetitivas en periodos de tiempo muy corto, se deben indicar estudios especializados. Es de desear, por lo tanto, que se obtengan muestras adecuadas del paciente antes de administrar el medicamento y enviarlas a laboratorio de bacteriología para identificar el microorganismo responsable.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	106 de 187

Una vez aislado este, debe comprobarse la sensibilidad a todos los antibióticos comunes y otros agentes antimicrobianos. El resultado final orienta al médico respecto al tratamiento adecuado.

En pacientes con infecciones subagudas o crónicas que requieren una terapia antimicrobiana continua, es importante que las pruebas de sensibilidad se realicen sobre las bacterias del paciente, aisladas a intervalos frecuentes durante el curso de la enfermedad, para poder descubrir la aparición de cepas que se hubieran vuelto resistentes a los antibióticos utilizados, en cuyo caso deberían de sustituirse por un antibiótico diferente o una combinación de antibióticos.

Acorde a lo anterior, podemos decir que un antibiótico es una sustancia química derivada de un origen vivo, que es capaz de inhibir, o incluso destruir el crecimiento de microorganismos.

La selección racional de las drogas antimicrobianas dependen de:

- a) Diagnóstico.
- b) Pruebas de sensibilidad.
- c) Titulación de la actividad bactericida en suero.

Las pruebas de laboratorio para determinar la sensibilidad de los antibióticos se encuentran indicadas en las siguientes circunstancias:

1. Cuando el microorganismo aislado es frecuentemente resistente a las drogas antimicrobianas. (Por ejemplo, en el caso de bacterias entéricas Gram negativas).
2. Cuando un proceso infeccioso es grave y parece ser mortal a menos que sea tratado específicamente. (Por ejemplo, meningitis ó septicemia).
3. En ciertas infecciones en las que la erradicación de los organismos infecciosos requiere de drogas que sean rápidamente bactericidas y no solamente bacteriostáticas. (Por ejemplo, endocarditis bacteriana y osteomielitis aguda).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	107 de 187

Existen dos métodos más empleados para efectuar esta prueba y son:

- I. De dilución en tubo.
- II. De los discos de papel filtro (Difusión en discos).

En esta práctica se emplea la técnica de difusión en discos. Hoy en día el antibiograma es una prueba que podemos decir de “rutina”, en los lugares de atención médica, por lo que es importante enfatizar que las condiciones bajo las cuales los gérmenes se enfrentan a los antibióticos *In vitro*, son muy diferentes a las que existen en el paciente. La realización de un antibiograma se basa en el patrón de resistencia de cada bacteria. Con un antibiograma se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico, o cuantitativos que determinan la concentración mínima (CMI) de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano (en $\mu\text{g}/\text{mL}$ o en mg/L). Las técnicas de dilución determinan la CMI utilizando un medio líquido (dilución en caldo) o un medio sólido (dilución en agar) para disolver las diferentes concentraciones del antimicrobiano. Las técnicas de difusión emplean discos de papel impregnados con una solución estandarizada de antibiótico que se disponen sobre la superficie de un medio sólido previamente inoculado en su superficie con una suspensión bacteriana. La carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición permitan diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes y pueda establecerse una correlación con los valores de CMI: halos pequeños se relacionan con valores altos de CMI (resistentes) y halos grandes con CMI bajas (sensibles).

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Dos cajas de Petri con agar nutritivo.
- Pinzas de disección.
- Equipo de sensidiscos (para Gram positivo y Gram negativo).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	108 de 187

CEPAS

- *Escherichia coli*.
- *Staphylococcus aureus*.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica y esterilizando el asa y tubos antes y después de tomar cada muestra.
2. En cada una de las cajas de agar nutritivo sembrar una con *Escherichia coli* y la otra con *Staphylococcus aureus*, abundantemente, por la técnica de estría cerrada (barrido).
3. Colocar con las pinzas los sensibilizadores para Gram positivo (*Staphylococcus aureus*) y para Gram negativo (*Escherichia coli*), en las respectivas cajas.
4. Presionar suavemente el unidisco en el agar.
5. Incubar 24 horas a 37 °C.

RESULTADOS

Con una regla graduada en milímetros medir el diámetro de las zonas claras que rodean a los discos, en la base de cada caja anotar con el marcador qué tipo de antibiótico tiene cada uno de los discos, para obtener una buena lectura. Mientras mas sensible la bacteria el halo de inhibición es mas grande, si el halo es minimo o muy pequeño nos referimos a una bacteria resistente, analizar los resultados y proponer el antibiotico de primera eleccion así como los antibióticos de segunda lección.

CUESTIONARIO

- 1) Defina antibiótico.
- 2) Defina antibiograma y concentración mínima inhibitoria.
- 3) Mencione 5 antibióticos para gérmenes Gram positivos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	109 de 187

- 4) Mencione cinco antibióticos para gérmenes Gram negativos.
- 5) Mencione cuáles son las indicaciones para efectuar un antibiograma en un paciente.
- 6) En cada una de sus cajas que antibiótico es el de primera elección para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- 7) ¿Cuáles son los peligros del uso indiscriminado de los antibióticos?
- 8) ¿Está indicado el uso de combinaciones de antibióticos?, fundamente su respuesta.
- 9) Explicar las limitaciones actuales de la terapia antibiótica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.
- González Alfaro, J. (2004). Laboratorio de microbiología: Instrumentación y principios básicos. Editorial Ciencias Médicas.
- Murray, P. R., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2017). Microbiología médica (7ª ed.). Elsevier.
- Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana. 4ª edición. 2018.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	110 de 187

Microorganismos patógenos y enfermedad.

OBJETIVOS

- Observar e identificar el cumplimiento e importancia de los postulados de Koch
- Comprender la importancia de la etiología microbiana en la enfermedad.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En 1880, Robert Koch trabajaba con la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Dicho organismo poseía un gran interés debido a que los investigadores sospechaban que era el causante de la extendida y a veces mortal infección llamada Tuberculosis, Koch realizó dos importantes descubrimientos; encontró una manera de teñir los tejidos humanos para su observación al microscopio para observar las células con *Mycobacterium tuberculosis* observandolas como finos bacilos de color azul sobre un fondo marrón de células humanas.

También descubrió que *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria de crecimiento lento y muy dificultoso pues en el laboratorio podía cultivarse en suero de sangre coagulada. Basándose en estos hallazgos, Koch demostró que *Mycobacterium tuberculosis* era el agente causal de la tuberculosis.

En aquella época no se había demostrado la existencia de relación alguna entre el microorganismo y dicha enfermedad; en realidad, no se había podido probar que un determinado microorganismo causará una enfermedad en particular. Koch comenzó su búsqueda examinando pacientes tuberculosos para detectar la presencia de células de *Mycobacterium tuberculosis*.

Koch encontró que la bacteria estaba presente en las muestras de todos los pacientes con tuberculosis (bacilos azules sobre el fondo marrón del tejido). Posteriormente, Koch cultivó las bacterias en suero de sangre coagulada y aisló cultivos puros de *Mycobacterium*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	111 de 187

tuberculosis, que inoculó en cobayas que morían posteriormente de *tuberculosis*. Por tanto, sin lugar a duda, *Mycobacterium tuberculosis* causaba la *tuberculosis*.

El trabajo de Koch con *Mycobacterium tuberculosis* constituyó un avance decisivo para el impulso de la microbiología, ya que proporcionó las pruebas decisivas para demostrar la etiología, o causa, de una importante enfermedad infecciosa del ser humano. Además, enunció unos principios que siguen siendo válidos en la actualidad, los postulados de Koch, cuyo cumplimiento proporciona pruebas irrefutables de que un microorganismo en particular causa una determinada enfermedad. De manera general, estos postulados incluyen:

1. El microorganismo causal debe encontrarse en todos los individuos que presentan la enfermedad.
2. Dicho microorganismo debe ser aislado en cultivo puro (axénico), si obtiene del individuo enfermo.
3. El cultivo puro debe causar la enfermedad cuando se inocula a un animal de experimentación.
4. El microorganismo causal debe ser aislado de nuevo a partir del animal de experimentación e identificado otra vez en cultivo puro (debe tener las características del microorganismo original).
5. Obtener exotoxinas bacterianas inoculadas en animales en experimentación y estudio del cuadro clínico.

Por supuesto, los postulados de Koch no pueden cumplirse si no es posible cultivar el microorganismo patógeno o si únicamente infecta a seres humanos.

El mismo Koch se enfrentó a este problema pues descubrió que una bacteria, *Vibrio cholerae*, se encontraba en los intestinos de todos los enfermos que examinaba y fue capaz de cultivar el microorganismo; sin embargo, no podía hallar un animal de experimentación que fuera susceptible de contraer la enfermedad. Finalmente, el tercer postulado pudo por fin cumplirse cuando un médico que estudiaba en el instituto de Koch ingirió accidentalmente bacterias del cólera y desarrolló la enfermedad.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	112 de 187

Los postulados de Koch no son la única vía para demostrar la etiología de una determinada enfermedad, ya que existen una serie de infecciones cuya etiología se conoce, aunque no cumplan dichos postulados.

Tal es el caso de *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis, que como nunca ha podido ser cultivado en un medio en el laboratorio no puede cumplir con los postulados de Koch. Tampoco los patógenos víricos pueden determinarse de acuerdo con estos postulados ya que solamente se reproducen en el interior de células vivas. Para determinar el agente etiológico de una infección vírica se utilizan los postulados de Rivers, enunciados por T.M. Rivers en la década de 1930.

1. El agente vírico debe encontrarse en los fluidos del hospedador animal cuando se produce la enfermedad o en las células infectadas.
2. El agente vírico obtenido a partir del hospedador infectado debe causar la enfermedad en un animal o vegetal sano o debe inducir la síntesis de anticuerpos (proteínas producidas por el hospedador como respuesta a la infección).
3. Los agentes víricos aislados del animal o vegetal así infectados, deben a su vez transmitir la enfermedad a otro hospedador.

Con el desarrollo de técnicas avanzadas en biología molecular actualmente puede demostrarse que un agente patógeno (bacteria, hongo y virus) puede generar una enfermedad, por lo que actualmente prácticamente todos los microorganismos cumplen con los postulados de Koch, pero siempre es pertinente recordar que los postulados de Koch “tradicionales” siguen siendo un referente en la microbiología.

Tradicionalmente se han usado animales para la enseñanza de distintas disciplinas científicas. La reacción de los estudiantes ante la experimentación con animales vivos y conscientes provocó que en 1876 el Parlamento británico aprobara la primera ley en contra de la vivisección. Uno de los argumentos más relevantes para justificar el uso de animales en la enseñanza sea que las disecciones proporcionan un tipo de conocimiento práctico



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	113 de 187

que el conocimiento teórico no puede, sin embargo, el trato bioético hacia los animales de experimentación resulta evidentemente más relevante que el conocimiento práctico adquirido. Actualmente, México se ha sumado a los tratados internacionales como el World Medical Association Statement on Animal use in biomedical research en los que se comprometen a evitar el uso de animales de experimentación en la enseñanza médica (y ciencias afines) e implementar modelos alternativos como simuladores o cultivos celulares. Por ello, en esta práctica se sugiere la sustitución de animales de experimentación y se propone realizar una versión modificada de la práctica como un estudio “doble ciego”, es decir que los alumnos no conozcan las cepas con las que están trabajando hasta que realicen el análisis de resultados, de tal manera que pueden comprobar los postulados de Koch sin utilizar animales de experimentación.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Gradilla.
- Jeringas estériles.
- Ratón (no necesario en la técnica modificada)
- Colorantes para tinción de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina. durante 30 segundos.
- Solución salina 0.85% estéril (2 mL en un tubo)
- Caja de Petri con agar eosina azul de metileno (EMB).
- Caja de Petri con agar gelosa simple.
- Caja de Petri con agar verde brillante.
- Tubo con Citrato de Simmons.
- Tubo con Caldo Urea.
- Tubo manitol rojo de fenol.
- *Tubo con medio de sulfuro indol para movilidad (SIM).*
- *Tubo con agar hierro triple azúcar (TSI).*
- *Tubo con Agar lisina hierro (LIA).*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	114 de 187

CEPAS

- *Escherichia coli*.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Primera parte.

1. El profesor explicará los cuidados y correcta manipulación de los animales de experimentación, si se utiliza un modelo murino (ratón) el alumno deberá limpiar el área abdominal del ratón e inoculará por vía intraperitoneal 1 mL de una suspensión del microorganismo proporcionado. Se puede tener un ratón de control inoculando por vía intraperitoneal 1 mL de agua destilada estéril. En caso de no utilizar animales de experimentación los alumnos podrán practicar en un modelo anatómico simulado de ratón administrando solamente de 1 mL de solución salina.
2. Realizar un frotis de la cepa proporcionada y teñirla por la técnica de Gram, observarla al microscopio a 10x y 40x.
3. Respetando la técnica aséptica (esterilizando el asa y tubos antes y después de tomar cada muestra). Inocular la cepa en las cajas Petri con los medios EMB, gelosa simple y verde brillante, etiquetar las cajas apropiadamente.
4. Inocular la cepa en los tubos con Citrato de Simmons, Caldo Urea, Manitol rojo de fenol, SIM, TSI y LIA, etiquetar los tubos.
5. Incubar 24-48 horas a 37°C. Leer los resultados y guardar todas las cajas Petri con los medios de cultivo para la siguiente práctica.
6. Si se trabaja con el animal de experimentación, se debe realizar diariamente observaciones anotando las anomalías que se presentan en el transcurso de la semana posterior a la inoculación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	115 de 187

B. Segunda parte.

a) En caso de trabajar con animal de experimentación.

1. Después de revisar con el profesor la sintomatología presentada por el animal de experimentación y se propondrán las probables patologías (diagnóstico presuntivo). Anestesiarse al ratón, limpiar el área abdominal y por punción aspirar 2 mL de líquido peritoneal. Colocarlo en un tubo con solución salina estéril, homogeneizar. Se dispondrá del animal experimental acorde a las normativas correspondientes, por lo que se devolverá al interlaboratorio.
2. Realizar un frotis con lo obtenido del líquido peritoneal.
3. Teñirlo por la técnica de Gram.
4. Hacer un aislamiento en los medios de cultivo y pruebas bioquímicas e incubar a 37° por 24-48 horas.
5. Anotar la morfología colonial obtenida en los diferentes medios de cultivo y los resultados de las pruebas bioquímicas. Comparar los resultados de las dos sesiones.
6. Realizar la observación de la morfología microscópica por medio de la tinción de Gram.

b) En caso de no trabajar con el animal experimental.

1. Seleccionar junto con su profesor un medio de cultivo empleado en la práctica anterior procurando observar la morfología colonial y realizar un frotis de la colonia más característica.
2. Teñir el frotis por la técnica de Gram.
3. Del medio de cultivo seleccionado, obtener un inóculo y hacer un aislamiento en los medios de cultivo y pruebas bioquímicas e incubar a 37° por 24-48 horas. Leer los resultados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	116 de 187

RESULTADOS

Para la primera parte se deberán registrar la morfología colonial, lo observado en la tinción de gram, los resultados de las pruebas bioquímicas y la sintomatología que presente el animal experimental (si es el caso).

Para la segunda parte se registrarán los mismos datos que la primera parte y se compararán los resultados. Se realizará el análisis de los resultados.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Qué importancia tienen los postulados de Koch?
- 2) ¿Cuáles son las características bioquímicas más importantes del germen empleado en la práctica?
- 3) ¿Qué otros factores determinan las características de las enfermedades infecciosas?
- 4) Defina etiología microbiana.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., y Adelberg, E. A. (2011). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25ª ed.). McGrawHill.
- González Alfaro, J. (2004). Laboratorio de microbiología: Instrumentación y principios básicos. Editorial Ciencias Médicas.
- Murray, P. R., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2017). Microbiología médica (7ª ed.). Elsevier.
- Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana.
- Vemulapalli, T. H., Donkin, S. S., Lescun, T. B., O'Neil, P. A., y Zollner, P. A. (2017). Considerations when writing and reviewing a higher education teaching protocol involving animals. [Consideraciones al escribir y revisar un protocolo de enseñanza de educación superior que involucre animales]. Revista de la Asociación Estadounidense de Ciencias de los Animales de Laboratorio: JAALAS, 56(5), 500-508.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	117 de 187

MÓDULO 2. Crecimiento y Desarrollo Intrauterino.

Reacciones de precipitación en gel (Ouchterlony).

OBJETIVO

- Analizar, efectuar y comprender como se realiza una reacción de precipitación por medio de pruebas inmunológicas de laboratorio.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Uno de los principales retos de la ciencia médica moderna es la traducción de los adelantos básicos de la inmunquímica y la inmunobiología en procedimientos de diagnóstico y terapéutica que serán de utilidad en la práctica de la medicina clínica.

Las pruebas inmunológicas son de gran importancia y utilidad para el diagnóstico y tratamiento de los trastornos clínicos, así como el mejor entendimiento de la patogenia de las enfermedades como la investigación científica básica en inmunología.

El fundamento de la mayoría de las pruebas inmunológicas es la unión antígeno (Ag) – anticuerpo (Ac). Las interacciones antígeno-anticuerpo pueden dividirse en 3 categorías:

- Primaria
- Secundaria
- Terciaria

La interacción primaria o inicial de antígeno y anticuerpo es el acontecimiento fundamental; consiste en la unión de antígeno con una molécula de anticuerpo. La medición de las interacciones primarias de antígeno-anticuerpo puede lograrse con varias técnicas, (precipitación de sulfato de amonio, inmunofluorescencia, marca con ferrita etc.) estos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	118 de 187

métodos están alcanzando valor clínico para medir anticuerpos importantes en los procesos patológicos.

Las manifestaciones secundarias de la reacción antígeno-anticuerpo incluyen:

- Precipitación
- Aglutinación
- Reacciones que dependen del complemento
- Neutralización
- Efectos citotrópicos

Estas reacciones tienen importancia práctica para el médico, ya que constituyen la base de cierto número de pruebas de laboratorio utilizadas para descubrir e identificar antígenos, anticuerpos o complejos de antígeno-anticuerpo que intervienen en procesos patológicos.

Las manifestaciones terciarias de las interacciones antígeno-anticuerpo, son expresiones biológicas consecuencia de dicha interacción y pueden ser útiles para el paciente, pero en otras ocasiones son causa de enfermedad por lesión inmunológica.

Pueden obtenerse aún más datos sobre las reacciones complejas entre antígeno y anticuerpo mediante un método simple, desarrollado principalmente por Ouchterlony en Suecia, que consiste en poner soluciones de antígeno y anticuerpo en pocillos separados dispuestos en una placa de agar. Con este método son posibles muchas alineaciones geométricas.

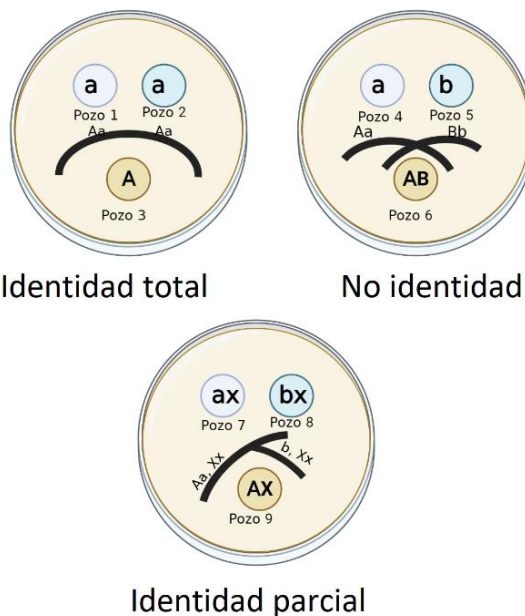
Los reactivos se difunden a partir de los pocillos, y se forman bandas de precipitación, si la concentración de anticuerpo introducido se halla en cantidad excesiva en relación con el antígeno, la banda se forma, en primer lugar, junto a la cavidad del antígeno; y ocurre a la inversa si el antígeno se introduce en cantidad relativamente excesiva.

Las disposiciones que se muestran en la siguiente figura son particularmente útiles para comparar los antígenos o antisueros ante la presencia de componentes idénticos o que muestran reacción cruzada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	119 de 187

Reacciones de precipitación por doble difusión en el gel de agar que muestran reacciones de identidad, no identidad e identidad parcial.



En "A" (identidad total) se colocó el mismo antígeno en los pocillos 1 y 2, y el anticuerpo se hallaba en el pocillo 3.

En "B" (no identidad) se colocaron distintos antígenos en los pocillos 4 y 5 y el anticuerpo para ambos se hallaba en el pocillo 6.

En "C" (identidad parcial) el antígeno y su correspondiente anticuerpo estaban en los pocillos 7 y 9 respectivamente, y el pocillo 8 se colocó un antígeno de reacción cruzada.

Si se pone una solución de antígeno en dos pocillos adyacentes, y se coloca el anticuerpo homólogo en el pocillo central, se observa que las dos bandas de precipitación se unen en sus extremidades contiguas y se funden, este tipo llamado reacción de identidad se observa siempre que reaccionan sistemas de antígeno-anticuerpo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	120 de 187

Por otra parte, si se colocan los antígenos no relacionados en pocillos adyacentes y difunden hacia un pocillo central que contiene anticuerpos para cada uno de ellos, las dos bandas de precipitación se forman independientemente y llegan a cruzarse, lo llamamos reacción de no identidad.

No obstante, si el antígeno situado en uno de los pocillos y el antisuero que se halla en el pocillo central constituye un par de homólogo, y el antígeno emplazado en un pocillo adyacente presenta reacción cruzada, las bandas de reacción se funden y además forman una reacción cruzada, y se le llama reacción de identidad parcial o reacción cruzada.

Uno de los inconvenientes del ensayo de Ouchterlony en la enseñanza en los laboratorios es el tiempo en que tardan las moléculas de los antígenos y anticuerpos (ambos de origen proteico) en difundir entre sí ya que el ensayo puede demorar hasta 48 horas para un completo desarrollo, esto compromete la estabilidad de las proteínas y la especificidad de los mismos. Por otra parte los antígenos y anticuerpos son consumibles costosos que requieren cuidados específicos, presentando una vida útil muy corta a temperatura ambiente. Por lo que, con la finalidad de reducir el alto costo de producción de los antígenos y anticuerpos, así como el tiempo del ensayo, en esta práctica se propone el uso de sales iónicas inorgánicas que resultan más estables a temperatura ambiente, de bajo costo y con una vida útil más prolongada. Sugerimos que el profesor y los alumnos realicen un análisis crítico de los resultados considerando que las sales son un sustituto de los antígenos y anticuerpos, que ofrecen la formación de los patrones obtenidos en el ensayo de Ouchterlony.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Pipeta Pasteur o Campana de Durham.
- Gradilla.
- Caja de Petri con agar noble 1.2%.
- Soluciones anticuerpo: BaCl_2 (antisuero 1), AgNO_3 (antisuero 2) y MnSO_4 (antisuero 3).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	121 de 187

- Soluciones antígeno: AgNO_3 (antígeno A), CuSO_4 (antígeno B), MgSO_4 (antígeno C), Na_3PO_4 (antígeno D) y NH_4Cl (antígeno E).
- Agua destilada.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Usando un extremo de una pipeta Pasteur de vidrio o la campana de Durham hacer pozos del mismo tamaño (6.5 mm) en el agar (caja de petri) acorde a la distribución de la Fig.1. y un pozo central de (9 mm). Teniendo en cuenta que la caja de petri se puede dividir en dos o simplemente hacer solo un lado del experimento (a criterio del profesor de mesa).
2. Añadir 50 microlitros (1 gota) de cada solución a su pozo respectivo y 70 microlitros (1 a 2 gotas para cada anticuerpo) al pozo central que contiene el anticuerpo.
3. Dejar incubando a temperatura ambiente por 24 horas. Anotar los resultados obtenidos (bandas de precipitación) y realizar una interpretación.

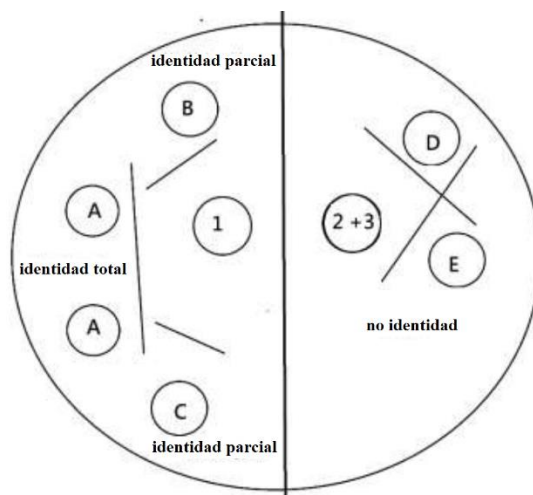


Figura 1. Esquema caja de petri con agar para el experimento.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	122 de 187

CUESTIONARIO

- 1) Defina antígeno, anticuerpo y valencia.
- 2) Defina inmunoprecipitación y aglutinación.
- 3) ¿Qué importancia tienen las pruebas inmunológicas para el área médica?
- 4) ¿Qué factores pueden alterar los resultados de estas pruebas?
- 5) De manera general ¿Qué importancia tiene para el médico las reacciones antígeno anticuerpo?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., y Shiv Pillai. (2020). *Inmunología básica* (6ª ed.). Elsevier.

Bonifaz, J. A. (2020). *Micología médica básica* (6ª ed.) McGraw Hill.

Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P.J. (2015). *Roitt Inmunología. Fundamentos* (12ª ed.). Editorial Panamericana.

Mujtaba MG, Baliban T, Bhagu J, Herrera M. (2021.) A laboratory exercise simulating antibody and antigen reactions of the Ouchterlony double immunodiffusion assay using inorganic salts. *J Microbiol Biol Educ* 22:e00103-21. <https://doi.org/10.1128/jmbe.00103-21>.

Murphy, K., Weaver, C. (2019). *Inmunología de Janeway. Manual Moderno*.

Murray, P. S., y Rosenthal, K. S. (2021). *Microbiología médica* (9ª ed.). Editorial Elsevier.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	123 de 187

Reacciones de precipitación en capilar.

OBJETIVO

- Analizar cómo se realiza una reacción de precipitación por medio de pruebas inmunológicas y su interpretación.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las reacciones de precipitación tienen lugar cuando Ag (antígeno) y Ac (anticuerpo) se hallan en forma soluble.

Prueba cuantitativa de precipitación en medio líquido

Las reacciones de precipitación en medio líquido (conocidas anteriormente como pruebas de precipitina) pueden analizarse cuantitativamente, y determinan la cantidad Ag-Ac existente en el precipitado.

En esta práctica, se emplean una serie de capilares, una cantidad del precipitado que varía dependiendo de la proporción de los reactivos, pues si colocamos en éstos capilares el mismo volumen de antisuero (pero cantidades decrecientes), el precipitado alcanza un máximo, y poco a poco hay una disminución de éste.

En estas experimento se han distinguido 3 formas:

- Zona de exceso de anticuerpo: En el cual, la proporción entre Ag y Ac es elevada, y el exceso de anticuerpo no se combina y queda demostrable en el líquido.
- Zona de proporciones óptimas o equivalencia: Todo el Ag y todo el Ac se combinan y han precipitado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	124 de 187

→ Zona de exceso de antígeno: Hay Ag libre en el líquido que sobrenada.

En esta practica, nuevamente se decide hacer uso de sales iónicas inorgánicas que resultan mas estables a temperatura ambiente, de bajo costo y con una vida útil mas prolongada. Sugerimos que el profesor y los alumnos realicen un analisis crítico de los resultados considerando que la sales son un sustituto de los antígenos y anticuerpos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Agua Destilada.
- Plastilina en bloque.
- 10 Tubos de ensaye.
- Lapiz de cera.
- Pipeta de vidrio de 1 mL graduada.
- Caja de Petri con agar noble 1.2%.
- Tubos capilares.
- Soluciones anticuerpo: $BaCl_2$ (antisuero 1).
- Soluciones antígeno: $AgNO_3$ (antígeno A).

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Se realizaran las diluciones seriadas en los 9 tubos de ensaye con el Ag y con el agua destilada (Cuadro 1).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	125 de 187

	Tubo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Antígeno	5 mL	1 mL del T1	1 mL del T2	1 mL del T3	1 mL del T4	1 mL del T5	1 mL del T6	1 mL del T7	1 mL del T8
H ₂ O bd	0 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

- Para ello se agregará en cada tubo 1 mL de agua destilada, luego tomar del tubo 1 la cantidad de 1 mL y pasarlo al tubo siguiente, y así hasta terminar con todos los tubos.
- Con la supervisión de su profesor de mesa se realizará la preparación de los capilares.
- Se dividirán los capilares en 4 partes iguales y se marcarán con un lápiz de cera.
- Se introducirá cada capilar dentro del tubo correspondiente con el antígeno y por capilaridad se dejará hasta la 1era cuarta parte, a cada capilar le corresponde un tubo de la dilución.
- El capilar se gira a 180° para dejar que descienda el líquido.
- Por el extremo no utilizado, se llenará la otra cuarta parte con el anticuerpo, teniendo cuidado de que no existan burbujas que impidan la mezcla entre el Ag y el Ac.
- Se mezclarán los capilares con movimientos oscilatorios, para que el Ag y el Ac se unan y mezclen perfectamente, cuidar que no se vaya a salir el líquido por los extremos (se recomienda el uso de guantes).
- Se tendrá un volumen final y se realizará el sellado por calor de cada extremo evitando que el calor toque el líquido dentro del capilar.
- Se repetirá el mismo procedimiento de llenado de los capilares con cada tubo y sus diferentes diluciones.
- Se tendrá un tubo capilar testigo con el Ag (tubo 1), y otro con el Ac (Tubo 10).
- Se identificará cada capilar y se colocarán en el bloque de plastilina, dejándolos a temperatura ambiente por 24 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	126 de 187

RESULTADO

Efectuar lecturas y leer la cantidad de precipitado en milímetros. Para reportar los resultados, se efectuará una gráfica donde se muestre la zona de exceso de Ag, zona de equivalencia y zona de exceso de Ac. Colocando en el eje de las abscisas la disolución del tubo, y en las ordenadas los milímetros de precipitado.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Qué ventajas presenta este método, en relación con la reacción de precipitación en gel?
- 2) ¿Qué importancia médica tiene este método?
- 3) ¿Cuándo estaría indicado un estudio de esta índole?
- 4) ¿Cuál es el objetivo de efectuar diluciones?
- 5) Explique la inmunidad humoral y celular.
- 6) Explique la curva (gráfica) de la relación Ag-Ac.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., y Shiv Pillai. (2020). Inmunología básica (6ª ed.). Elsevier.
- Bonifaz, J. A. (2020). Micología médica básica (6ª ed.) McGraw Hill.
- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P.J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12ª ed.). Editorial Panamericana.
- Mujtaba MG, Baliban T, Bhagu J, Herrera M. (2021.) A laboratory exercise simulating antibody and antigen reactions of the Ouchterlony double immunodiffusion assay using inorganic salts. J Microbiol Biol Educ 22:e00103-21. <https://doi.org/10.1128/jmbe.00103-21>.
- Murphy, K., Weaver, C. (2019). Inmunología de Janeway. Manual Moderno.
- Murray, P. S., y Rosenthal, K. S. (2021). Microbiología médica (9ª ed.). Editorial Elsevier.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	127 de 187

Reacciones de aglutinación.

OBJETIVO

- Analizar cómo se lleva a cabo una reacción de aglutinación por medio de una prueba inmunológica (reacción Ag-Ac).

FUNDAMENTO TEÓRICO

Hasta cierto punto, la precipitación y la aglutinación pueden considerarse manifestaciones de la misma interacción Ag-Ac, la única diferencia es el estado soluble de los mismos. Por otra parte, para que se lleve a efecto una reacción de aglutinación, el Ag deberá ser una partícula, como por ejemplo una bacteria o un glóbulo rojo, etc., en ambos casos tiene lugar una unión química reversible de dos fases o etapas.

En la primera, el fragmento Fab de los Anticuerpos (Ac) o haptenos de la molécula extraña; esta combinación está sujeta a varios factores como lo son el pH, temperatura, fuerza iónica, hidrófoba, de Vander Waals y fuerzas entéricas.

En cuanto la reacción llega a un equilibrio comienza la segunda fase de la reacción, o sea la formación de una nueva red, en ésta, los fragmentos Fab "libres" reaccionan con sus determinantes homólogos de otras moléculas de éste mismo sistema, formándose la "red" o "malla" antes mencionada.

En una reacción de precipitación debido a que el Ag está soluble, se debe formar una respuesta bastante grande para que se logre observar, por lo que se requiere una concentración elevada de Ag.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	128 de 187

Pero en una reacción de aglutinación, el Ag es particulado y la red en este caso es más fácil de formarse, por lo que se necesita menos cantidad de Ag para que quede de manifiesto la reacción.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Porta objetos.
- Microscopio.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- 4 Pipetas Pasteur.
- Bulbo para Pipeta Pasteur.
- Cuatro tubos de ensaye de 13 x 100.
- 3 Aplicadores de madera.
- Ag VDRL.
- Control Positivo.
- Control Negativo.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aseptica, obtener por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario sano, previo consentimiento del mismo.
2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100, dejar coagular a temperatura ambiente, se sugiere dejar en la estufa de 5 a 10 minutos para acelerar el proceso.
3. Retirar el coagulo con un aplicador de manera.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	129 de 187

4. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
5. Como paso opcional se puede colocar el tubo con suero a baño maría a 60°C durante 1 minuto con la finalidad de inactivar una posible muestra peligrosa.
6. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo de ensayo nuevo.
7. Respetando la técnica aséptica, tomar un inóculo (muestra) de *Staphylococcus aureus* con el asa bacteriológica estéril y suspenderla en el tubo que contiene plasma, incubar a 37°C por 90 minutos. Como paso opcional, se puede diluir 1:5 en solución salina el *Staphylococcus aureus* antes de inocular en el plasma (pregunte a su profesor).
8. En un porta objeto se colocará una gota del suero, en otro una gota de control positivo y en otro una gota de control negativo, ahí mismo agregar una gota del Ag VDRL a cada uno, teniendo precaución de no contaminar el reactivo.
9. Se hará la mezcla con un aplicador de madera y se "leerá" en el microscopio la presencia de aglutinación (formación de grumos). Si existe, la prueba será "positiva", de lo contrario será negativa.
10. Realizar la comparación de la muestra con suero con el control positivo y negativo.

RESULTADO

Leer al microscopio la presencia de aglutinación que se vera como la formacion de grupos o una red, comparando la muestra con suero con los controles, para analizar correctamente los resultados.

CUESTIONARIO

- 1) Defina los términos precipitación y aglutinación (inmunológica).
- 2) Diga 5 características que deba de presentar una sustancia para que actúe en un organismo como sustancia antigénica.
- 3) ¿Qué diferencia existe entre antígeno e inmunógeno?
- 4) ¿Cuál de las pruebas realizadas debe ser positiva y por qué?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	130 de 187

- 5) ¿Qué metodología seguiría en la muestra con suero para que la reacción fuera negativa en caso de que fuera positiva, es decir para verificar que es un falso negativo?
- 6) ¿Qué significa Ag VDRL?
- 7) ¿Qué enfermedad es la que normalmente nos diagnostica el Ag VDRL?
- 8) Enliste 4 padecimientos que nos den VDRL positivo.
- 9) ¿Cuál es la composición y de dónde se extrae el Ag VDRL?
- 10) Mencione 3 pruebas en donde se realice una reacción de aglutinación inmunológica, y diga también cuál es la partícula que está favoreciendo la aglutinación en cada caso, y para qué nos sirven o en el diagnóstico de qué nos ayudan cuando se realizan en el laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12^a ed.). Editorial Panamericana.
- Murray, P. S., y Rosenthal, K. S. (2021) Microbiología médica (9^a ed.). Editorial
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4^a ed.). Editorial Panamericana.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	131 de 187

Gonadotropina Coriónica Humana

OBJETIVO

- Identificar y comprobar si el método de presencia de hCG en orina es eficaz en el diagnóstico de embarazo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Una prueba de embarazo es toda aquella técnica usada para confirmar un embarazo, en pacientes que presentan signos o síntomas presuntivos del mismo. En ella se utiliza plasma u orina maternas para detectar la presencia de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), esta prueba no es confirmatoria pues los niveles de hCG pueden estar elevados por otros motivos además del embarazo (como un tumor). Existen otras técnicas, como el ultrasonido obstétrico, que también confirman el embarazo, pero el término prueba de embarazo suele implicar solamente pruebas bioquímicas.

Para fines prácticos se reconocen signos durante las dos mitades del embarazo, nombrándose a los primeros como subjetivos o presuntivos y a los segundos los signos de certeza.

Signos presuntivos:

- Amenorrea
- Gestosico
- Mamarios
- Vaginales y vulvares
- Cervicales



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	132 de 187

Signos de certeza:

- Delimitación del producto
- Peloteo fetal
- Detección de frecuencia fetal
- Movimientos fetales

Pruebas endocrinas.

La detección coriónica de gonadotropina y la facilidad con que se realizan las reacciones inmunológicas para su identificación han hecho de éste el método más práctico para ser utilizado en la actualidad para diagnosticar el embarazo desde los 42 días de la última menstruación.

El fundamento o principio de la prueba hCG de embarazo en un solo paso en placa (Orina/Suero), es que se lleva a cabo una hemaglutinación cruzada con el anticuerpo para la gonadotropina coriónica humana (hCG).

También existe otra versión de la prueba que se trata de un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección cualitativa de la hCG en orina o suero, para el diagnóstico precoz del embarazo.

En dicha prueba se utiliza dos líneas para indicar el resultado. La línea de la prueba utiliza una combinación de anticuerpos que incluyen un anticuerpo monoclonal hCG para detectar selectivamente niveles elevados de hCG. Mientras que la línea de control está compuesta por anticuerpos policlonales de cabra y partículas coloidales de oro.

El ensayo se realiza añadiendo la muestra de orina o suero al pocillo de la placa y observando la formación de líneas de color. La muestra migra por acción capilar por la membrana para reaccionar con el conjugado de color.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	133 de 187

Las muestras positivas reaccionan con el conjugado de color del anticuerpo específico anti-hCG para formar una línea de color en la región de la línea de la prueba de la membrana. La ausencia de esta línea de color sugiere un resultado negativo. Para servir como control del procedimiento, siempre aparecerá una línea de color en la región de la línea de control, si la prueba se ha realizado correctamente.

Ventajas y desventajas de las inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección cualitativa de la hCG en orina o suero.

Ventajas	Desventajas
Procedimiento rápido, sencillo y económico.	Las muestras muy diluidas (con densidad específica baja), pueden no contener niveles representativos de hCG.
Detecta cualitativamente la presencia de hCG en una muestra de orina o suero con una sensibilidad de 25 mUI/mL	Los niveles altos de hCG, en enfermedades como son la enfermedad trofoblástica y ciertas neoplasias no trofoblásticas, podrían arrojar falsos positivos.
Menos errores técnicos que las pruebas rápidas en portaobjeto.	Una proteinuria importante (100mg/dl.) puede causar anillos atípicos.
Puede ser llevado a cabo por personal de salud capacitado.	Vibración o sacudidas pueden causar puntos finales deformados, no concluyentes.

En la práctica que efectuaremos en el laboratorio, utilizaremos el inmunoensayo cromatográfico rápido que como se ha comentado presenta ventajas importantes, y que como se ha comentado es una prueba rápida que detecta cualitativamente la presencia de hCG en una muestra de orina o suero con una sensibilidad de 10 mUI/mL.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Centrífuga.
- Tubo de ensayo 13 x 100.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	134 de 187

- Muestra de sangre o de orina de una paciente con signos presuntivos de embarazo (de preferencia).
- 2 Pipetas Pasteur.
- Bulbo para Pipeta Pasteur.
- Placas hCG (dependiendo de la disponibilidad).

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Preparativos

a) En caso de utiliza orina

1. Se debe recolectar una muestra de orina en un envase limpio y seco, preferentemente la primera muestra de orina de la mañana, puede almacenarse a 2-8° C hasta un periodo de 48 horas previo a su valoración.
2. Si la muestra de orina presenta precipitados visibles se deberán centrifugar a 3000-4000 rpm por 5 minutos.

b) En caso de utilizar suero

1. Se extraerá la sangre asépticamente en un tubo limpio sin anticoagulantes y separar el suero de la sangre en cuanto sea posible, para evitar la hemólisis. La muestra puede almacenarse a 2-8°C hasta un periodo de 48 horas previo a su valoración.

B. Realización de la prueba

1. Dejar que la placa, la muestra de orina o suero y/ó los controles alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar la prueba (estabiliza a temperatura ambiente antes de usarse).
2. Colocar la placa en una superficie limpia y nivelada.
3. Manteniendo la Pipeta Pasteur en posición vertical y depositar 3 gotas de orina o suero (aproximadamente 100 µl) en el pocillo de la placa y tomar el tiempo a partir de ese momento.
4. Esperar 3 minutos cuando se analice orina o a los 5 minutos cuando se analice una muestra de suero, para leer el resultado. Los resultados deben interpretarse en el momento adecuado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	135 de 187

RESULTADOS

Transcurrido el tiempo leer los resultados obtenidos. Aparecen dos líneas coloreadas para resultado positivo y para un resultado negativo aparecerá solo una línea en la región de control. El resultado es invalido si la línea de la región de control no aparece. Es importante que el fondo esté claro antes de leer el resultado.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los métodos que se pueden emplear para el diagnóstico del embarazo?
2. ¿Cuáles son los métodos más usuales en la práctica clínica y por qué?
3. ¿En qué se basan (fundamento) dichos métodos?
4. Describa las indicaciones para determinar hCG.
5. ¿Cuándo se pueden encontrar resultados falsos positivos?
6. ¿Cuándo se pueden encontrar resultados falsos negativos?
7. ¿Cómo se clasifican los signos para diagnóstico de embarazo?
8. Acorde a la Organización Mundial de la Salud, regla de Naegele es el método recomendado para el cálculo de la fecha probable de parto, explique en que consiste.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Batzer FR. Hormonal evaluation of early pregnancy, *Fertil. Steril.* 1980; 34(1): 1-13.
- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). *Roitt Inmunología. Fundamentos* (12^a ed.). Editorial Panamericana.
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). *Kuby Inmunología* (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, C. (2018). *Microbiología y Parasitología Humana* (4^a ed.). Editorial Panamericana.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	136 de 187

Fagocitosis.

OBJETIVO

- Analizar y comprender el proceso de fagocitosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La fagocitosis es la ingestión de partículas por células individuales. Es la función por la cual las células especializadas, localizan, identifican e introducen al citoplasma celular, agentes patógenos y una vez formada la vacuola fagocitaria, excretan en ella las distintas enzimas que llevan a la muerte o desintegración del antígeno.

La fagocitosis por leucocitos circulantes y fijos es el mecanismo de defensa más importante del organismo contra todo aquello que lo invade. Filogenéticamente, la fagocitosis es el medio de defensa más primitivo e importante que juega un papel predominante contra invasores extraños en todas las especies animales.

La defensa fagocítica de los mamíferos consta del sistema fagocítico de los polimorfonucleares, que es la primera línea e incluye a los leucocitos polimorfonucleares circulantes, también llamados granulocitos, así como los macrófagos libres y fijos, conocidos como el sistema reticuloendotelial.

La inactivación, eliminación y destino de todos los microorganismos invasores corre a cargo de los fagocitos, ayudados con frecuencia por anticuerpos y complemento. Debido a que el anticuerpo y complemento rara vez bastan para inactivar a los microorganismos y no son por capaces de efectuar su destrucción y eliminación.

Por otra parte, los fagocitos eliminan fácilmente muchos microorganismos y otras partículas extrañas, pero son incapaces de discriminar entre los objetos extraños y los no extraños sin



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	137 de 187

la ayuda de los anticuerpos. El reconocimiento de partículas y de organismos extraños lo hacen los anticuerpos específicos, los cuales entonces, con la ayuda de varios factores del complemento, dan la señal química a los fagocitos que los hace movilizarse hacia la escena de la quimiotaxis.

Los anticuerpos, frecuentemente con la ayuda del complemento, efectúan cambios en la superficie de las partículas reconocidas, los cuales refuerzan la atracción de los fagocitos, proceso que se llama opsonización.

La fagocitosis la describió por primera vez Metchnikoff en 1887. Durante muchos años hubo una controversia en cuanto a la cuestión de si la defensa contra los organismos invasores se basaba en mecanismos humorales o celulares. Esta controversia se enfrió en tiempos recientes al conocimiento cada vez mayor de que son igualmente indispensables y que actúan en colaboración las actividades humoral y celular.

Los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos son fagocitos que están constantemente en la circulación periférica. En la sangre de un ser humano adulto normal, el número aproximado es de 2.5×10^{12} de granulocitos o de sus precursores inmediatos.

Un neutrófilo humano se puede observar con sus lóbulos nucleares típicos y sus múltiples gránulos citoplasmáticos que son estructuras homogéneas redondas u oblongadas, muchos de estos lisosomas, mientras que los numerosos puntos pequeños son depósitos de glucógeno.

El sistema fagocítico mononuclear contiene células móviles y las fijas altamente fagocíticas del sistema reticuloendotelial. Como el concepto de sistema reticuloendotelial, referido como células mononucleares de gran capacidad fagocítica, está abierto a la crítica y carece de precisión, la expresión "sistema fagocítico mononuclear" es cada vez de mayor aceptación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	138 de 187

Este sistema comprende, en orden de capacidad fagocítica creciente, los:

- Promonocitos (en la médula ósea) que dan lugar a los;
- Monocitos (en la sangre periférica) los cuales a su vez dan lugar a los:
- Macrófagos (libres y fijos) en los tejidos siguientes;
- Médula ósea (macrófagos, células sinusoidales de revestimiento)
- Tejido óseo (osteoclastos)
- Hígado (células de Kupffer)
- Pulmón (macrófagos alveolares)
- Ganglios linfáticos (macrófagos libres y fijos)
- Tejido medular de las placas de Peyer intestinales. (Macrófagos)
- Sistema nervioso (células de microglia)
- Cavidades serosas (macrófagos peritoneales)
- Bazo (macrófago libres y fijos, células sinusoidales de revestimiento).

Los macrófagos son considerablemente más grandes que los granulocitos y contienen un solo núcleo, frecuentemente en forma de riñón. Los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear forman la segunda línea de defensa contra partículas invasoras.

Al contrario que los fagocitos polimorfonucleares, muchos macrófagos continúan dividiéndose, también pueden fundirse y formar células gigantes multinucleadas que sirven para deshacerse de los cuerpos más grandes.

Proceso de fagocitosis.

La fagocitosis de partículas extrañas comprende un número de pasos y actividades del todo diferentes, en los cuales las partículas que van a ser fagocitadas y las células fagocíticas juegan cada una un papel importante, de manera general podemos englobar los siguientes pasos que, si bien pueden suceder en secuencia, en la realidad pueden estar sucediendo casi al mismo tiempo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	139 de 187

Quimiotaxis. En donde las células fagocíticas, adquieren una movilidad vectorial unidireccional como respuesta a estímulos químicos, que hacen que estas células se encuentren en el lugar que el organismo las necesita para su defensa. Son varias las sustancias que obran como agentes mediadores de la quimiotaxis, algunas se originan en los productos bacterianos otras en factores sanguíneos activados, como el factor Hageman, Kalicrínas, y en algunas de las sustancias producidas por los linfocitos como linfoquininas y linfotóxina. No obstante, el elemento de mayor poder quimiotáxico se origina en el sistema proteico del complemento, que al ser activado por la reacción antígeno-anticuerpo desencadena la producción de sus diferentes componentes.

Reconocimiento del antígeno. Una vez que el fagocito ha llegado a la zona de lesión o de ingreso del antígeno, debe entrar a reconocer cuál es el elemento que debe atacar. Estas células muestran una gran selectividad en cuanto al reconocimiento de las partículas o gérmenes, función que parece se opera por el reconocimiento de estructuras o características especiales de la superficie del elemento o partícula a fagocitar.

La activación de los fagocitos por el recubrimiento del antígeno, se llama opsonización (preparación para la comida y adquiere gran valor en los procesos de defensa del organismo contra la infección por microorganismos gérmenes bacterianos). Los anticuerpos que tienen esta propiedad de opsonización son exclusivamente de tipo IgG, o IgM y especialmente la G1 y G3.

El complemento provee también factores de activación opsonica que refuerzan la acción de los anticuerpos, o permiten cierta activación de la fagocitosis en ausencia de anticuerpos.

Ingestión. Después de que se establece el contacto entre las células fagocitarias y la partícula a fagocitar, el citoplasma de la célula extiende sus pseudópodos alrededor de ésta, establece contacto con ella, la rodea totalmente y forma una vesícula o fagosoma, en la cual la parte de la membrana celular que es englobada viene a formar la pared del fagosoma.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	140 de 187

Degranulación. Una vez que se forma el fagosoma, los gránulos de las células fagocitarias adquieren una gran movilidad, se aproximan y vierten en él su contenido enzimático. Como la pared del fagosoma es membrana celular, la liberación de las enzimas no va a afectar el citoplasma de la célula, ya que estas actuarán sobre el contenido del fagosoma y no sobre el resto de los componentes celulares.

Muerte y digestión del antígeno. Los microorganismos fagocitados son atacados por una serie de procesos enzimáticos que impiden su reproducción, alteran su metabolismo y producen su muerte degradándolo a partículas pequeñas. El pH en el interior de la vacuola fagocitaria es inferior al del citoplasma del fagocito, y esto de por sí tiene ya gran papel bactericida.

Existen una variedad de sustancias en el interior de la vacuola fagocitaria que cumplen diversas funciones, entre ellas se encuentra:

- Lisozima. Es una proteína de bajo peso molecular y que es bactericida en virtud de su capacidad de hidrolizar algunos componentes de la membrana bacteriana.
- Lactoferrina. Es una proteína con las propiedades de fijar el hierro y que tiene poder bactericida cuando no está saturada con hierro. Al competir con la bacteria por el hierro necesario para el metabolismo detiene su crecimiento.
- Proteínas catiónicas. Se ha logrado aislar unas 7 entre las cuales se encuentran la fagocitina y la leukina. Se combinan con grupos ácidos de la membrana e impiden el normal crecimiento del germen al alterar su metabolismo.
- Sistema mieloperoxidasa. Superóxido H_2O_2 halógeno. Constituye el mecanismo de mayor poder bactericida en la fagocitosis humana contra bacterias, hongos, virus y microplasma y muchos otros que se señalan a continuación:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	141 de 187

- Fosfatasa ácida
- Ribonucleasa ácida
- Desoxirribonucleasa ácida
- Cetepsinas B,C,D,E
- Fosfatasa de fosfoproteínas
- Esterasas
- B-glucoronidasa
- B-galactonidasa.B-N-acetilglucosaminidasa
- Alfa-1 fucosidasa
- Alfa 1-4 glucosidasa
- Alfa-manosidasa
- Alfa N- acetilglucosaminidasa
- Alfa N- acetilgalactosaminidasa
- Mieloperoxidasa
- Mucopolisacáridos
- Glucoproteínas
- Proteínasa básica
- Hialuronidasa
- Lisozima
- Colagenasa
- Arilsulfatasas A y B
- Fosfolipasa
- Lipasa ácida
- Lactoferrina
- Fagocitina y proteínas
- Pirógeno endógeno
- Activador de plasminógeno
- Hemolisina

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Mechero.
- Portaobjetos.
- Microscopio.
- Centrifuga.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).

CEPAS

- *Staphylococcus aureus*.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	142 de 187

PROCEDIMIENTO

1. Obtener por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario sano, previo consentimiento del mismo.
2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100 con anticoagulante y se agitará suavemente varias veces.
3. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
4. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo nuevo.
5. Adicionar 0.05 mL de microorganismo de *Staphylococcus aureus*, agitar suavemente y colocarlo en baño maría a 37 °C por una hora.
6. Tomar un portaobjetos limpiarlo con alcohol, para evitar cualquier residuo.
7. Colocar una gota en uno de los extremos y hacer una extensión con otro portaobjetos.
8. Dejar secar el frotis al aire.
9. Realizar una tinción con colorante de Wright:
 - a) Cubrir la preparación con el colorante y se deja actuar 2 minutos. La solución no debe de precipitarse en el portaobjetos.
 - b) Añadir una cantidad aproximadamente igual de agua destilada distribuyéndola por toda la extensión soplando suavemente la superficie del porta-objetos con ayuda de una pipeta, la mezcla presenta un brillo metálico.
 - c) Dejar actuar la mezcla durante 7 minutos.
 - d) Lavar 30 segundos con agua corriente a chorro indirecto.
10. Dejar secar al aire, colocar cubre objetos y observar al microscopio a 40x y con objetivo de inmersión (100x) supervisado por el profesor.
11. Limpiar el microscopio antes de devolverlo.

RESULTADOS

Al observar al microscopio, distinguir los leucocitos y sus estructuras, así como determinar el porcentaje de leucocitos fagocitantes y realizar esquemas correspondientes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	143 de 187

CUESTIONARIO

- 1) Defina qué es la fagocitosis y los pasos que involucra.
- 2) Mencione brevemente cuál es el mecanismo de la inflamación.
- 3) ¿De qué origen embrionario pueden ser las células con capacidad fagocitaria?
- 4) ¿Qué es el fenómeno de Diapédesis?
- 5) ¿Qué es el fenómeno de Quimiotaxis?
- 6) ¿Qué nombres reciben los fagocitos en los siguientes tejidos?
 - a. Hígado:
 - b. Sangre:
 - c. Sistema nervioso:
 - d. Tejido conectivo:
 - e. Pulmón:

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12^a ed.). Editorial Panamericana.
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	144 de 187

Demostración de la lisozima en secreciones.

OBJETIVO

- Identificar la importancia de las barreras físicas y químicas de la inmunidad innata.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La inmunidad innata, involucra una serie de barreras físicas y químicas que impiden que los microorganismos invadan los tejidos. Se conoce que en las secreciones bucales se han descrito varios factores antibacterianos, no inmunológicos y aunque el significado biológico de estos factores no se comprende enteramente, pueden desempeñar algún papel en la protección de los tejidos bucales.

La lisozima es una enzima hidrolítica que rompe el enlace entre la N- acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico. Estos enlaces existen en el mucopéptido (péptido glucano) de la pared celular de las bacterias. La Lisozima es una enzima que en la saliva sus fuentes son la glándula parótida, submandibular y sublingual.

Algunas especies de bacterias son extremadamente sensibles a la lisis por esta enzima, como la de *Micrococcus lysodeikticus*, otros microorganismos son menos sensibles o aun completamente resistentes a su acción.

En algunas ocasiones, la lisozima puede intervenir en la lisis de las bacterias mediada por anticuerpos complementado. La lisozima está ampliamente distribuida, encontrándose en la saliva, secreciones nasales, lágrimas, tejidos y líquidos corporales, y en la clara de huevo.

En 1922, Fleming informó la presencia de unas sustancias de las secreciones nasales que causaba la disolución de *Micrococcus lysodeikticus*, denominó a esta sustancia lisozima, que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, y no encontrándose en el pus,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	145 de 187

en el líquido cefalorraquídeo, ni en la orina, además se piensa que puede tener una importante participación en la resistencia natural de la infección.

Es activa contra cepas de *Neisseria*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*.

La cantidad de lisozima en el suero del recién nacido es mayor que del suero materno; lo anterior podría reflejar su participación como factor de resistencia antes de la capacitación del sistema de inmunidad del niño.

La lisozima es una enzima de mucopolisacáridos que actúan sobre la pared celular de algunas bacterias.

Existen bacterias residentes mucosa bucal que no son destruidas ni tampoco inhibidas por la Lisozimas entre ellas: *Bacteriodes oralis*, *Bacteriodes melaninogenicus*, difteroides anaerobios, difteroides facultativos, bacilos fusiformes, algunas especies de *Lactobacillus*, *Peptoestreptococcus*, *Streptococcus salivarius*, la espiroqueta *Treponema microdentium*, *Veillonelal calescens* y *Vibrio sputorum*.

En algunos estudios experimentales, los resultados han indicado que el estreptococo cariígeno y las bacterias gran negativas pueden volverse susceptibles a la lisis por la Lisozima por algunas manipulaciones y alteraciones en el medio de cultivo en el que se coloquen.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Mechero.
- Portaobjetos.
- Caja de Petri con Agar Soya Tripticasa.
- Solucion Salina Isotonica (0.9%)
- Tubo con discos de papel filtro.
- Pinzas de disección.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	146 de 187

CEPAS

- *Micrococcus lysodeikticus*.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica (esterilizando el asa y tubos antes y después de tomar cada muestra), tomar un inóculo de *Micrococcus Lysodeikticus* y realizar una siembra por estría masiva en la caja de Petri con Agar Soya Trypticasa.
2. Colocar sobre el cultivo de *Micrococcus Lysodeikticus*, discos de papel filtro impregnado con diversas secreciones: Solución salina, Sudor, Saliva y Lágrimas. De preferencia que provengan del mismo individuo.
3. Incubar a 37°C por 24 horas.
4. Observar la presencia de lisis cuando está presente la Lisozima.

RESULTADOS

Leer los resultados observar la presencia de lisis en cada uno de los discos con las diversas secreciones.

CUESTIONARIO

1. ¿A qué nivel estructural actúa la Lisozima en las bacterias?
2. ¿Cuál es la función de la Lisozima?
3. Mencione todos los sitios del cuerpo humano en donde se puede localizar la Lisozima.
4. Mencione las características morfofisiológicas de *Micrococcus Lysodeikticus*.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA DE PRIMER AÑO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	147 de 187

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12^a ed.). Editorial Panamericana.

Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.

Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	148 de 187

MÓDULO 3. Parto, Puerperio y Periodo Perinatal

Antiestreptolisinas.

OBJETIVOS

- Analizar cómo se lleva a cabo la cuantificación de antiestreptolisinas.
- Identificar las ventajas y desventajas de la cuantificación de antiestreptolisinas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La cuantificación de antiestreptolisinas (AELO) es la prueba serológica más usada para el diagnóstico de la fiebre reumática. La fiebre reumática es una enfermedad inflamatoria de múltiples sistemas, asociadas con una historia reciente de infección por estreptococo del grupo A.

Se ha emitido la hipótesis de que las manifestaciones de la fiebre reumática son consecuencia de la acción de toxinas estreptocócicas, siendo los estreptococos del grupo A los que producen abundantes y potentes toxinas que podrían solas o combinación, causar algunas manifestaciones de fiebre reumática.

Las toxinas son: estreptolisinas O y S, proteinasa estreptocócica, complejo de polisacáridos C y proteínas. Las estreptolisinas son hemolisinas, de la cual solamente la O es una hemolisina antigénica cuyo anticuerpo, la antiestreptolisina O (ASO), bloquea la actividad hemolítica y forma la base de la prueba serológica. Los estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), C o G, secretan estreptolisina O, toxina que causa en el individuo infectado una respuesta inmune adaptativa humoral con producción de anticuerpos séricos denominados antiestreptolisina O (ASO).

Es importante mencionar que la artritis reumatoide, escarlatina, amigdalitis, infecciones estreptocócicas diversas y algunos portadores sanos pueden dar falsos positivos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	149 de 187

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 10 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- Portaobjetos.
- Caja de Petri con Agar Soya Trypticasa.
- Solucion Salina Isotonica (0.9%)
- Tubo con discos de papel filtro.
- Pinzas de disección.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

- A. Obtención de tubos
1. Obtener por punción venosa 10 mL de sangre de un voluntario sano de grupo sanguíneo "O", previo consentimiento del mismo.
 2. Colocar 5 mL en un tubo sin anticoagulante, este se dejará coagular (se puede acelerar este fenómeno al introducirlo en la estufa a 37°C durante 5 minutos).
 3. Con un aplicador de madera se romperá la red de fibrina (separar el coagulo).
 4. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos, se obtendrán dos fases, y con una pipeta Pasteur se separa la fase líquida (que será el suero problema), se colocará en un tubo limpio, se utilizará para después determinar el título de antiestreptolisina.
 5. Colocar 5 mL, en un tubo con anticoagulante y agitar suavemente.
 6. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, y se separará el plasma con una pipeta Pasteur (desechándola correctamente).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	150 de 187

7. Se obtiene una suspensión de glóbulos rojos que se lavará con solución salina al 85% un mínimo de tres veces hasta obtener un sobrenadante claro, acto seguido se hará una suspensión de glóbulos rojos al 5%.

B. Preparacion de Diluciones

1. Se realizará dilución del suero problema a las siguientes diluciones, utilizando solución salina diluyente y recordando agitar suavemente los tubos.

1:10 → 0.5 mL de suero + 4.5 mL de solución salina.

1:100 → 1 mL de la dilución 1:10 + 9.0 mL solución salina.

1:500 → 2 mL de dilución 1:100 + 8 mL de solución salina.

2. La prueba se monta de acuerdo con el siguiente protocolo:

	1:10		1:100			1:500		
Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8
Vol. de la dilución salina en mL.	0.2	1.0	0.5	0.4	0.3	1	0.8	0.4
Vol. de solución salina en mL.	0.8	0	0.5	0.6	0.7	0	0.2	0.6

C. Para realizar la prueba

1. Agregar a cada tubo 0.5 mL de estreptolisina.
2. Agitar e incubar a 37°C durante 15 minutos.
3. Agregar a cada tubo 0.5 mL de la suspensión de glóbulos rojos.
4. Agitar e incubar a 37°C durante 45 min agitando cada 15 minutos.
5. Centrifugar los tubos durante un minuto a 1500 rpm
6. Títulos en unidades Todd 50 100 200 333 500 625 1250.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	151 de 187

Nota: Es importante agregar dos tubos más de control, uno con positivo y uno con negativo, (eliminando la estreptolisina "O", suero, etc).

RESULTADOS

Observar los tubos y revisar cuidadosamente en cuales se forma un precipitado, reportando en que título y unidades ocurre, interpretando el resultado.

CUESTIONARIO

1. Mencione características de estreptomocina O y S.
2. Diga qué clase de inmunoglobulinas son las antiestreptolisinas.
3. Mencione cuales son los signos mayores y menores de la fiebre reumática.
4. ¿Cuál es el fundamento del uso de glóbulos rojos para la prueba de antiestreptolisina?
5. ¿Cuál es la importancia médica de realizar una prueba de antiestreptolisina?
6. ¿Cómo interpretar una prueba de antiestreptolisina en la cual estas estuvieran sobre 800 U. Todd?
7. Diga qué reacción inmunológica se produce en la práctica que se llevó a cabo.
8. ¿Qué papel juega el hidrosulfito de sodio en la reacción?
9. ¿Qué título de U. Todd debe considerarse para que exista un padecimiento?
10. Menciona diez enfermedades producidas por estreptococos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12^a ed.). Editorial Panamericana.
- Gutiérrez, C., Chacón, M., Pérez-Ybarra, L., Rivero, H., Straga, S., y Luis-León, J. (2015). Valores referenciales de antiestreptolisina O y portadores asintomáticos de estreptococos β -hemolíticos en adolescentes y adultos del Municipio Francisco Linares Alcántara, Venezuela. Revista chilena de infectología, 32(6), 689-694.
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	152 de 187

Complemento.

OBJETIVOS

- Identificar la importancia del complemento.
- Analizar la prueba de fijación de complemento en condiciones controladas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El complemento es un conjunto de al menos 11 proteínas en el suero sanguíneo fresco que participa en varias reacciones inmunológicas. Aunque no se produce como resultado de la inmunización, se combina con los agregados antígeno-anticuerpo bajo condiciones adecuadas y puede, lisar o inmovilizar las células sensibilizadas, o promoverse adherencia inmunitaria y fagocitosis, así como la anafilotoxina. El complemento está normalmente presente en la sangre en la mayoría de los animales vertebrados. El complemento es altamente inestable.

La serie de reacciones químicas conocidas como “cascada del complemento” conducen a la muerte o lisis de una célula o algún acontecimiento importante por lo general lesivo. Se ha reportado que existen tres vías para la activación del complemento: vía clásica, vía alterna y vía de las lectinas.

Vía Clásica

La secuencia clásica se inicia por la unión de C1 con un complejo antígeno-anticuerpo.

C1 consiste de las tres proteínas, C1q, C1r, C1s, mantenidas juntas por una molécula de Ca⁺⁺ como ligando. El efecto del antígeno sobre el anticuerpo (IgG, IgM) es un cambio de



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	153 de 187

conformación o alostérico que hace accesible un sitio receptor C1q en la región Fc. A fin de activar el complemento, C1q polivalente debe unirse a cuando menos dos sitios Fc, es decir, dos sitios sobre una molécula IgM o sitios sobre dos moléculas de IgG muy próximas que hayan reaccionado con el Ag. C1q sufre entonces un cambio de conformación que modifica C1r de modo que esta activa a la proenzima, C1s.

Los sustratos de C1s, son C4 y C2. La C4 se desdobra a C4a y C4b, y este último se une con C1. En presencia de iones Mg^{++} , C2 se desdobra a C2a y C2b. C2a se une a C14b para formar C14b2a, una peptidasa conocida como convertasa de C3. Desdobla a C3 en una pequeña reacción, c3a, y c3b, que se fija al complejo C4b2 o a otros sitios de la membrana celular. Cada molécula de C3 convertasa divide a varios cientos de moléculas de c3.

La porción activada C4b23b del complejo fijado a la membrana celular enciende enzimáticamente C5, produciendo un pequeño fragmento, C5a, con actividad anafilotoxina y quimiotáctica (como C3a) y un fragmento mayor, Cb5, que se une a C3b sobre la membrana celular y forma un complejo ternario con C6 y C7, C8, se une entonces con el complejo y la fosfolipasa resultante, inicia la formación de lesiones circulares de unos 100 Å de diámetro que puede conducir a una lisis lenta a 37° C. Esto se acelera bastante cuando se agrega C9 al complejo. Las lesiones pueden ser causadas por enzimas hidrolíticas o por la actividad depresora de la tensión superficial de grupo de radicales hidrofóbicos sobre el complejo C89 activado. No deben ser consideradas como orificios sino más bien como áreas circunscritas de permeabilidad aumentada (sitios de derrame) a través de las cuales escapan iones K^+ , pequeñas moléculas orgánicas y macromoléculas como ARN y proteínas, y a través de los cuales entran iones Na^+ . El resultado es que la presión osmótica en el interior de las células aumenta, entra agua, y la célula se hincha.

Vía alterna

La vía alterna para la activación del complemento que evita el complejo C14b2a. Es iniciada por diversos polisacáridos vegetales, como la inulina, o por el zymosan, endotoxina bacteriana, o bien por inmunoglobulinas agregadas (IgG4, IgA e IgE, que no pueden ligar



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	154 de 187

C1q y que por lo tanto no inician la clásica secuencia del complemento). La sustancia iniciadora actúa sobre C3 y lo desdobra en C3a y C3b que pueden entonces efectuar sus funciones habituales.

Vía de las lectinas.

La activación del complemento por la vía de las lectinas es iniciada por MBL (lectina de unión a manosa), CL-LK heterodímero formado por las Colectinas del riñón (CL-K1) y del hígado (CL-L1) y las Ficolinas M, H, L que funcionan como moléculas de reconocimiento que circulan en sangre y otros fluidos. Al asociarse con las serinas proteasas MASP-1 y MASP-2 (con actividad enzimática) generan la escisión de los componentes de C4 y C2 formando la C3 convertasa, generando la cascada enzimática semejante a la ruta clásica.

Se señalan las principales actividades de los componentes del complemento en la forma siguiente:

ACTIVIDAD	COMPONENTE
Actividad citolítica y citotóxica	C1-C9
Atracción quimiotáctica de leucocitos PMN	C3a, C5a, C5b, 6, 7
Adherencia inmunitaria de complejos Ag-Ab-C a leucocitos, plaquetas, etc., y aumento en la susceptibilidad a la fagocitosis por leucocitos y macrófagos.	C3 - C5b
Lesión a la membrana y lisis de eritrocitos y algunas bacterias gram negativas. Filtración por la membrana plasmática de células nucleadas.	C8 - C9
Liberación anafiláctica de histamina de los mastocitos, y aumento en la permeabilidad capilar.	C3a - C5a
Actividad de las cininas	C2 - C1a
Liberación de enzima lisosomal por leucocitos	C5a
Activación de la fagocitosis	C3 - C5
Promueve la coagulación	C6
Promueve la lisis del coágulo	C3-C4
Inactivación de las endotoxinas	C5- C6
Inactiva virus	C4b



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	155 de 187

Anteriormente, se realizaba un apueba con eritrocitos de carnero sensibilizados, complemento, zimozan y hemaglutina, sin embargo, algunos reactivos fueron descontinuados por lo que en esta práctica, se realizará la prueba de antiglobulina que fue descrita por primera vez por Moreschi en 1908 y que es frecuentemente utilizada para la serología de grupos sanguíneos. La prueba de antiglobulina es una técnica sensible utilizada para la detección de inmunoglobulinas humanas y/o componentes del complemento (en este caso C3d) unidos a los eritrocitos humanos. C3d es un producto de degradación del complemento que queda unido a la superficie celular sirviendo como una forma de marcaje u opsonización, indicando que existió un reconocimiento por parte del complemento (una forma de sensibilización previa). Aunque, los resultados de las pruebas de antiglobulina directa pueden ayudar en el diagnóstico de la Anemia Hemolítica Autoinmune (AIHA), Enfermedad Hemolítica del Feto y del recién Nacido (HDFN) y las Reacciones Hemolítica Transfusiones Tardías (DHTR); en esta práctica la prueba servirá como una demostración del complemento sobre todo de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), por lo que se sugiere a profesores y alumnos hacer un análisis de resultados en función del tema del complemento.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Tubos de ensaye 13 x 100.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 10 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- Pipeta Pasteur.
- Bulbo para pipeta Pasteur.
- Solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) frío (2-8°C)
- Solución salina 0.9 % (solución salina isotónica) estéril.
- Centrifuga.
- Sueros antiglobulina humana poli específico (SAGH).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	156 de 187

- Glóbulos rojos sensibilizados.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Obtener por punción venosa 2 mL de sangre de un voluntario sano (o de preferencia de una embarazada que se encuentre en su gesta 2), previo consentimiento del mismo.
2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100 con anticoagulante (EDTA) y se agitará suavemente varias veces.
3. Lavar los eritrocitos al menos una vez con solución salina 0.9% (solución salina isotónica), para ello llenar 3/4 partes del tubo con la solución salina 0.9% y centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos, decantando el sobrenadante para obtener el botón de eritrocitos.
4. Preparar una suspensión de eritrocitos al 5% en solución salina isotónica (9.5 mL de Solución Salina más 0.5 mL del botón de glóbulos rojos del lavado).
5. Coloque una ó dos gotas (~40-100 μ L) de la suspensión de eritrocitos 2-5% lavados dentro de un tubo de ensayo adecuadamente rotulado.
6. Lavar los eritrocitos por lo menos 3 veces con los tubos llenos de salina isotónica.
7. Decantar completamente el sobrenadante de la salina isotónica, resuspender y mezclar los glóbulos rojos con la nueva salina isotónica para los subsecuentes lavados.
8. Decantar la solución salina completamente después del último lavado para asegurarse de que se removió todo el residuo de la salina y resulte un botón de glóbulo rojo "seco".
9. Adicionar dos gotas de la Anti-globulina Humana Poli específico al botón de glóbulos rojos y mezclar suavemente hasta resuspender los glóbulos rojos.
10. Centrifugar por 15 segundos a 900-1000 rcf.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	157 de 187

11. Mezclar suavemente y buscar si existe aglutinación (se puede observar la muestra al microscopio).
12. Al mismo tiempo se debe realizar un control positivo y un control negativo (como sugiere el cuadro).

Tubo	Reactivo 1	Reactivo 2
Control Positivo	Sueros antiglobulina humana poli específico (SAGH)	1 a 2 gotas de Glóbulos rojos sensibilizados
Control Negativo	Sueros antiglobulina humana poli específico (SAGH)	1 a 2 gotas de Solución salina 0.9%
Muestra problema	Sueros antiglobulina humana poli específico (SAGH)	Glóbulos rojo de muestra problema 5%.

RESULTADOS

Asesorados por el profesor, interpretar los resultados. Reacción negativa indica ausencia del complemento c3d o IgG en los glóbulos rojos del paciente. Reacción positiva indica que los glóbulos rojos se encuentran sensibilizados con IgG, C3d o ambos

CUESTIONARIO

- 1) ¿Qué es el complemento?
- 2) Describa la vía clásica y la vía alterna del complemento
- 3) Describa enfermedades producidas por deficiencia de complemento
- 4) ¿Cuál es la concentración normal en suero humano?
- 5) ¿Cuál es la importancia del complemento, y que sustancias lo pueden activar, por cualquiera de las dos vías?
- 6) En caso de que el resultado de la muestra diera positivo que sugeriría al paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12ª



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	158 de 187

ed.). Editorial Panamericana.

Padrón González, Alexander Ariel, & Dorta Contreras, Alberto Juan. (2017). Activación del complemento por la vía de las lectinas: rol en las enfermedades reumáticas. *Revista Cubana de Reumatología*, 19(Supl. 1), 231-234.

Recuperado en 12 de julio de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-59962017000400012&lng=es&tlng=es.

Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). *Kuby Inmunología* (8a ed.). McGrawHill.

Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Wolters Kluwer.

Rojas-Espinosa O. (2017). *Inmunología (de memoria)* (4ª ed.). Editorial Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	159 de 187

Proteína C Reactiva.

OBJETIVO

- Identificar y analizar la prueba de Proteína C reactiva y realizar su correcta interpretación.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La Inflamación es la reacción local de tejido vascularizado a una lesión y con frecuencia se acompaña de necrosis. Es la vía común final de prácticamente todo proceso nocivo sin importar su etiología, forma parte del sistema inmune innato. Siendo inespecífico, aunque conceptualmente es útil indicar que la inflamación es la respuesta a diversos estímulos que incluyen infecciones bacterianas y virales, tumores, infarto agudo al miocardio y procesos reumáticos. Por ello, incluso cuando no se conoce la etiología exacta, confirmar o excluir la presencia de un proceso inflamatorio mediante estudios de laboratorio en un paciente que presenta síntomas y signos inespecíficos puede ayudar a determinar si deben llevarse a cabo más estudios. La determinación de marcadores de inflamación séricos se emplea cada vez con más frecuencia para el diagnóstico y el pronóstico de diversas enfermedades críticas.

Las características de un proceso inflamatorio, tumefacción, calor, enrojecimiento y dolor se relaciona con una serie compleja de fenómenos que incluyen cambios hemodinámicos, alteraciones de la permeabilidad vascular, exudación de leucocitos y mediadores químicos.

Aún no se aclaran los mecanismos por los que una lesión tisular estimula el hígado para sintetizar diversas proteínas en la fase aguda. En el caso de la proteína C reactiva (PCR), su producción es inducida por interleucinas como las interleucinas (IL) por ejemplo IL-6, la



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	160 de 187

IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$). PCR es una proteína en particular sensible y útil en la fase aguda por que la magnitud de su aumento puede ser mayor de mil veces los valores anteriores a una infección.

Proteína C reactiva y fibrinógeno son las proteínas de fase que se miden más comúnmente. Los métodos usuales para estimar PCR son aglutinación, fijación del complemento, anticuerpo fluorescente, precipitación en líquido o gel y radioinmunovaloración.

Los nuevos adelantos en la capacidad para medir PCR sérica aumentan de manera importante sus aplicaciones clínicas. Los estudios indican que la PCR es un indicador más temprano y confiable de inflamación que los otros reactivos de fase aguda séricos. Se ha señalado que la PCR sérica es útil en el diagnóstico diferencial de neumonía bacteriana o viral, porque aumenta de manera espectacular en infecciones bacterianas.

En contraste con la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (LES) muestra poca o ninguna respuesta de PCR a menos que se complique por una infección intercurrente.

En el infarto de miocardio, un incremento brusco del valor sérico de PCR suele ser paralelo al tamaño del infarto. En pacientes quemados, un incremento de PCR sérica se correlaciona con la gravedad de la quemadura. Una disminución de los valores séricos de PCR puede iniciar el tratamiento con éxito de la pielonefritis aguda. Un aumento repentino del valor sérico de PCR indica el rechazo del injerto en pacientes con trasplante renal.

Frente al estímulo inflamatorio los valores de PCR aumentan en las primeras 6 a 8 horas y alcanzan un pico máximo a las 48 horas para descender rápidamente, con una vida media de eliminación que oscila entre 4 y 9 horas. Esto hace que pueda ser útil también como marcador evolutivo en las enfermedades inflamatorias crónicas. Otras implicaciones de PCR incluyen el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias pélvicas y de sepsis neonatal.

En la presente práctica efectuaremos una prueba en placa sensible y específica para la



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	161 de 187

determinación y cuantificación de la proteína C reactiva en suero sanguíneo humano. La presencia de proteína C reactiva indica la presencia de un proceso inflamatorio o necrótico, además de ser útil como ayuda en el diagnóstico clínico, puede ser usada para conocer la eficacia de un tratamiento.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- 8 Tubos 13 x 100.
- Pipeta Pasteur.
- Solución salina 0.9 % estéril.
- Equipo de CRP-Látex (CRP-Látex, control positivo y control negativo).
- Bulbo para pipeta Pasteur.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 10 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- Centrifuga.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Prueba Cualitativa

1. Respetando la técnica aseptica, obtener por punción venosa 10 mL de sangre de un voluntario sano, previo consentimiento del mismo.
2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100, con anticoagulante y agitar suavemente.
3. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
4. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo de ensaye nuevo.
5. Opcionalmente se puede diluir el suero a probar (1:10) con solución salina, es decir dos gotas de suero (0.1 mL) en 3.9 mL de solución salina 0.9 %.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	162 de 187

6. Colocar una gota de la dilución o del suero (preguntar al profesor cual opción elegir) a la placa de vidrio en uno de los círculos de la placa.
7. Colocar una gota de control positivo en otro círculo de la placa y otra gota de control negativo a otro círculo de la placa, con la finalidad de comparar resultados.
8. Finalmente añadir una gota de PCR-látex a cada pozo (círculo) de la placa.
9. Oscilar suavemente la placa durante 3 minutos y observe si se presenta aglutinación macroscópica.

B. Prueba cuantitativa

1. En caso de encontrar un resultado positivo en el suero, se procede a realizar la prueba cuantitativa.
2. Preparar diluciones del suero problema en solución salina de la siguiente manera, colocando 5 tubos de ensayo en una gradilla, depositar 0.5 ml de solución salina en cada uno.
3. Añadir 0.5 ml de suero diluido 1:40 al primer tubo. Mezclar bien y transferir 0.5 ml de la dilución anterior al segundo tubo, efectuando la misma operación hasta el tubo 5, las diluciones obtenidas son las siguientes:

Tubo 1 1:80

Tubo 2 1:160

Tubo 3 1:320

Tubo 4 1:640

Tubo 5 1:1280

4. Con una pipeta Paster limpia o un gotero poner una gota de cada dilución en las divisiones de la placa de vidrio con anterioridad marcadas. Teniendo cuidado de no contaminar la diluciones con la anterior, comenzar con el tubo 5 hasta el 1 o utilizar una pipeta limpia para cada uno.
5. Añadir una gota de PCR-látex a cada círculo (pozo).
6. Mezcle con un aplicador de madera desde la dilución la más elevada a la más baja.
7. Oscile suavemente la placa durante 3 minutos y observe se presenta aglutinación macroscópica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	163 de 187

RESULTADOS

En la prueba cualitativa, el resultado positivo ocurre si hay una aglutinación visible con forma de agregados y fondo claro; comparable con control positivo. Mientras que un resultado negativo corresponde a una suspensión uniforme sin aglutinación visible, comparable con el control negativo. En ocasiones se pueden apreciar unas granulaciones que no exceden a las observadas con el control negativo, por lo que no se deben interpretar como aglutinación.

En la prueba cuantitativa, la dilución más elevada del suero que muestre floculación visible se considera como el título de proteína C reactiva en el suero problema.

CUESTIONARIO

- 1) ¿En qué momento se encuentra indicada la prueba de la proteína C reactiva?
- 2) ¿Cuándo se efectuaría la prueba cualitativa?
- 3) ¿Cuándo se efectuaría la prueba cuantitativa?
- 4) ¿Cuál es el título de la proteína C reactiva normal?
- 5) ¿Qué enfermedades nos puede dar un título elevado de proteína C reactiva?
- 6) ¿Qué otra importancia tiene esta prueba de laboratorio?
- 7) Existen algunas otras pruebas de laboratorio que se pueden indicar simultáneamente con la de la proteína C reactiva. ¿Cuáles son y explique su respuesta?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12^a ed.). Editorial Panamericana.
- Prieto, M. F., Kilstein, J., Bagilet, D., Pezzotto, S. M. (2008). Proteína C reactiva como factor pronóstico de mortalidad en la unidad de cuidados intensivos. Medicina Intensiva, 32(9),424-430. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912008000900003&lng=es&tIng=es.
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	164 de 187

MÓDULO 4. Crecimiento y Desarrollo Extrauterino.

Determinación del grupo sanguíneo y pruebas cruzadas.

OBJETIVOS

- Describir e identificar los fundamentos de los sistemas de grupos sanguíneos ABO y Rh.
- Analizar y explicar la relación entre grupos sanguíneos, transfusiones de sangre y enfermedad hemolítica del recién nacido.
- Analizar y realizar el método para determinar el grupo sanguíneo.
- Analizar la importancia médica de conocer el tipo de sangre y el Rh en cada individuo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Existen respuestas del sistema inmune que generan un resultado inconveniente. Un ejemplo es la transfusión de sangre; sabemos que una transfusión de sangre será rechazada si la sangre del donante y la del receptor no son compatibles y que el rechazo también es un problema potencial con los órganos trasplantados. La capacidad para transfundir exitosamente sangre total o componentes hemáticos específicos ha salvado incontables vidas y apoyado el avance de la cirugía moderna y quimioterapia contra el cáncer. La primera transfusión sanguínea que salvó una vida la llevó a cabo hace menos de 200 años James Blundell, en 1818.

La transfusión es cada vez más segura porque ya se han definido los grupos sanguíneos y su relación con la respuesta inmunitaria; se han desarrollado técnicas para separar, almacenar, preservar y probar sangre antes de la transfusión. La determinación del grupo sanguíneo es llevada a cabo como un análisis de rutina, en pacientes internos, ambulantes, intervenciones quirúrgicas, problemas de ictericia en el recién nacido, trasplantes, donación de sangre, etc.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	165 de 187

Sistema de Grupos Sanguíneos ABO.

El primer sistema de grupos sanguíneos se describió al inicio del siglo XX por Karl Landsteiner (1901). La sangre humana puede clasificarse en cuatro grupos principales, designados A, B, AB y O. La presencia o ausencia de dos antígenos glucídicos designados A y B en la superficie de los eritrocitos determina el grupo sanguíneo de una persona. En el suero hay anticuerpos que aparecen naturalmente contra el antígeno AB opuesto. Las células del grupo O carecen de los antígenos A y B. las transfusiones de sangre incompatibles conducen a lisis de los eritrocitos del donante mediado por complemento.

En la actualidad, se conocen más de 400 antígenos de eritrocitos que pertenecen a 24 sistemas. Cada sistema de grupo sanguíneo tiene miembros, y cada miembro puede estar compuesto de uno o más antígenos distintos. Cada antígeno es controlado por un gen. Los antígenos sobre la superficie de los eritrocitos, por lo general, se detectan al reaccionar los eritrocitos con un antisuero conocido.

Sistema de Grupo Sanguíneo Rh.

El sistema Rhesus de grupo sanguíneo es el segundo en importancia del sistema ABO. Landsteiner y Weiner, observaron que al exponer el antisuero de un conejo sensibilizado frente a hematíes del mono Rhesus aglutinaba eritrocitos del 85% de la población humana. Fisher y Race formularon que la expresión del antígeno Rh estaba controlada por tres pares de genes (Cc, Dd y Ee). El antígeno D es el más inmunógeno, es el de mayor importancia en las enfermedades hemolíticas y las transfusiones. Dicho antígeno, expresado en la membrana del eritrocito, se utiliza para determinar si los eritrocitos de un individuo son positivos o negativos frente al antígeno Rh.

Los individuos que los presentan se conocen como Rh+. La ausencia de este antígeno en ciertos individuos (Rh-) puede conducir la sensibilización cuando se exponen a él. Una persona Rh+ puede recibir transfusiones de sangre Rh+ o Rh-.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	166 de 187

Cuando una persona Rh- recibe sangre Rh+, esta persona produce anticuerpos anti-Rh. La exposición posterior a células Rh+ producirá una reacción hemolítica rápida y grave.

Una madre Rh- con un feto Rh+ producirá anticuerpos anti- Rh. Los embarazos posteriores que impliquen incompatibilidad Rh pueden producir la enfermedad hemolítica del recién nacido (eritroblastosis fetal). La enfermedad puede prevenirse mediante la inmunización pasiva de la madre en el momento del parto con anticuerpos Rh.

Otros Antígenos Eritrocitarios.

La mayor parte de los 20 sistemas de grupos sanguíneos restantes (que representan más de 300 antígenos) rara vez están implicados en reacciones de transfusión. Los anticuerpos contra los sistemas Kidd, Duffy, Kell y MNS se conocen por su capacidad para provocar hemólisis si se transfunde sangre antígeno positiva en un individuo sensibilizado. Otros grupos sanguíneos son denominados, Lewis P.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- 8 Tubos 13 x 100.
- Lancetas.
- Aplicadores de madera
- Pipeta Pasteur.
- Bulbo para pipeta Pasteur.
- Solución salina 0.9 % estéril.
- Sueros hemoclasificadores del sistema ABO.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 10 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- Centrífuga.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	167 de 187

PROCEDIMIENTO

A. Determinación del Grupo Sanguíneo

1. Limpiar por medio de una torunda con alcohol, el lóbulo de la oreja de un alumno.
2. Puncionar con una lanceta estéril y esperar a que salga una gota de sangre.
3. Colocar tres gotas de sangre de manera separada, en el portaobjetos limpio.
4. Adicionar una gota de suero anti-A, una gota de suero anti-B y otra anti-D, en cada gota de sangre respectivamente.
5. Mezclar con un aplicador de madera por 30 segundos.
6. Observar el fenómeno que se presenta en cada prueba.

B. Pruebas cruzadas.

1. Respetando la técnica aseptica, obtener por punción venosa 5 mL de sangre de dos voluntarios sanos (un donante y un receptor), previo consentimiento de los mismos.
2. Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente en los tubos sin anticoagulante.
3. Romper la pared de fibrina y centrifugar a 3000 rpm durante tres minutos.
4. Obtener mediante la pipeta Pasteur el suero y paquete celular en diferentes tubos, tanto del donador y como del receptor.
5. Prueba mayor: mezclar una gota de los glóbulos rojos del donador con una gota de suero del receptor.
6. Prueba menor: mezclar una gota del suero del donador con una gota de glóbulos rojos del receptor.

RESULTADOS

Reportar el tipo de sangre de acuerdo con el siguiente cuadro en donde se observe aglutinación. Para los resultados de prueba mayor y menor observar si existe aglutinación, hemolisis o ninguno, realizar un análisis de los resultados y reportarlos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	168 de 187

Interpretación de Resultados	
Antisuero	Grupo Sanguíneo
Anti-A	Tipo A
Anti-B	Tipo B
Anti-A y anti-B	Tipo AB
No aglutinación	Tipo O
Anti-D	Rh (+)
No aglutina anti-D	Rh (-)

CUESTIONARIO

- 1) ¿A qué se le denomina determinante antigénico?
- 2) ¿Cuáles son los determinantes antigénicos (nombre del azúcar) de cada uno de los grupos sanguíneos?
- 3) ¿Qué es un anticuerpo incompleto?
- 4) ¿Cómo puede explicar, con algunos ejemplos, la importancia de conocer el tipo de sangre de cada individuo?
- 5) ¿Qué tipo de anticuerpos atraviesan la placenta?
- 6) ¿Qué significado tiene ser un receptor o donante universal?
- 7) ¿Qué podría suceder si no se lleva a cabo la inmunización de la madre Rh- en el momento del parto?
- 8) ¿Cuál es la vigencia de la sangre que va a ser transfundida y los riesgos que se pueden presentar al no respetar este dato?
- 9) Mencione los requisitos generales para ser donante de sangre.
- 10) ¿Mencione la(s) Normas Oficiales Mexicanas que regulen las transfusiones sanguíneas y donación de órganos?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	169 de 187

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., y Shiv Pillai. (2020). Inmunología básica (6ª ed.). Elsevier.

Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12ª ed.). Editorial Panamericana.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., y Shlomchik, M. J. (2003). Inmunología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad (4ª ed.). Editorial Masson.

Llop, A., Valdes-Dapena, M.M., y Zuazo, J. L. (2001). Microbiología y Parasitología Medicas Tomo I. Editorial Ciencias Médicas.

Murphy, K., y Weaver, C. (2019). Inmunología de Janeway. Manual Moderno.

Parham, P. (2006). Inmunología (2ª ed.). Editorial Medica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	170 de 187

Factor Reumatoide.

OBJETIVO

- Identificar importancia de la prueba de Factor Reumatoide en el paciente.
- Analizar las pruebas clínicas utilizadas para la determinación del Factor Reumatoide.
- Identificar el cuadro clínico de las patologías relacionadas con una prueba de Factor Reumatoide positiva.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La artritis reumatoide, también llamada artritis atrófica, artritis proliferativa crónica, artritis infecciosa crónica es una enfermedad sistémica de causa desconocida en la que los síntomas y cambios inflamatorios predominan en las articulaciones y estructuras afines. El padecimiento tiende a ser crónico y produce deformaciones incapacitantes características.

La enfermedad puede comenzar a cualquier edad, pero es más frecuente después de los 40 años de edad. Las pruebas serológicas para el factor reumatoide son positivas en 75% de los pacientes adultos con artritis reumatoide “clásica” o “definida”, de acuerdo con el criterio del American Rheumatic Association.

Puesto que estas pruebas son negativas en la fiebre reumática, gota, osteoartritis, espondilitis anquilosante y en las artritis supurativas, son de valor en el diagnóstico diferencial y en la investigación clínica.

El factor reumatoide posee un claro valor pronóstico, los pacientes con prueba positiva constante, por lo general siguen un curso progresivo desfavorable.

El factor reumatoide es una macroglobulina (19S) con un peso molecular aproximado de un



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	171 de 187

millón. Pero circula en el plasma como un complejo soluble (22S), combinando con globulinas gamma más pequeñas (7S), de peso molecular de 160 000. Es una IgM o IgG con reactividad de anticuerpo para la IgG de humanos.

Se emplean varias pruebas serológicas para el factor reumatoide pero el principio básico de todas ellas es el mismo; el suero problema se añade en diluciones seriadas a una suspensión de partículas que se han recubierto con una sustancia "sensibilizante". Las partículas pueden ser glóbulos rojos de carnero o humano, látex (un poliestireno sintético) o Bentonita (una arcilla natural).

Estas pruebas rara vez son positivas antes del sexto mes de la enfermedad, y en los pacientes que tienen artritis reumatoide juvenil sólo en 10-20% tienen la prueba positiva, así como también en algunas otras enfermedades tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE) y el síndrome de Sjögren, su principal interés clínico radica en el diagnóstico de la artritis reumatoide (RA).

La práctica consiste en una prueba rápida para la determinación de factor reumatoide mediante una técnica de aglutinación en porta para la detección cualitativa y semicuantitativa de factores reumatoides (FR) en suero humano. Las partículas de látex recubiertas con gamma-globulina humana son aglutinadas por factores reumatoides presentes en la muestra del paciente.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Tubos 13 x 100.
- Aplicadores de madera
- Pipeta Pasteur.
- Bulbo para pipeta Pasteur.
- Pipeta de vidrio de 5 mL graduada.
- Agua destilada



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	172 de 187

- Equipo de FR-Látex (FR-Látex, control positivo y control negativo).
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 10 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- Diluyente: Solución concentrada de regulador glicina-salina, pH 8.2, para su uso diluya 1:10, tomando un volumen de solución concentrada y 9 de agua destilada o desmineralizada. De esta manera se obtiene una solución isotónica regulada de pH 8.2 +- 0.2.
- Una placa de vidrio con 6 divisiones ovaladas de cerámica (o vidrio) y un cartoncillo negro.
- Centrífuga.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

- A. Prueba cualitativa en placa de vidrio
 1. Respetando la técnica aséptica, obtener por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario sanos, previo consentimiento del mismo.
 2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100 con anticoagulante y se agitará suavemente varias veces.
 3. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
 4. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo nuevo.
 5. De manera opcional, poner en un tubo perfectamente limpio, 1 mL, de la solución reguladora glicina – salina pH 8.2 (Diluida 1:10). Añadir una gota del suero problema y agitar.
 6. Colocar una gota de la mezcla diluida o una gota de suero (pregunte a su profesor) en uno de los óvalos de la placa de vidrio, y el cartoncillo negro debajo de la misma, para facilitar la lectura macroscópica.
 7. Colocar una gota del control positivo y del control negativo respectivamente a cada ovalo.
 8. Agregue una gota del reactivo látex – globulina (FR-Látex) a cada ovalo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	173 de 187

9. Mezcle con un aplicador de madera perfectamente extendiéndolo sobre toda la superficie del óvalo.

10. Leer el resultado y comparar con los controles.

B. Prueba Semicuantitativa en Placa de Vidrio

1. Esta prueba deberá llevarse a cabo con suero que ha dado una reacción positiva por el método de lectura cualitativa en placa de vidrio.

2. Se efectuarán diluciones del suero del paciente: colocar 9 tubos limpios en una gradilla y marcarlos, con una pipeta colocar 1.9 ml de solución reguladora de glicina – salina pH 8.2 en el tubo 1, y 1.0 ml en cada uno de los tubos restantes.

3. Añadir 0.1 ml de suero problema al tubo 1, mezclar y transferir 1.0 ml al tubo 2 y realizar la misma operación hasta llegar al tubo 9, las diluciones efectuadas son:

Tubo 1 ... 1:20

Tubo 2 ... 1:40

Tubo 3 ... 1:80

Tubo 4 ... 1:160

Tubo 5 ... 1:320

Tubo 6 ... 1:640

Tubo 7 ... 1:1280

Tubo 8 ... 1:2560

Tubo 9 ... 1:5120

4. Colocar una gota de cada una de las diluciones por separado en cada óvalo de la placa de vidrio y añadir una gota de reactivo látex – globulina (FR-Látex) y continuar el mismo procedimiento que para la prueba cualitativa.

5. Leer resultados y comparar con los controles.

RESULTADOS

En la prueba cualitativa, se considera negativo si se forma una suspensión uniforme sin aglutinación visible, comparable al control negativo. Se considera positivo débil si existe aglutinación visible por formación de pequeños agregados o solo aglutinación parcial. Mientras que se considera positivo si existe aglutinación visible por la formación de



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	174 de 187

agregados grandes y fondo claro, comparable al control positivo. Anotar las observaciones y realizar una interpretación de resultados.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es la importancia de determinar el factor reumatoide?
- 2) ¿Cuáles son los métodos que se pueden emplear?
- 3) ¿Cuáles serían las indicaciones para la prueba de Factor Reumatoide?
- 4) Enuncie el cuadro clínico de la artritis reumatoide.
- 5) ¿En qué enfermedades también se encontrarían resultados positivos?
- 6) ¿Cuál reacción inmunológica se presenta en esta prueba?
- 7) ¿Cuáles son los criterios de clasificación para la artritis reumatoide más recientes acorde a la European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR), el American College of Rheumatology (ACR) y el Colegio Mexicano de Reumatología?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., Shiv Pillai. (2020). Inmunología básica (6ª ed.). Elsevier.
- Abreu, L. M., y Martin-Armendáriz, L. G. (2016). Fundamentos de Diagnostico (12ª ed.). Méndez Editores.
- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12ª ed.). Editorial Panamericana.
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.
- Tierney, L. M., Saint, S., y Whooley, M. A. (2011). Manual de diagnóstico clínico y tratamiento (4ª ed.). McGrawHill.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	175 de 187

Inmunidad específica.

OBJETIVO

- Analizar la importancia del sistema inmune específico.
- Conocer el manejo, aplicación e interpretación de pruebas inmunodiagnósticos.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las barreras físicas y químicas, la inflamación y la activación del complemento constituyen las primeras líneas de defensa del cuerpo contra agentes potencialmente patógenos, constituyen el sistema inmune innato. Sin embargo, existe un segundo sistema, más específico y especializado contribuye a reforzar la acción defensiva del primero. Este está integrado por los linfocitos que circulan libremente en la sangre, en los canales linfáticos, en los espacios intersticiales de todos los tejidos y aquellos que se asientan en el timo, en el bazo y en los demás órganos linfáticos. Sin la existencia de este segundo, la defensa contra una segunda agresión por un mismo germen sería exactamente igual a la primera y no habría lugar en el establecimiento de un sistema específico llamado inmunidad adquirida y que protege al organismo contra la repetición de muchas de las enfermedades infecciosas.

Por otra parte, este sistema altamente especializado conserva la individualidad biológica de cada individuo, rechazando toda célula, tejido y órgano extraño que espontánea o artificialmente trate de introducirse al organismo.

Las aves, especialmente el pollo, ha sido un animal de gran utilidad en el estudio de la inmunidad, ya que sus características anatómicas en el sistema inmunitario permiten delimitar claramente las funciones de los linfocitos T y B. Efectivamente, en este animal existen dos órganos linfoides claramente diferenciados: el timo y la bolsa (bursa) de Fabricio (en honor al Dr. Hieronymus Fabricius). La resección del primero produce una marcada detención en algunos aspectos del mecanismo inmunitario animal, siempre y cuando se



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	176 de 187

haga esta intervención después del nacimiento. Se aprecia una atrofia de gran parte del tejido linfoide en zonas especiales de los ganglios linfáticos y del bazo, conocidas como timo-dependientes.

El desarrollo corporal de estos animales se hace lento, adquiere el aspecto de animales caquéticos, muy susceptibles a un gran número de infecciones, pero que aceptan muy bien los injertos de tejidos o de los órganos. Si, por otra parte, se reseca la Bolsa de Fabricio, dejando intacto el timo, el animal rechazará los injertos, pero no podrá producir anticuerpos y habrá atrofia en los órganos linfoides de las zonas que normalmente están bajo el influjo directo de la bolsa de Fabricio.

Linfocitos B

Los linfocitos B son responsables de la inmunidad humoral, son los encargados de defender al huésped de agentes patógenos por medio de la secreción de anticuerpos que reconocen a las moléculas antigénicas de los patógenos. También son encargados de presentar antígenos a linfocitos T. Las células B producen anticuerpos de distintos isotipos que se distribuyen y localizan por todo nuestro organismo, participando en diversas funciones del sistema inmune.

Los anticuerpos también llamados inmunoglobulinas (Ig), están formados por dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas covalentemente por puentes de disulfuro. Cada cadena está formada por una serie de dominios de inmunoglobulina de estructura globular, los dominios son variables acordes a los isotipos de inmunoglobulinas producidas. Se conoce que IgM es el primer isotipo expresado por las células B, suele ser el marcador de una infección reciente o en proceso. Mientras que IgG es el isotipo de inmunoglobulina más abundante en el cuerpo que se expresa después de una infección o vacunación, suele ser indicador de que ya se ha tenido una infección y que el individuo podría estar protegido contra la enfermedad (inmunizado).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	177 de 187

Linfocitos T.

Son células que derivan del linfoblasto o inmunoblasto de la médula ósea ante influjo de la timopoyetina, hormona producida por las células epiteliales del timo. Son pequeños, de vida prolongada que se miden en meses o años, circulan en la sangre y los tejidos, ya en circulación, están listos a recibir de los macrófagos, los radicales inmunogénicos que estén preparadas para digerir los antígenos.

Estos radicales inmunogénicos se combinan con los receptores de la membrana del linfocito, migran combinados con estos receptores a un polo de la célula en donde se concentran, y por un proceso de endocitosis penetran el citoplasma del linfocito, que llevan a su transformación en una célula muy activa con capacidad de matar gérmenes o células contra las cuales ha sido inducido a responder, al recibir información del macrófago.

En la práctica médica se pueden evaluar las concentraciones o la presencia de una inmunoglobulina en suero, sangre o alguna muestra específica para saber si una persona tiene una infección o si ya la ha presentado y esta protegida contra ella, inclusive pueden servir para hacer diagnóstico sobre inmunodeficiencias. Estas pruebas se hacen como parte de una evaluación complementaria a la clínica.

En esta práctica se utilizará un inmunoensayo cromatográfico que nos permitirá saber si un paciente presenta anticuerpos o inmunoglobulinas contra una enfermedad en específico y por lo tanto evaluar su sistema inmune.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Lancetas
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	178 de 187

- Equipo/ cassette de prueba rapida para deteccion de anticuerpos IgG/IgM CoVid-19, detección de anticuerpos IgG *Helicobacter pylori* ó para anticuerpos IgM Virus de Influenza A/B y Virus de Parainfluenza. (dependiendo de la disponibilidad).

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Seguir las indicaciones del profesor para seleccionar al “paciente potencial” para la enfermedad de interés (esto dependerá del kit de diagnóstico disponible).
2. Revisando las instrucciones del fabricante se decidirá con qué tipo de muestra se trabajará (gota de suero o sangre total).
3. En ambos casos respetando la técnica aséptica, se obtendrá la muestra.
4. Si se decide trabajar con suero se realizará la obtención por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario sano, previo consentimiento del mismo.
5. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100, con anticoagulante y agitar suavemente.
6. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
7. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo de ensaye nuevo.
8. Si se decide trabajar con la gota de sangre total, se limpiará el dedo del paciente con una torunda con alcohol (esperar a que el alcohol evapore).
9. Se punzará la punta del dedo con la lanceta y se desechará la primera gota de sangre, son una pipeta se obtendrá la muestra de sangre apropiada.
10. En ambos casos se colocará la muestra de sangre total o de suero en el pozo determinado para ese fin, y dependiendo del equipo utilizado se colocará el amortiguador en la cantidad indicada por el fabricante.
11. Se esperará un tiempo aproximado de 2 a 10 minutos para leer el resultado (aparición de líneas).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	179 de 187

RESULTADOS

Los alumnos supervisados por el profesor revisaran la aparición de la líneas correspondientes e interpretaran los resultados. La aparición de una línea en la zona indicada de control indica que la prueba será válida, si la línea no aparece en la zona indicada de control querra decir que no es válida. Si aparece una línea en la zona de resultado indicara que es positivo para dicho resultado, si no aparece una línea el resultado es negativo. Será importante analizar que tipo de anticuerpo detecta la prueba para poder indicar si el paciente presenta una enfermedad activa (reciente) con IgM o si se ha inmunizado contra la enfermedad con IgG.

CUESTIONARIO

1. Describa la respuesta inmune celular.
2. ¿Cuál es la importancia de la respuesta inmune celular?
3. ¿Qué es un linfocito B y un Linfocito B? ¿Cuál es su importancia?
4. ¿Qué son las citocinas (linfocinas) y que son los anticuerpos?
5. Describa la respuesta inmune humoral.
6. ¿Cuál es la importancia de la respuesta inmune humoral?
7. Defina inmunoglobulinas y cuáles existen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., Shiv, Pillai. (2020). Inmunología básica (6ª ed.). Elsevier.
- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P.J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12ª ed.). Editorial Panamericana.
- Prieto Martín, A., Barbarroja Escudero, J., Barcenilla Rodríguez, H., D. Díaz Martín. (2013) Funciones de los linfocitos B. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 11 (28), 1752-1759, ISSN 0304-5412, [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70552-3](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70552-3).
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	180 de 187

Choque Anafiláctico.

OBJETIVO

- Identificar las etapas del choque anafiláctico clínica e inmunológicamente.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Durante varios años después del descubrimiento de las antitoxinas y de los anticuerpos antimicrobianos se creyó que las respuestas inmunes eran exclusivamente de tipo protector.

Aunque poco después se observó que estos mismos mecanismos podían ser activados por sustancias inocuas, como las proteínas de leche, la demostración de Portier y Richet, en 1902 de que las inmunes podían ser potencialmente peligrosas constituyó una sorpresa.

Durante un estudio de la toxicidad de extractos de anemonas de mar, estos investigadores observaron que los perros tratados con una segunda inyección administrada unas semanas después de la primera, presentaban a menudo un proceso agudo que les producía la muerte al cabo de pocos minutos. Richet llamó a esta respuesta

Anafilaxis. Del griego “ana”: contra y “pylaxis”: protección.

Von Pirquet, introdujo el término Alergia, denominar toda respuesta anormal frente a una sustancia que fuese introducida por la exposición anterior a esta misma sustancia. El aumento de la resistencia, que recibió el nombre inmunidad, y el aumento de la sensibilidad, que fue llamado hipersensibilidad se consideraron como formas opuestas de alergia, sin embargo, con el tiempo los términos alergia e hipersensibilidad se han hecho sinónimos, ambos hacen referencia al estado anormal inducido por un Ag, en el cual el misma Ag, o sustancia de estructura parecida pueden inducir una reacción patológica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	181 de 187

Gell y Coobs han clasificado estas reacciones alérgicas en tipo I, II, III y reacciones alérgicas IV.

Tipo de mecanismo	Manifestaciones
I	Reacciones de hipersensibilidad IgE
II	Anticuerpos antitóxicos IgG, IgM
III	Complejo Ag-Ab
IV	Hipersensibilidad tardía debida a células.

Por lo que podemos decir que el choque anafiláctico corresponde a una manifestación de la hipersensibilidad tipo I, en donde se producen anticuerpos de la clase IgE. Que no se fijan a las células cebadas y basófilos por medio del fragmento Fg.

La unión con el anticuerpo específico induce la degranulación de las células con la liberación consecuente de diversos mediadores químicos que provocan alteraciones vasculares.

Se ha ido detectando un número cada vez mayor de mediadores químicos, los mediadores principales desprendidos inicialmente de los basófilos y de las células cebadas, son histamina, factor quimiotáctico eosinófilo (FQE), sustancia de reacción lenta de las anafilaxis (SRL-A) factor de activación de plaquetas (FAP), heparina.

Otras reacciones secundarias subsecuentes, celulares y tisulares, llevan la liberación de otros mediadores que incluyen: Prostaglandina 5-hidroxitriptamina (serotonina) y cininas, para provoca el choque anafiláctico en el cobayo, se procede a inyectar un Ag (inyección sensibilizante). La inyección posterior de la misma sustancia producirá el choque y se conoce como inyección de desafío o choque.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	182 de 187

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Pipeta pasteur.
- Animales experimentales (Cobayo)
- Ovoalbumina al 10 %.
- Jeringas 1 mL.
- Campos estériles.

SERVICIOS

Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

- A. En caso de trabajar con animales experimentales
 1. A cobayos *naive* de 200-300 gramos de peso administrarles la dosis sensibilizante de antígeno; 0.1 ml. de ovoalbúmina al 10%.
 2. Esperar 14 días.
 3. Administrar la dosis de choque, mediante inyección intracardiaca de 0.1 ml. de ovoalbúmina al 10%.
 4. La misma dosis de choque aplicarla a un cobayo no sensibilizado (de control).
 5. Observar a los animales y medir el tiempo de aparición de los síntomas y de la muerte en dado caso.
 6. Realizar la disección del animal para observar las características de los órganos blanco.
- B. En caso de no trabajar con animales experimentales
 1. El profesor realizará una explicación introductoria a la práctica, dejando en claro los conceptos generales de las reacciones de hipersensibilidad.
 2. Se mostrará al alumno el material audiovisual (video) de la práctica de choque anafiláctico, durante la cual el profesor realizará las pausas pertinentes para explicar el procedimiento que se está llevando a cabo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	183 de 187

3. Después de ver el material audiovisual el profesor y los alumnos realizarán un análisis crítico del mismo, proponiendo los posibles resultados.
4. Los profesores de cada mesa discutirán con los alumnos diferentes escenarios clínicos acerca del choque anafiláctico (principales causas: alimentos, piquetes de animal, medicamentos, etc), revisando los criterios clínicos para el diagnóstico de anafilaxia, los diagnósticos diferenciales y el algoritmo de actuación en anafilaxia en el medio intra y extrahospitalario, así como el seguimiento general del paciente.

RESULTADOS

Observar a los animales y anotar todo lo que les ocurra. Con ayuda del profesor realizar el análisis de resultados, donde los síntomas (aparecen entre los 8 a 12 minutos) que generalmente se observan:

- Erizamiento de pelo de la cabeza y espalda
- Prurito en la nariz
- Estornudos
- Tos
- Taquipnea
- Bradipnea
- Respiración espasmódica
- Defecación
- Micción
- Convulsiones
- Muerte

En la disección de los animales, se deben observar los cambios en los órganos diana entre los cambios más importantes son:

- Congestión intestinal
- Aumento del peristaltismo intestinal
- Hemorragia diafragmática y vísceras
- Característico enfisema pulmonar (órgano de choque)
- El corazón puede seguir latiendo a pesar de la asfixia.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	184 de 187

CUESTIONARIO

1. Mencione la clasificación del fenómeno de hipersensibilidad.
2. ¿Por qué la inmunoglobulina está mediada la hipersensibilidad inmediata?
3. ¿Qué determina la prueba de shock, y cuál es su importancia?
4. Enuncie y explique cómo actúan los mediadores químicos (mínimo 5).
5. Explique ampliamente todas las características de IgE.
6. ¿Qué importancia tiene para el médico este tipo de reacción?
7. ¿Qué cambios presentaría el cobayo de control y por qué?
8. Enuncie el cuadro clínico de choque anafiláctico.
9. Enumere sustancias que puedan desencadenar un choque anafiláctico en el humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., y Shiv Pillai. (2020). Inmunología básica (6ª ed.). Elsevier.
- Abreu, L. M., Martin-Armendáriz, L. G. (2016). Fundamentos de Diagnostico (12ª ed.). Méndez Editores.
- Burton, D. R., Martin, S. J., y Delves, P. J. (2015). Roitt Inmunología. Fundamentos (12ª ed.). Editorial Panamericana.
- Cardona, V., Álvarez-Perea, A., Ansotegui-Zubeldia, I.J., et al. Guía de Actuación en Anafilaxia en Latinoamérica. Galaxia-Latam [Clinical Practice Guide for Anaphylaxis in Latin America (Galaxia-Latam)]. Rev Alerg Mex. 2019;66 Suppl 2:1-39. Spanish. doi: 10.29262/ram.v66i6.588. PMID: 31443138.
- Murphy, K., y Weaver, C. (2019). Inmunología de Janeway. Manual Moderno.
- Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., y Owen, J. A. (2020). Kuby Inmunología (8a ed.). McGrawHill.
- Romero, L., Jiménez, M., y Garcés, M. (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer.
- Tierney, L. M., Saint, S., y Whooley, M. A. (2011). Manual de diagnóstico clínico y tratamiento (4ª ed.). McGrawHill.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	185 de 187

ANEXOS

Reporte de Práctica

En la práctica médica el reporte de cualquier hallazgo en el paciente o en sus estudios de laboratorio y gabinete, se hace por medio de la nota médica en el expediente clínico, el cual debe cumplir los requisitos establecidos en la NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012. En el caso de la actividad en el laboratorio todos los hallazgos se reportan a través de un reporte de practica y la mayoría de los laboratorios hace el registro en bitácoras de resultados.

De manera general un reporte de práctica consta de:

1. Caratula o Portada. La cual sirve para identificar la universidad, la carrera, la disciplina/materia, el grupo y la mesa de trabajo (equipo) al que se pertenece, así como el nombre de los integrantes que realizaron la práctica en orden alfabético e iniciando por apellidos.
2. Introducción. Sirve para proporcionar la base teórica que fundamenta el trabajo a realizar, es decir, los aspectos conocidos del tema (como conceptos y definiciones). Debe incluir una revisión sintetizada de la literatura científica existente sobre el tema, en un lenguaje claro y concreto del tema; por lo que debe incluir referencias bibliográficas. Para citar a las referencias deberá utilizar números colocados entre paréntesis.
3. Objetivos. Son los mencionados en el manual de práctica de laboratorio.
4. Métodos y materiales. En esta sección se describen materiales biológicos utilizados (cepa, origen, etc.) y materiales físicos (brevemente).

Importante describir los métodos (metodología/técnicas) utilizados de manera muy detallada, y dependiendo del caso usar un diagrama de flujo. En ocasiones el desarrollo de la práctica varía un poco con respecto al manual, por lo que se debe explicar la metodología que se utilizó al realizar la práctica o las adecuaciones que se realizaron. En esta sección los verbos siempre van en pasado, por ejemplo: se realizó, se observó, etc. Los nombres científicos deberán ser escritos en cursiva, sin subrayar; las sustancias químicas podrán



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	186 de 187

ser mencionadas por su nombre o su fórmula condensada, sólo uno de los dos. Si se mencionan unidades deberán usarse aquellas del sistema internacional o toleradas por éste y conforme a la NOM-008-SCFI-2000.

5. Resultados. Es una de las secciones más importantes del reporte, en esta sección los resultados obtenidos se describen y explican de manera clara; se pueden utilizar las figuras y cuadros que considere convenientes, procurando que no sean excesivos. Las figuras o imágenes deben incluir un texto que describa lo que se está observando. En caso de ser necesario se pueden utilizar cuadros o tablas, los cuales deben ser breves y no deben estar saturados de información.

En esta sección es importante señalar que, para llevar un registro adecuado de los resultados obtenidos, se puede hacer uso de una bitácora de resultados, que es una libreta foliada en la cual se escribe todo lo que se hizo en la práctica (cualquier detalle durante la metodología que pudiera alterar el resultado esperado) y lo más importante, se registra todos los resultados obtenidos (qué fue lo que se observó, qué coloración se obtuvo, la descripción de una imagen observada al microscopio, o si alguna fotografía es la indicada para presentar los resultados, etc) esta bitácora se escribe preferentemente con tinta y por lo regular se designa a un responsable por práctica para que anote todo. Será preferencia del equipo y decisión del profesor titular de la mesa si se utiliza o no.

6. Discusión y Análisis de resultados. En esta sección se analizan y discuten los resultados obtenidos, es decir, se tratan de comparar los resultados obtenidos en la práctica, con los reportados en la literatura científica sobre el mismo tema. En esta sección de discusión también puede llevar bibliografía.

7. Conclusiones. Se deberá concluir con respecto a los objetivos de su trabajo y la importancia y novedad de sus resultados. La información de resultados y discusión NO debe repetirse en las conclusiones. Las conclusiones suelen ir numeradas y en un máximo de 5 o pueden ir integradas en un solo párrafo (el profesor responsable de la mesa de trabajo puede sugerir cual sería la conveniente o sugerir un estilo propio).

8. Cuestionario. Se debe responder el cuestionario correspondiente a la práctica en esta sección y deberá llevar bibliografía, en caso de que la práctica lleve cuestionario.

9. Referencias bibliográficas. En esta sección se deben listar todas las referencias citadas en el reporte; esto puede hacerse en orden alfabético o en el orden en que aparecen



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	03 agosto 2023	02	187 de 187

en el reporte.

Para redactar el reporte es recomendable consultar al menos cuatro fuentes bibliográficas (libros), para artículos y fuentes de divulgación en formato electrónico no hay límite. La bibliografía debe seguir el formato APA o Vancouver actualizado. Algunos ejemplos:

- Libros: Apellido(s), Inicial del nombre del autor. Año de publicación. Título del libro. Subtítulo. Editor(es): mismo orden que el autor.
- Artículos de revistas de divulgación científica: Apellido(s), Inicial del nombre del autor. Año de publicación. Título del artículo. Nombre de la Publicación. Número de volumen: páginas consultadas.

Paginas en internet: Apellido(s), A. A. (Fecha). Título de la página. Lugar de publicación: Nombre de la página web. dirección de donde se extrajo el documento (URL).