

**Carrera de Médico Cirujano**

**Coordinación Área Biomédica**

**Microbiología e Inmunología**

**SGC-FESZ-MC-ML03**

Fecha de aprobación por el CAC

## **DIRECTORIO FES ZARAGOZA**

**Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez**

Director.

**Dr. Vicente J. Hernández Abad**

Secretario General.

**Dra. Rosalinda Escalante Pliego**

Secretaría de Integración, Promoción y Desarrollo Académico.

**M. en C. Faustino López Barrera**

Secretario de planeación.

**Dra. Mirna García Méndez**

Coordinadora de trayectoria escolar de las Ciencias de la Salud y del Comportamiento.

## **CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO**

**Dra. Claudia María Mesa Dávila**

Jefa de la Carrera.

**Dra. Gabriela Vázquez Leyva**

Secretaria Técnica.

**Dra. Leticia Apiquian Quiroz**

Coordinadora del Área de Ciencias Biomédicas.

**Dra. Irma Araceli Aburto López**

Coordinador del Área de Ciencias de la Salud Pública.

**Dr. Miguel Ángel García González.**

Coordinador del área de Ciencias Clínicas.

**Dra. Laura Olalde Monte de Oca**

Coordinadora del Área Terminal Internado y Servicio Social.

**Elaborado por:**

José Fernando Arellano Cobián.  
Yolanda García Méndez.

**Revisado por:**

Luis López Pérez.  
Emelina Amil Estrada.  
Lina Ortíz Ibarra.  
Evangelina López Nieto.

**Coordinado por:**

José Fernando Arellano Cobián.  
Coordinador de Microbiología, Parasitología e Inmunología Clínica.  
Primer año

# ÍNDICE

Descripción y uso del microscopio. ....	1
Tinciones Simples. ....	11
Tinción de Gram y Ziehl-Neelsen. ....	16
Medios de cultivo y técnicas de aislamiento de bacterias. ....	25
Morfología bacteriana y colonial. ....	33
Análisis bacteriológico de aguas para la determinación de coliformes. ....	42
Microcultivo de hongos. ....	47
Requerimiento gaseoso y temperaturas para el crecimiento bacteriano. ....	52
Obtención y aislamiento de cultivos puros. ....	58
Mecanismo de patogenicidad y virulencia. ....	62
Fisiología o metabolismo bacteriano. ....	66
Acción de agentes físicos y químicos sobre el crecimiento bacteriano. ....	71
Antibiograma. ....	78
Microorganismos patógenos y enfermedad. ....	83
Reacciones de precipitación en gel (OUCHTERLONY) ....	88
Reacción de precipitación en capilar. ....	93
Reacciones de aglutinación. ....	97
Gonadotropina Coriónica Humana. ....	101
Fagocitosis: ....	106
Antiestreptolisinas. ....	117
Complemento. ....	122
Proteína C Reactiva. ....	126
Determinación del grupo sanguíneo y pruebas cruzadas. ....	131
Factor reumatoide. ....	137
Inmunidad específica. ....	142
Choque Anafiláctico. ....	147
REGLAMENTO DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA. ....	151



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>1 / 160</b>

# Descripción y uso del microscopio.

## OBJETIVOS:

- Antecedentes históricos del microscopio.
- Conocimiento de las partes fundamentales del microscopio
- Manejo del microscopio.
- Observación con el microscopio.
- Cuidados que se deben tener con el microscopio
- Factores que dañan al microscopio
- Principales aplicaciones de otro tipo de microscopios

## INTRODUCCIÓN:

Que divertido debía ser mirar a través de una lente y ver las cosas de tamaño mayor a simple vista. Pero ¿comprar lentes? ¡No sería Leeuwenhoek quien tal cosa hiciera! ¡Jamás se vio hombre tan desconfiado! ¿comprar lentes? ¡No; él se las fabricaría!

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 revelaron a los ojos maravillados de sus contemporáneos el universo de lo infinitamente pequeño.

El descubrimiento de los animálculos y de las bacterias se debe, sobre todo al genial Leeuwenhoek, y abrió a las investigaciones un campo de acción nuevo e insospechado; hizo retroceder las fronteras del mundo vivo hasta los límites extremos de la pequeñez y puso también de manifiesto el infinito poder de expansión de la vida.

Del conocimiento de los animálculos al de sus estructuras sólo había un paso y este se dio. El descubrimiento de la organización y de la unidad de la célula fueron sus consecuencias lógicas y fecundas.

El descubrimiento del microscopio no ha dirigido a las investigaciones medico/biológicas en un solo sentido; por lo contrario, la ha diversificado y le ha dado acceso a un mundo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>2 / 160</b>

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 objetico 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 4 sistemas:

#### **A) Sistemas 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)

#### **B) Sistema de aumento**

El sistema de aumentos.

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>3 / 160</b>

### LOS OBJETIVOS.

- El aumento

Está indicado para cada lente, por un número que se encuentra que se encuentra grabado en su tubo.

-el objetivo 5 aumenta 5 veces

-el objetivo 10x aumenta 10 veces presentando en la circunferencia del tubo cercano a la lente una banda de color AMARILLO

-el objetivo de 40 x aumenta 40 veces presentando banda de color AZUL

-el objetivo 100x aumenta 100 veces presentando una banda de color BLANCO. Es el objetivo que utiliza en inmersión aceite de cedro.

- Distancia frontal útil de objetivo

Es la distancia frontal que separa el objetivo de la preparación a examinar cuando tienes 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

### 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 aumenta 50 a 1000 veces las imágenes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>4 / 160</b>

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.

	<i>OCULAR</i>	<i>OBJETIVO</i>	<i>AMPLIFICACIÓN</i>	<i>DIÁMETRO CAMPO</i>
<i>SECO DÉBIL</i>	10x	10x	100x	1500 micras
<i>SECO FUERTE</i>	10x	40x	400x	900 micras
<i>INMERSIÓN EN ACEITE</i>	10x	100x	100x	120 micras

### C) Sistema de iluminación

**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.

**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.

**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

Integrado por:

- 1) **TORNILLO MICROMÉTRICO.** Tornillo de enfoque rápido. Es el tornillo más rápido y se utiliza primero.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>5 / 160</b>

- 2) 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.
- 3) 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

El esfuerzo excesivo y la fatiga deben evitarse en la observación microscópica.

Esto se consigue atendiendo a los siguientes hábitos:

- 1) El banco y la mesa deben estar a una altura que le permita al observador el uso del microscopio en posición vertical.
- 2) Encender la fuente de iluminación.
- 3) Montar la preparación que se va a observar
- 4) Separar lo 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 ni 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.

- 5) Enfoque de imágenes.

Para enfocar con cualquier objetivo, pero especialmente con el seco fuerte 40x y con el de inmersión 100x deberá acercarse el objetivo a la preparación observada del lado para controlar el descenso hasta que la lente frontal de dicho objetivo que de dentro de la distancia focal. Solo entonces 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 enfoque con el objetivo de inmersión 100x.

Colocar la laminilla perfectamente seca agregar una gota de aceite de inmersión sobre la parte a examinar. Bajar el objetivo 100x para que quede en contacto con el aceite lo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>6 / 160</b>

más cerca posible sin llegar a romperla OBSERVACIÓN DE LADO para controlar del descenso. Observa en el ocular, mover lentamente el tornillo micrométrico hasta que se vea la imagen.

- 6) 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.
- 7) Al terminar sus observaciones los alumnos deberán limpiar nuevamente los objetivos y las preparaciones.

### OBSERVACIÓN CON EL MICROSCOPIO

- A) ASEGURARSE de las características del preparado que va a observar, es decir que órgano, tejido, o bacteria se encuentra montado en la laminilla.
- B) Limpie la preparación, con cuidado no ejerciendo mucha fuerza sobre ella, con trapo o franela que deberá siempre traer. Si es necesario use xilol para quitar el aceite de una observación anterior, o la grasa de los dedos, en este punto es importante el asesoramiento por su profesor de laboratorio.
- C) Antes de colocar su preparación sobre la platina del microscopio, véase contra la luz a simple vista. Existen dos motivos para ello, en primer lugar, el cubreobjetos puedes estar cubierto de polvo, sucio o cubierto de aceite endurecido.
- D) El ocular y las lentes objetivas deben estar limpias la limpieza de las mismas se hará usando solo papel para este propósito, (Lens cleaning paper de kodak). Limpie con un fragmente de este papel la lente del ocular, no extraer el ocular, limpie la lente de los objetivos.
- E) Seleccione un campo o campos apropiados y previa observación 5x, 10x obsérvese a 40x.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>7 / 160</b>

- F) Para ver una observación a inmersión es necesario centrar primero el campo que se desea observar, a 10x y después a 40x.

### FACTORES QUE DAÑAN AL 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 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
- 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.

### **MATERIAL:**

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>8 / 160</b>

### SERVICIOS:

- Luz

### DESARROLLO:

1. Las preparaciones proporcionadas enfocarlas con los diferentes objetivos (5x, 10x, 40x y 100x).
2. Efectuar esquemas de los diferentes tipos de microscopios que existen como también las preparaciones que se proporcionaron en los diferentes objetivos.

### 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?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>9 / 160</b>

5) ¿Qué significa microscopio simple y compuesto?

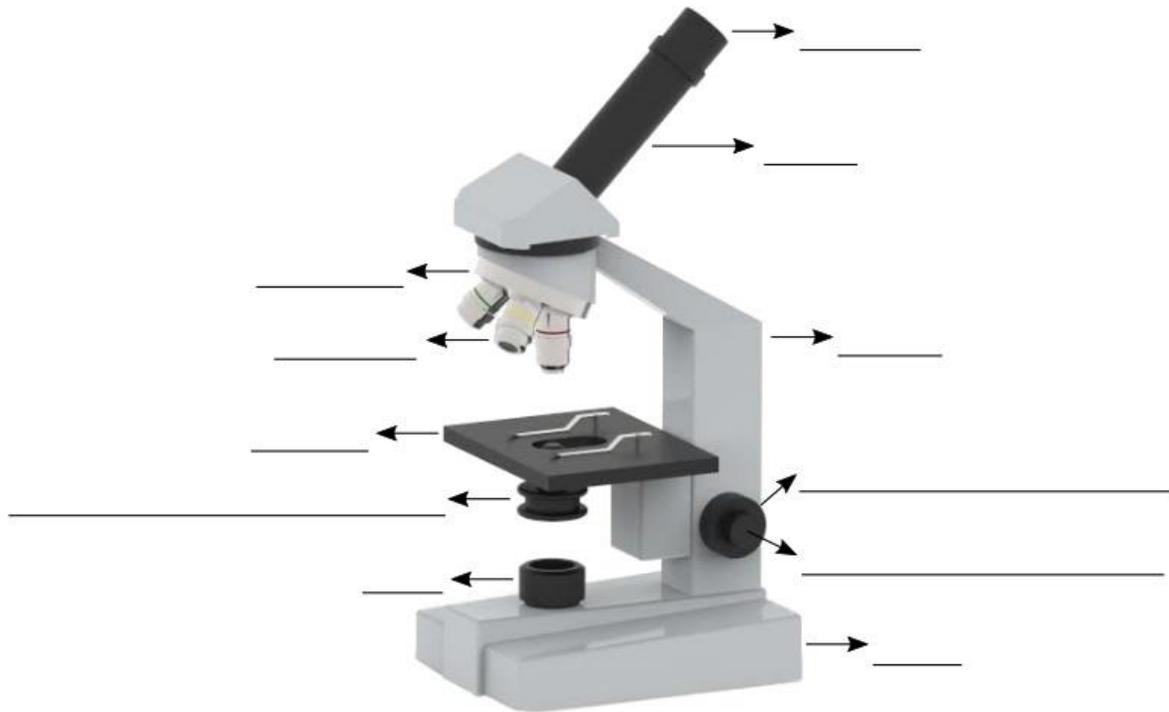
6) ¿Qué es poder resolución?

7) Defina distancia frontal mínima o útil.

8) Señale las partes del microscopio

CONCESIÓN

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>10 / 160</b>



**RESULTADOS:**

**BIBLIOGRAFÍA:**

- Brooks G. Carrol K. Microbiología Médica. 26a edición. Jawetz, Melnick Adelberg. McGrawHill. 2014.
- Mac Faddin, Jean F., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; México 2003
- Sherris, Microbiología médica McGraw-Hill Interamericana Editores. México 2017.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>11 / 160</b>

# Tinciones Simples.

## OBJETIVOS:

- Conocer diversas técnicas de coloración
- Observación de preparaciones a diferentes objetivos
- Conocer la forma y estructura de una bacteria
- Aprender a realizar un frotis con tinción en una bacteria

## INTRODUCCIÓN:

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>12 / 160</b>

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.
- b) Las técnicas de coloración especial o diferentes.

*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.

*TÉCNICAS DE COLORACIÓN ESPECIAL:* 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.

#### **MATERIALES:**

- Portaobjetos
- Mechero
- Asa con porta-asa
- Microscopio
- Colorantes: Azul de metileno, KOH al 10%, Verde de malaquita
- Cultivos de: *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*.

#### **SERVICIOS:**

- Gas
- Agua corriente
- Luz

#### **DESARROLLO:**

1. Colocar una gota de agua sobre un portaobjetos limpio, con el asa se toma una muestra del cultivo de una de las cepas.
2. Esta muestra se coloca sobre el portaobjetos, emulsionar sobre la gota de agua.
3. Fijar el calor.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>13 / 160</b>

4. Secar al aire

5. La coloración se efectúa agregando una gota del colorante, dejar 2-3 minutos.
6. Lavar con agua (chorro leve y no directo sobre la muestra).
7. Secar y con aceite de inmersión observarlas al microscopio.
8. Efectuar una tinción para cada una de las bacterias.
9. Reportar las diferencias morfológicas observadas y efectuar esquemas.
10. El asa bacteriológica deberá ser esterilizada al calor antes y después de cada paso.

### RESULTADOS:

Observar la tinción de cada cepa a diferentes aumentos en el microscopio y anotar tus conclusiones.

### CUESTIONARIO:

1. Definir colorante:
2. Enuncie 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
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>14 / 160</b>

4. ¿Qué ventajas se tienen en una preparación entre porta y cubreobjetos y que desventajas?

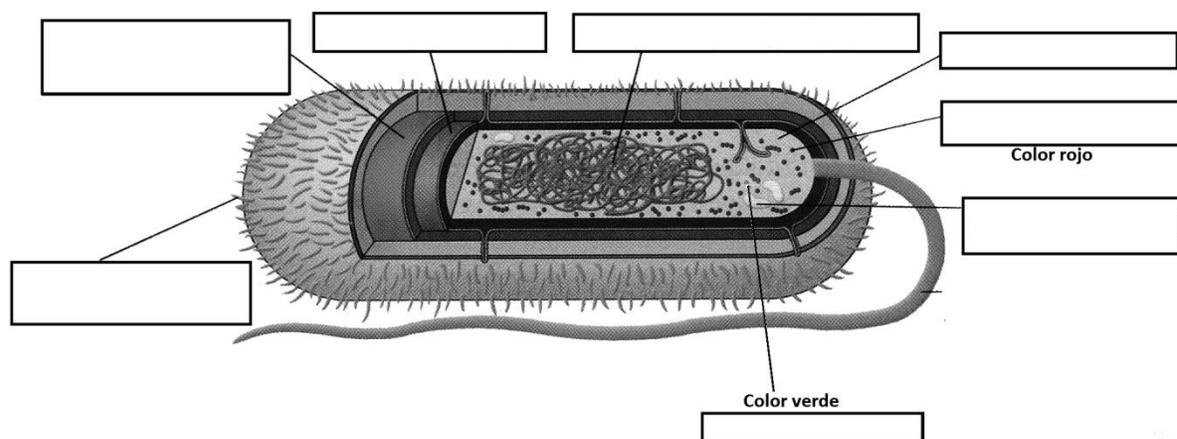
5. ¿En qué consiste un colorante básico y un colorante ácido?

6. ¿Cuál es la importancia de las técnicas de coloración?

7. Enuncie tres bacilos patógenos para el humano

8. Enuncia los componentes de toda su estructura.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>15 / 160</b>



### BIBLIOGRAFÍA:

- Jawetz, J.E., Microbiología Médica. McGraw-Hill Interamericana Editores. México 2016.
- Mac Faddin, Jean F., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; México 2003
- Sherris, Microbiología médica McGraw-Hill Interamericana Editores. México 2017.
- Tortora, Funke, Case, Introducción a la Microbiología. 9ª edición. Editorial Panamericana. México. 2013.
- Esaú López L, Hernández Durán M, Colín-Castro C. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Vol. 3, Núm. 1 Enero-Marzo 2014 pp 10-18 (en línea) Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141>.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>16 / 160</b>

# Tinción de Gram y Ziehl-Neelsen.

## OBJETIVOS:

- Reconocer la importancia bacteriológica y médica de la coloración de Gram y Ziehl-Neelsen
- Conocimiento y práctica de las tinciones mencionadas

## INTRODUCCIÓN:

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 las teñimos, una coloración simple (azul de metileno), muestra muy bien la forma y dimensión de los organismos, pero hay otros métodos que dan más información.

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

Entre las tinciones diferenciales; la tinción de Gram y la tinción para microorganismos ácido-resistentes, son las más utilizadas.

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

- a. Las llamadas organismos **Gram positivos**, que conservan el color morado de la sustancia violeta de genciana.
- b. Las llamadas 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
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>17 / 160</b>

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.

En la primera parte de la tinción, esta se baña con violeta de genciana (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 las 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 gramnegativas.

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.

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
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>18 / 160</b>

## **Mecanismo de coloración de Gram. Diferencias entre bacterias grampositivas y gramnegativas.**

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 gramnegativos 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, 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>19 / 160</b>

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

## MÉTODO DE COLORACIÓN ÁCIDO-RESISTENTE

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 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.

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>20 / 160</b>

## MATERIAL:

- Cristal de Violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Sfranina
- Fucsina de Ziehl
- Azul de metileno
- Alcohol ácido
- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero de bunsen
- Aceite de inmersión
- Microscopio
- Temporizador

## CEPAS:

- Bacillus subtilis
- Staphylococcus aureus
- Serratia marcescens
- Proteus vulgaris
- Mycobacterium sp.

## DESARROLLO:

### 1. TÉCNICA DE COLORACIÓN DE GRAM:

- Esterilizar el asa antes y después de cada paso.
- Preparar un frotis con cada una de las cepas, fijando al calor.
- Cubrir la preparación con cristal violeta durante un minuto.
- Lavar con agua, chorro leve.
- Cubrir con Lugol, durante un minuto.
- Lavar con agua, chorro leve.
- Cubrir con alcohol-acetona, durante 10 segundos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>21 / 160</b>

- Lavar con agua
- Cubrir con safranina durante 30 segundos.
- Lavar, y dejar secar al aire
- Observar al microscopio.

## 2. TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN

- Preparar un frotis con cultivo de Mycobacterium.
- Cubrirlo con Fucsina de Ziehl
- Dejar reposar durante 30 segundos
- Calentar hasta la emisión de vapores, durante 4-6 minutos.
- Cuidar que el colorante no se seque, y no hierva, agregando más colorante.
- Dejar enfriar y lavar con agua
- Decolorar Con Alcohol Ácido
- Lavar con agua
- Cubrir la preparación con azul de metileno, durante 1-3 minutos
- Lavar con agua, dejar secar
- Observar al microscopio

**RESULTADOS:**



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>22 / 160</b>

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

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

## CUESTIONARIO

1. ¿A qué se llama microorganismos ácido-resistentes?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>23 / 160</b>

- ¿Qué papel desempeña la pared celular en la tinción de Gram?
- ¿Qué papel tiene el colorante secundario en la tinción de Gram?
- ¿Qué factores pueden variar la tinción de Gram?
- ¿Qué importancia tiene la tinción de Gram?
- Mencione 3 nombres de bacterias que sean acidorresistentes.
- Defina los términos Gram-positivo y Gram-negativo.
- Enumerar algunos tipos de bacterias gram-positivas y gram-negativas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>24 / 160</b>

9. ¿Qué es un mordiente y cuál se utiliza en la tinción de Gram?

## BIBLIOGRAFÍA

- Brooks G. Carroll K. Microbiología médica de Jawetz, Melnick & Adelberg. 27ª ed Mc Graw-Hill. 2016
- Prescott L.M., Harley J.P. and Klein D.A., Microbiología, 3a edición, Madrid, México, Mcgraw Hill-Interamericana, 2009.
- D. L. Vullo, M. B. Wachsman, L. B. Alché. Microbiología en práctica, Editorial Atlante, Buenos Aires, 2000.
- Ivan M. Roitt, Peter J. Delves. "Inmunología Fundamentos", 10ª Edición, Ed. Panamericana. 2006.
- Murray Patrick. Microbiología Médica. 7ª Edición., Elsevier Saunders. 2014



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	25 / 160

# Medios de cultivo y técnicas de aislamiento de bacterias.

## OBJETIVO:

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

## INTRODUCCIÓN:

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

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, los virus y las rickettsias, sin embargo, no se reproducen in vitro, si no tienen, además células de tejidos vivos, como en el cultivo en tubo de ensayo con células de riñón de mono o con células de cáncer humano.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>26 / 160</b>

La mayoría de los medios de cultivo utilizados en bacteriología y micología son mezclas preparadas empíricamente y no se tiene conocimiento exacto de su composición o de un valor nutritivo. Los medios de cultivo artificiales, de composición química definida y reproducible, aumenta día a día, con el fin de resolver problemas especiales en la investigación y en microbiología industrial.

El número de variedades de medios de cultivo no tiene límite, excepto el que impone la imaginación y laboriosidad de los bacteriólogos.

Cada investigador es libre para idear sus medios, de acuerdo con lo que se propone.

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

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

A) Los medios líquidos 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 e mediante “agitación” de asa dentro de él.

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.

Agar simple: (medios simples), el 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>27 / 160</b>

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 azul de metileno cocina (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.

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.

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 inhibitor 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>28 / 160</b>

Con frecuencia se añade penicilina, estreptomycin, 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:**

- Mechero
- Asa bacteriológica
- Lápiz graso o marcador
- 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 Stap 110
- Hisopos estériles
- Gradilla

### **CEPAS:**

- Staphylococcus aureus
- Klebsiella pneumoniae
- Pseudomona sp.

### **SERVICIOS:**

- Electricidad
- Agua
- Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>29 / 160</b>

## DESARROLLO:

1) El profesor de laboratorio hará una demostración del empleo adecuado del asa bacteriológica.

### 2) SIEMBRA EN MEDIO INCLINADO

- Asegúrese de que los tapones de los tubos giren y salgan fácilmente.
- Sostener el tubo del cultivo y el que se va a inocular con la mano izquierda, (tomar el de *Staphylococcus aureus*).
- Esterilizar el asa en el mechero, dejar enfriar.
- Sin soltar el porta-asa quitar los tapones de ambos tubos usando para ello diferentes dedos de la mano derecha.
- Flamear ligeramente las bocas de los tubos.
- Introducir el asa en el tubo de cultivo y tomar una asada de bacterias.
- Sembrar el tubo de agar inclinado por estría superficial, en ligeros movimientos en zigzag.
- Retirar el asa, flamear brevemente las bocas de los tubos y colocar los tapones de algodón nuevamente en su sitio.
- Esterilizar el asa en el mechero nuevamente.
- Colocar el material en la gradilla.
- Etiquetar los tubos.
- Incubar a 37°C por 24-48 horas.

### 3) SIEMBRA EN CALDO NUTRITIVO.

- Repita los procedimientos señalados en el punto número 2.
- Sembrar agitando brevemente el asa, dentro del tubo con caldo nutritivo. Emplear de la cepa de *Staphylococcus aureus*.

### 4) SIEMBRA POR PICADURA.

- Se repiten todos los procedimientos del punto número 2.
- Solo que para sembrar el asa deberá estar totalmente recta.
- 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.
- Emplear el medio de SIM, así como la cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

### 5) Siembra en cajas de Petri por el método de ESTRÍA CRUZADA.

- Primero se trazará con el lápiz graso por detrás de una de las cajas de Petri (AN), quedando 3 cuadrantes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>30 / 160</b>

- Esterilizar el asa al rojo vivo.
- Enfriar (dentro de la zona estéril)
- Tomar el tubo con la cepa indicada (*Pseudomona* sp)
  
- Se quitará el tapón, flamear la boca del tubo, tomando una asada del cultivo (este paso ya fue descrito). Tomada la muestra depositarla en el cuadrante número 1.
- Con la mano izquierda levantar parcialmente la tapa de la caja de Petri.
- Trazar una serie de zigzags muy cerrados a todo lo largo del sector 1.
- El maestro (a) demostrará cómo tomar y abrir la caja con una sola mano.
- Esterilizar el asa.
- 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.
- Esterilizar el asa.
- Sin inóculo hacer un tercer zigzag en el cuadrante 3 invadiendo al sector 2 en las primeras líneas. Sin tocar al primer cuadrante.
- Esterilizar el asa.
- Incubar a 37°C por 24-48 horas.

\*En la caja de Petri con agar sangre, sembrar también por el método de estría cruzada, seguir los mismos pasos solo que en el primer cuadrante la inoculación será con un hisopo, tomando la muestra de la cavidad oral (exudado faríngeo), para continuar después con el asa bacteriológica los demás cuadrantes, quemar el hisopo.

En la caja de Petri con agar S-110 por estría cruzada siembra del cultivo de *Staphylococcus aureus*.

## RESULTADOS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>31 / 160</b>

## CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es 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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>32 / 160</b>

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?

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Panamericana. México. 2004
- Könemann, E.W., Allen, S.D., Janda W.M., Schreckenberger P. C. y Winn W.C. 2003. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color. Ed. Panamericana. México. 1432 p.
- Madigan M.T., Martinko M.J. y Parker J. 2006. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S.A. 1011 pp.
- Granados P.R. y Villaverde P.M. 2008. Microbiología. Ed. Paraninfo. España.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	33 / 160

# 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.
- Importancia de la curva de crecimiento.

## INTRODUCCIÓN:

El método más común para examinar bacterias es hacer primero una película delgada de los organismos sobre un portaobjetos limpio y después aplicar colorantes al frote 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, es bastante severo y puede 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).

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>34 / 160</b>

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
- B. Grupo auxocromo

**Grupo cromóforo:** grupo químico, que confiere a la molécula la propiedad de proporcionar color.

**Grupo auxocromo:** 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.

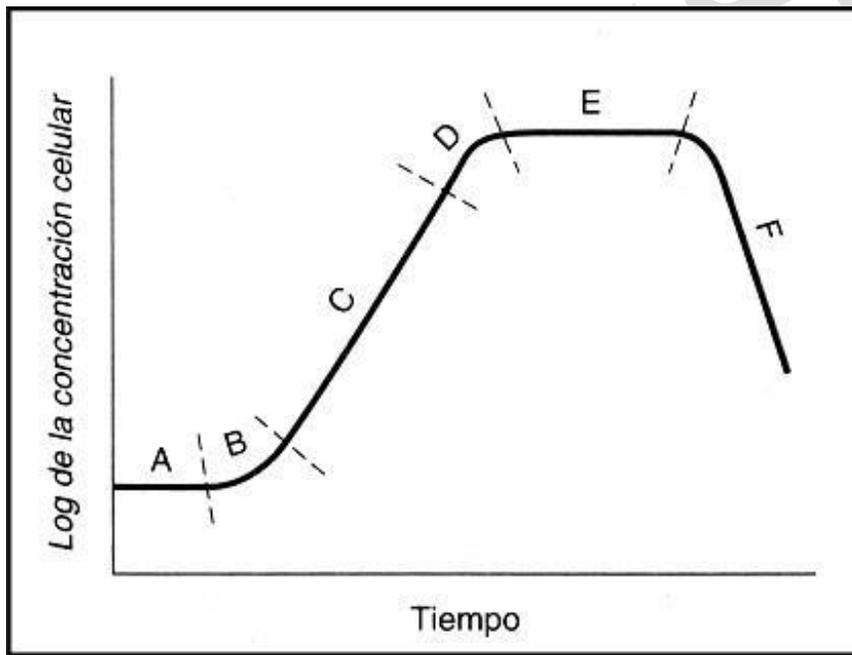
La velocidad de crecimiento de un cultivo en un momento dado es directamente proporcional al número de células presentes en ese momento.

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 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>35 / 160</b>

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)



### Morfología colonial

Además de las diferencias estructurales de una colonia, debidas a las múltiples especies, las bacterias de una sola especie pueden formar varios tipos diferentes de colonias.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>36 / 160</b>

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 emplear la siguiente terminología.

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

### MATERIAL:

#### Colorantes:

- Rojo Congo
- Colorante de Albert
- Verde de malaquita
- Mordiente de Knaysi
- Mordiente de cápsula
- Fucsina
- Lugol
- Safranina

### Cepas:

- *Klebsiella pneumoniae*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>37 / 160</b>

- Bacillus megaterium
- Corynebacterium sp
- Bacillus subtilis

### Equipo:

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
  
- Mechero
- Microscopio
- Asa y porta-asa
- Aceite de inmersión
- Cajas de petri con crecimiento de diferentes colonias bacterianas.

### SERVICIOS:

- Electricidad
- Agua
- Gas natural

### DESARROLLO:

#### Demostración de cápsula

##### Método de rojo congo

- Colocar una gota de colorante rojo congo en un portaobjetos limpio
- Hacer una suspensión con la cepa de Klebsiella pneumoniae
- Dejar secar al aire y fijar al calor
- Agregar mordiente de cápsula y dejar por tres minutos
- Lavar con agua corriente
- Secar y observar a 10X, 40X y 100X

##### Resultado

Las cápsulas aparecerán como zonas claras y las células y el fondo de color rojo.

#### Demostración de pared celular



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>38 / 160</b>

### **Método técnico de Knaysi**

- Emplear la capa de Bacillus megaterium, preparar un frotis
- Fijar al calor
- Colocar mordiente de Knaysi por 10 minutos
- Lavar con agua corriente, (sin que pegue directamente en la muestra)
- Colocar una gota de Fucsina y colocar un cubreobjetos
- Observar el microscopio a 10X, 40X y 100X

### **Demostración de gránulos de Albert**

#### **Método con técnica de Albert**

- Emplear la cepa de Corynebacterium sp
- Preparar un frotis
- Fijar al calor
- Cubrir el frotis con colorante de Albert por 5 minutos
- Calentar un poco el portaobjetos, con pases sobre la flama del mechero, cuidar de no secar, por medio minuto
- Lavar con agua y secar
- Aplicar lugol durante un minuto
- Lavar con agua y dejar secar
- Observar a 10X, 40X y 100X

### **Resultado**

Los gránulos metacromáticos aparecen de color azul oscuro y el citoplasma verde pálido.

### **Demostración de endosporas**

#### **Método con técnica de Scheffer-Fulton**

- Emplear la cepa de Bacillus subtilis
- Preparar un frotis
- Dejar secar y fijar al calor
- Cubrir la preparación con verde de malaquita
- Calentar con pases sobre la flama del mechero, hasta que se formen vapores, durante un minuto
- Lavar con agua corriente
- Agregar safranina durante medio minuto



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>39 / 160</b>

- Lavar
- Dejar secar al aire
- Observar a 10X, 40X y 100X

## RESULTADOS

- Las esporas se tiñen de color verde y el citoplasma de color rojo.

\*\*\*En las cajas de petri con crecimiento bacteriano, efectuar todos los parámetros señalados para leer morfología colonial, efectuando su lectura y anotar los datos encontrados de cuando menos tres colonias y anotar el tipo de medio de cultivo de la colonia estudiada, (AS, AN, S100, ACH, BHT, AST, VB, Etc).

\*\*\*Efectuar esquemas de cada tinción, indicando, la bacteria empleada, el objetivo del microscopio que se usó para la observación, características del color, así como la técnica y estructura observada.

## 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?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>40 / 160</b>

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
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>41 / 160</b>

## BIBLIOGRAFÍA:

- Brooks G. Carroll K. Microbiología Médica, Jawetz, Melnick, Adelberg. 27 Ed. El Manual Moderno, México. 2016
- Dulbecco Davis. Tratado de Microbiología, Ed. Salvat, 3ª. Ed. México 2003
- Pelczar, M.J. R.D. Microbiología, Libros Mc Graw-Hill, México. 3ª Edición. 2001.

CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	42 / 160

# Análisis bacteriológico de aguas para la determinación de coliformes.

## INTRODUCCIÓN:

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, que para llevarla a cabo existen varios métodos, de los cuales algunos son muy accesibles y otros muy complejos.

Pero de lo que se trata finalmente es de eliminar a cualquier tipo de microorganismo patógeno que se encuentre en el agua, para poder demostrar dichos microorganismos se emplean medios de laboratorio. Sin embargo, no hay duda que existe una flora bacteriana normal y características de las aguas naturales.

Los tipos de bacterias que caracterizan esta población son:

**Bacterias superiores:** frecuentemente las formas encapsuladas que incluyen bacterias de azufre, de hierro y formas similares.

**Prostecados o bacterias con apéndices:** que se encuentran en lagos y otras colecciones de agua, adheridas a algún objeto inanimado.

**Las formas espirales:** que se encuentran en gran número en el agua, algunas pueden ser muy grandes en comparación con los espirilos parasitarios.

Gran variedad de bacilos, incluyendo:

- Formas pigmentadas: bacterias fluorescentes, pseudomonas.
- Diversas formas no pigmentadas: bacterias sulfurosas, termófilas, bacilos aerobios, formadores de esporas.

Formas de cocos:

- Pigmentadas: generalmente amarillas, con gran frecuencia sarcina lutea
- No pigmentados. Bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia azotobacter.

Estas bacterias del agua se encuentran en el agua dulce de pantanos, arroyos y lagos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>43 / 160</b>

Además de las bacterias del agua, esta puede y suele contener una diversidad de bacterias que la contaminan desde fuentes externas.

## Aire suelo y excreciones

El número de bacterias en el aire está relacionado íntimamente con la cantidad de partículas grandes o polvo que tiene suspendidas.

La cantidad de bacterias que pueden encontrarse en el agua depende principalmente del tipo de agua. Diversos factores ambientales influyen en el contenido de bacterias del agua; entre los principales están la cantidad de materia orgánica que contenga y la temperatura.

Puede deducirse que, en el análisis bacteriológico del agua, que ciertas bacterias permiten conocer la calidad de agua. De las bacterias de asociadas a las heces, los bacilos coliformes constituyen un mayor número, por tanto, cualquiera de estos microorganismos, podrían usarse como indicador de la calidad de agua.

El examen bacteriológico del agua para buscar bacilos coliformes se apoya con el hecho de que estos microorganismos fermentan lactosa.

Los medios con los cuales se juzga la calidad sanitaria del agua puede resumirse:

Análisis bacteriológico, incluyendo:

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>44 / 160</b>

Mediante el examen bacteriológico o de otra manera 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 y 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 formad similares patógenas.

#### **MATERIAL:**

- Mechero
- 3 tubos de caldo lactosado, rojo de metilo con campana durham.
- 3 placas de agar EMB
- Muestras de agua: charco, llave, tinaco, etc.

#### **SERVICIOS:**

- Agua corriente
- Gas natural
- Energía eléctrica



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>45 / 160</b>

### DESARROLLO:

1. Tomar varias muestras de agua a estudiar con el asa, previamente agitar el agua y sembrar en el tubo con caldo lactosado
2. Emplear otras dos muestras de agua diferente origen para los dos restantes tubos (efectuar la misma técnica).
3. Tomar nuevamente las asas de las muestras y sembrar por estría cruzada en la caja de EMB.
4. Etiquetar de acuerdo al tipo de muestra.
5. Incubar a 37 °c, 24-48 hrs.

### RESULTADOS:

### 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>46 / 160</b>

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?

#### **BIBLIOGRAFÍA.**

- Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª edición. Editorial Panamericana. 2007.
- Walker t.s. Microbiología. Mcgraw-Hill Interamericana. 2ª edición. 2008.
- Brooks G. Carrol K. Microbiología Médica Jawetz, Melnick, Adelberg. 27ª ed. McGrawHill. 2016.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>47 / 160</b>

# Microcultivo de hongos.

## OBJETIVOS:

- Conocimiento de la técnica para la obtención de hongos en el laboratorio (microcultivo)
- Conocimiento de las características generales de los hongos (crecimiento, estructuras, importancia, etc.)
- Observación de la morfología colonial

## INTRODUCCIÓN:

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 toxina. 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 REPTADAS 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 “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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>48 / 160</b>

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; los hongos inferiores integran la clase llamada:

- **PHYCOMYCETES:** 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.

#### **MATERIAL:**

- Equipo para microcultivo estéril.
- Glicerol al 100%
- Caja de petri PDA.
- Mango y hoja de bisturí.
- Marcador y regla.
- Mechero.
- Microscopio.
- Pinzas de disección sin dientes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>49 / 160</b>

- Cepas:
  - Aspergillus sp.
  - Pencillum sp.
- Preparaciones fijas de diferentes clases de hongos.

### SERVICIOS:

- Luz
- Gas
- Agua

### DESARROLLO:

1. En la caja que contiene el medio de PDA, efectuar en su base una cuadrícula de 1 cm por lado con el marcador.
2. Con el bisturí previamente flameado, cortar el agar siguiendo las líneas del plumón marcado en el vidrio.
3. Con el mismo bisturí, colocar un cuadrito de agar de PDA en el centro de un portaobjetos dentro de la caja, previamente colocarlo en el asa doblada.
4. Mediante el asa doblada en ángulo recto, coloque un pequeño fragmento de la colonia del hongo proporcionada e inocular a un lado del cuadro de agar.
5. Efectuar el paso anterior en los 3 lados restante.
6. Con las pinzas flameadas, coloque el cubreobjetos sobre el agar.
7. Con el glicerol al 10% (5-10 ml) en la caja de petri, procurando no mojar el microcultivo.
8. Cultivar a temperatura ambiente, previamente etiquetado, por 5 días.
9. Observar su crecimiento cada 24 horas.
10. Observar al microscopio las preparaciones fijas de hongos.

### RESULTADOS:

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>50 / 160</b>

## CUESTIONARIO

1. ¿Cómo define usted a un hongo?
2. ¿Cómo se clasifican los hongos?
3. Mencione hongos clasificados como Fungi Imperfecti.
4. ¿Qué es un microcultivo?
5. ¿Qué importancia tienen los microcultivos?
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?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>51 / 160</b>

8. ¿Cómo es la reproducción de hongos?

9. Defina:

-Hifa

-Micelio

-Espora

10. Mencione 5 características del hongo "Aspergillus".

11. Mencione 5 características del hongo "Pecillum".

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª edición. Editorial Panamericana. 2007.
- Walker T.S. Microbiología. Mcgraw-hill Interamericana. 2ª edición. 2006.
- Murray Patrick. Microbiología Médica. 7ª ed. Elsevier Saunders. 2014.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	52 / 160

# 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.

## INTRODUCCIÓN:

Para que los microorganismos presenten un desarrollo normal, así como su reproducción, existen factores como temperatura, PH, presión osmótica, concentración de sustancias nutritivas, etc. Que regulan estos mecanismos.

### 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).

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>53 / 160</b>

Clases de bacterias según las relaciones de temperatura.

<b>Clase</b>	<b>Mínima</b>	<b>Optima</b>	<b>Máxima</b>
Psicrófila	0 °c	10 °c - 15 °c	30 °c
Mesófila	15 °c - 25 °c	25 °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, la temperatura normal del cuerpo humano.

Las incubadoras de laboratorio en que se cultivan gérmenes patógenos procedentes del cuerpo humano deben regularse, para mantener constante la temperatura entre 35 °c y 37 °c. la bacteria parásita en el cuerpo de las aves se desarrolla 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 gérmenes 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 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 citocromas.

Por otro lado, para un grupo importantes de bacterias, el oxígeno libre en el aire es realmente tóxico. No pueden utilizar el oxígeno atmosférico ni sobrevivir en contacto con



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>54 / 160</b>

él y son llamadas **anaerobias**, deben obtener el oxígeno mediante la descomposición y reordenación de compuestos que contienen oxígeno en el medio.

Los **anaerobios estrictos** sólo crecerán donde no hay aire en lo absoluto, a no ser que se hallen presentes sustancias fuertemente reductoras, como el glicolato, o bien, que se encuentren juntamente con 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 oxígeno.

Es conveniente hacer notar que muchas bacterias patógenas, aunque crecen bien en condiciones aerobias ordinarias, se desarrollan mucho mejor, en su primera o segunda generación, en medios de cultivo artificiales o al menos parcialmente anaerobios, en otras palabras, la mayoría de los gérmenes 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 % aprox.

#### **MATERIAL:**

- Mechero
- 2 pipetas de 1ml, estériles.
- 8 tubos de caldo nutritivo
- 1 tubo de agar tioglicolato
- 1 tubo con gelatina nutritiva
- Gradilla

#### **Cepas**

- E. coli
- B. subtilis
- Pseudomonas spp.

#### **SERVICIOS:**

- Agua corriente



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>55 / 160</b>

- Electricidad
- Gas natural

## DESARROLLO

1. Con una pipeta estéril inocular 4 tubos de caldo nutritivo con 1 ml. De suspensión de E.coli.
2. Con una segunda pipeta estéril inocular los otros 4 tubos de caldo nutritivo con 1 ml. De B. subtilis.
3. Etiquetar cada uno de los tubos.
4. Inocular un tubo de caldo nutritivo con B.subtilis y otro con E.coli a las siguientes temperaturas.
  - 4°c
  - 37 °c
  - 55 °c
  - Temperatura ambiente.
5. Después de 24-48 hrs, efectuar la lectura de los resultados. Observar turbidez e indicar a qué temperatura se produjo el máximo desarrollo, así como lo que sucedió con los demás tubos.
6. los tubos con tioglicolato y gelatina nutritiva, sembrar por picadura con las cepas de E.coli y Pseudomonas.
  - Flamear el asa antes y después de la inoculación
  - Incubar a 37 °c por 24-48 hrs
  - Lectura de resultados.
  - Observación en cuanto a la localización de crecimiento en los tubos de tioglicolato y gelatina nutritiva.

## RESULTADOS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>56 / 160</b>

## CUESTIONARIO

1. Mencione 2 ejemplos de microorganismos patógenos que sean aerobios, anaerobios y facultativos.
2. Esquematiza en forma de tabla los rangos de temperatura para las bacterias: mesófilas, termófilas y psicrófilas.
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. ¿A qué temperatura hubo mejor desarrollo y por qué



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>57 / 160</b>

## BIBLIOGRAFÍA

- Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª edición. Editorial Panamericana. 2007.
- Walker TS. Microbiología. Mcgraw-hill Interamericana. 2ª edición. 2006.
- Murray Patrick. Microbiología Médica. 7ª ed. Elsevier Saunders. 2014.

CONCESION



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	58 / 160

# Obtención y aislamiento de cultivos puros.

## OBJETIVOS:

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

## INTRODUCCIÓN:

Una técnica especial, que requiere gran cuidado y atención a numerosos e importantes detalles, se utiliza en cada paso de la preparación y examen de cultivos y en todo lo referente al manejo de 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 de lo que lo rodea. 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 cuanto se vaya a utilizar en el laboratorio.

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

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>59 / 160</b>

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", 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:**

- 3 tubos con solución salina (9.9 ml)
- 2 placas de Petri estériles.
- Matríz con agar nutritivo.
- 2 pipetas estériles.
- 1 placa de petri con agar S-110.
- 1 placa de petri con agar nutritivo
- Tubos con cultivo mixto:
  - \*Staphylococcus Aureus.
  - \*Pseudomonas sp.
- Mechero
- Asa bacteriológica.

#### **SERVICIOS:**

- Gas
- Agua
- Luz

#### **DESARROLLO:**

##### AISLAMIENTO POR DILUCIÓN O VACIADO EN PLACA

1. Se fundirá el agar nutritivo a baño maría.
2. En condiciones estériles o asépticas, se toma una asada de cultivo mixto y se suspende en un tubo con solución salina.
3. Se realizarán a partir de este tubo diluciones en serie.
4. Se verterá el agar fundido sobre las dos placas estériles.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>60 / 160</b>

5. También cerca del mechero, tomar un milímetro de las 2 últimas diluciones con las pipetas utilizadas anteriormente, cuidando de flamearlas previamente y se vaciará en las placas de agar una vez.
6. Agitar suavemente, con movimientos circulares.
7. Dejar solidificar.
8. incubar a 37°C por 24-48 hrs.

#### AISLAMIENTO EN CAJAS DE PETRI POR ESTRÍAS.

1. Esterilizar el asa y dejarla enfriar.
2. Tomar una asada del cultivo mixto y sembrar en la placa de A.N. por estría cruzada.
3. Seguir la técnica señalada en prácticas anteriores.
4. Incubar a 37° por 24-48 hrs.
5. Comparar los resultados obtenidos con las placas del método por dilución.

#### AISLAMIENTO CON MEDIO SELECTIVO.

1. Flamear el asa y enfriar.
2. Tomar una asada del cultivo mixto.
3. Sembrar por estría cruzada sobre la placa de agar S-110.
4. Incubar a 37°C por 24-48 hrs.
5. Identifique por morfología colonial la bacteria de que se trata.

#### **CUESTIONARIO**

1. ¿Qué factores deben cuidarse en el cultivo de un microorganismo?
2. ¿Qué es un cultivo puro?
3. ¿Qué tipos de nutrientes debe tener un medio de cultivo?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>61 / 160</b>

4. ¿Cuál sería la importancia de obtener cultivos puros?

5. ¿Cómo podemos lograr cultivos puros?

#### **BIBLIOGRAFÍA.**

- Walker TS. Microbiología. Mcgraw-hill Interamericana. 2ª edición. 2006.
- Brooks G. Carrol K. Microbiología Médica Jawetz, Melnick, Adelberg. 27ª ed. McGrawHill. 2016.
- Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª edición. Médica Panamericana. 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	62 / 160

# Mecanismo de patogenicidad y virulencia.

## OBJETIVOS:

- Son muchos los factores que determinan en cada caso si un microorganismo puede o no provocar infección, estudiaremos en esta práctica algunos de los factores que controlan la infección.

## INTRODUCCIÓN:

### VIRULENCIA DE LOS ORGANISMOS

Se debe pensar siempre en el poder patógeno de un microorganismo que está en relación con un determinado huésped (hombre, animal, planta). Para expresar estos diferentes grados de poder patógeno, se usa el 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 microbios patógenos, "V" virulencia y "R" resistencia del huésped.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>63 / 160</b>

Indica 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 simple, la patogenicidad de virulencia de los microbios está relacionada con su capacidad para:

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

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

- Endotoxinas
- Exotoxinas.

Cada una con características particulares en cada grupo.

Asociado a la propiedad invasora se encuentra el poder para formar varios productos dentro de los cuales tenemos:

- ★ Hemolisinas.
- ★ Leucocidinas.
- ★ Factores Coagulasa.
- ★ Estreptoquinasa.
- ★ Hialuronidasa.

#### **MATERIAL:**

- 3 cajas de agar sangre.
- Hisopo estéril.
- Solución salina.
- Jeringa estéril.
- Ligadura.
- Torundas.
- Asa bacteriológica.
- Mechero.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>64 / 160</b>

- Cepas:
  - \*S. Aureus.
  - \*S. Pyogenes.

## DESARROLLO

1. En dos cajas de agar sangre, sembrar por estría cruzada cada cepa respectivamente.
2. Etiquetar e incubar a 37°C por 24 hrs.
3. Observar el tipo de hemólisis y morfología colonial.
4. En la 3era caja de agar sangre efectuar un exudado faríngeo (emplear el hisopo)
5. Etiquetar e incubar 2 hrs a 37°C.
6. Observar el tipo de hemólisis y comparar resultados.
7. Sangrar a un compañero 5 ml
8. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3min.)
9. separar el plasma en un tubo
10. Diluir 1:5 en solución salina, tomar muestra de S. Aureus y suspenderla en el tubo que contiene plasma, incubar a 37°C por 90min.
11. Observar resultados.

## 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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>65 / 160</b>

4. Mencione cuatro características de las exotoxinas
5. Numerar y describir brevemente 3 productos agresivos 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.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª edición. Médica Panamericana. 2007.
- Walker TS. Microbiología. Mcgraw-hill Interamericana. 2ª edición. 2006.
- Brooks G. Carrol K. Microbiología Médica Jawetz, Melnick, Adelberg. 27ª ed. McGrawHill. 2016.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	66 / 160

# Fisiología o metabolismo bacteriano.

## OBJETIVOS:

- Definir 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.

## INTRODUCCIÓN:

El metabolismo es el conjunto de transformaciones químicas que los organismos deben realizar para mantenerse y reproducirse.

Los procesos metabólicos se dividen en:

### ANABOLISMO Y CATABOLISMO.

Anabolismo; proceso mediante el cual los organismos sintetizan material celular.

Catabolismo: a través del cual las células descomponen los materiales nutritivos.

### COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS.

La materia viva de las bacterias es esencialmente la misma que el protoplasma de los otros organismos vivos. Está formada por compuestos de carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre y fósforo, junto con pequeñas cantidades de otros elementos.

Un promedio elevado, como del 80 al 90% puede ser de agua, se encuentran proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, así como también aquellas sustancias de máxima importancia llamadas enzimas.

### PROTEÍNAS.

Estos compuestos orgánicos complejos que contienen nitrógeno están en las bacterias como simples proteínas (albúmina o globulina), como proteínas parcialmente degradadas (polipéptidos, peptonas), como nucleoproteínas y como trans proteínas conjugadas en combinaciones con carbohidratos o lípidos. Además, todas las enzimas son proteínas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>67 / 160</b>

Las proteínas se componen de aminoácidos, se han aislado 21 aminoácidos distintos. Tienen estructura similar que contienen una parte ácida, conocida como grupo carboxilo, una parte básica que se conoce como grupo amino y una parte orgánica llamada grupo radical.

### CARBOHIDRATOS.

En las bacterias encontramos al almidón y glucógeno, así como azúcares más simples. Los polisacáridos y los compuestos formados por combinación de carbohidratos y aminoácidos forman parte de la estructura básica de las paredes celulares bacterianas.

Para 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 carbohidratos más simples, como la glucosa o fructosa, son las fuentes principales de energía para el metabolismo bacteriano.

### LÍPIDOS.

Los materiales grasos se encuentran principalmente en forma de grasa, cera y fosfolípidos. En muchos microorganismos, es 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.

### ÁCIDOS NUCLÉICOS.

Estos compuestos complejos se presentan en las bacterias como dos tipos. Son componentes esenciales de las células vivas. Un tipo, el ácido desoxirribonucleico (DNA), transporta la información genética o hereditaria que se halla en el núcleo.

El otro el ácido ribonucleico (RNA), se encuentra muy concentrado en el citoplasma. El RNA 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>68 / 160</b>

## ENZIMAS:

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 catalíticas 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 rapidez 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.

## **MATERIAL:**

- Dos tubos caldo urea
- Dos tubos citrato de Simmons
- Dos tubos de manitol rojo de metilo.
- Dos tubos de glucosa roja de metilo.
- Dos tubos SIM.
- Gradilla.
- Asa bacteriológica.
- Mechero.
- Cepas; E. Coli y Proteus Vulgari

## **SERVICIOS:**

- Agua
- Electricidad
- Gas

## **DESARROLLO:**

1. Se sembrarán los tubos con los diferentes medios de cultivo, con cada una de las cepas facilitadas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>69 / 160</b>

2. Ejemplo, de los dos tubos del medio de SIM, uno se sembrará con E. Coli y el segundo tubo con P. Vulgaris.
3. Inocular de dos en dos, en igual forma los demás tubos.
4. Emplear la técnica de sembrado correspondiente para cada uno de los tipos de medios de cultivo, seguir indicaciones del profesor en caso de duda.
5. Tener cuidado de flamear el asa antes y después de cada procedimiento.
6. Se incubaron los tubos, previamente etiquetados a 37°C 24/48 horas.
7. Observar los cambios de cada uno de los tubos.
8. Interpretar los resultados, y anotar los resultados en un cuadro, con las características de cada una de las bacterias que se emplearon en la práctica.

## RESULTADOS:

## CUESTIONARIO

1. ¿Qué entendemos por metabolismo bacteriano?
2. En la prueba de fermentación indique:
  - \*¿Qué indicador utilizó?
  - \*¿Que azúcar utilizó?
  - \*¿Cómo efectuó su lectura?
3. Defina metabolismo energético y cuál es su función



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>70 / 160</b>

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.

\*Parásitas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ª edición. Médica Panamericana. 2007.
- Walker TS. Microbiología. Mcgraw-hill Interamericana. 2ª edición. 2006.
- Brooks G. Carrol K. Microbiología Médica Jawetz, Melnick, Adelberg. 27ª ed. McGrawHill. 2016.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML03	10/ 11 /2017	1	71 / 160

# Acción de agentes físicos y químicos sobre el crecimiento bacteriano.

## OBJETIVOS:

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

## INTRODUCCIÓN:

A mediados de la década de 1800 Ignaz Semmeweis 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.

## Términos 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).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>72 / 160</b>

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.

### **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.

- 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>73 / 160</b>

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 sobre las 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.

**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%.

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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>74 / 160</b>

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 ( $I_2$ ) 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  $I_2$  activo.

e) Peroxígenos:

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) 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  $H_2O_2$  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 próximas a  $100^\circ C$ ). 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>75 / 160</b>

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.

#### ***Difusión en disco:***

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.

#### **MATERIAL:**



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>76 / 160</b>

- 4 cajas Petri estériles
- Discos de papel filtro
- 2 cajas Petri con Agar Nutritivo
- Cinta adhesiva
- Cepas: *Bacillus Subtilis* y *Staphylococcus Aureus*
- Regla
- Fenol al 5%
- Lugol al 5%
- Alcohol al 70%
- Detergente
  
- Mechero
- Pinzas sin dientes
- Asa y porta asa

#### SERVICIOS:

- Gas
- Agua

#### DESARROLLO:

1. Colocar una cantidad suficiente de cada solución en cada caja Petri.
2. Mientras, sembrar *Bacillus Subtilis* en una caja Petri y *Staphylococcus Aureus* en otra caja Petri ambas con agar nutritivo.
3. Con ayuda de las pinzas, sumerge un disco en una de las soluciones. Recuerda flamear las pinzas antes de manipular el disco.
4. Coloca el disco en una de las siembras en caja Petri. Procura que tengan una separación el uno del otro para que se puedan leer los resultados y no haya confusiones. Presiona el disco para que quede firme.
5. Repite los pasos 3 y 4, con cada solución y con cada caja Petri sembrada.
6. Incubar a 37° C por 24 horas.
7. Para realizar la lectura utilizaremos una regla. Mediremos el campo que creó nuestra sustancia (en milímetros).

#### RESULTADOS

Dibuja cómo quedaron las siembras pasadas las 24 horas. No olvides mencionar que tan efectiva fue cada sustancia.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>77 / 160</b>

## CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la acción de la luz ultravioleta sobre el material genético de las bacterias?
2. ¿Cuáles son los riesgos del 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:
  - a) Yodo:
  - b) Cloro:
  - c) Alcohol:
  - d) Derivados fenólicos:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>78 / 160</b>

7. ¿Cómo es el mecanismo de acción de los detergentes?

## BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks G. Carrol K. Microbiología médica. 27<sup>a</sup> ed. Jawetz, Melnick, Adelberg. México: Mc Graw Hill education; 2016.
2. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Microbiología médica. 7<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
3. González J. Laboratorio de microbiología: Instrumentación y principios básicos. La Habana: Ciencias Médicas, 2004.

# Antibiograma.

## OBJETIVOS:

- Estudiar la acción de los antibióticos in vitro para conocer la sensibilidad bacteriana.
- Conocer pruebas para una mejor selección de antibióticos.
- Técnica e interpretación de un antibiograma.

## INTRODUCCIÓN:

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.

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
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>79 / 160</b>

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 continuada, 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 se deberían sustituirse por un antibiótico diferente o una combinación de antibióticos.

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

La selección racional de las drogas anti microbiana haz 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 en indicadas en las siguientes circunstancias:

1. Cuando el microorganismo aislado es frecuentemente resistente a las drogas antimicrobianas. (Por ejemplo bacterias entéricas Gram negativas).
2. Cuando un proceso infeccioso es grave y parece ser mortal a menos que sea tratado específicamente. (Por ejemplo, meningitis, 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, osteomielitis aguda)

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

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

En esta práctica emplearemos el segundo. Hoy en día el antibiogramas es una prueba que podemos decir de "rutina", en los lugares de atención médica, por lo que es



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>80 / 160</b>

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.

### **MATERIAL:**

- 2 cajas de agar nutritivo
  - Equipo de unidiscos. (Para Gram positivo y Gram negativo)
  - 6 discos de papel filtro conteniendo diferentes tipos de antibióticos.
  - Pinzas de disección
  - Mechero
  - Asa bacteriológica
- Cepas:
- E.coli
  - Staphylococcus aureus

### **SERVICIOS:**

- Luz
- Gas
- Agua corriente

### **DESARROLLO:**

1. En cada una de las cajas de agar nutritivo sembrar una con E. Coli, y la otra con S. aureus, abundantemente, por la técnica de estrías cerrada (barrido). Próxima a la flama del mechero.
2. Colocar con las pinzas de los discos conteniendo los diferentes tipos de antibióticos, previamente flameadas, sobre las cajas sembradas.
3. Procurar que los discos queden bien separados unos de otros y de las paredes de las cajas de cultivo. Cualquier duda consultar con su profesor de mesa.
4. Hacer lo mismo en la otra caja.
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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>81 / 160</b>

Y por lo tanto saber a qué es más sensible la bacteria empleada en la práctica, así como los antibióticos de segunda lección.

## CUESTIONARIO

1. Defina antibiótico
2. Defina antibiograma
3. Enuncie 5 antibióticos para gérmenes Gram positivos
4. Enuncie cinco antibióticos para gérmenes Gram negativos
5. Enuncie cuáles son las indicaciones para efectuar un antibiograma.
6. En cada una de sus cajas que antibiótico es el de primera elección para E. Coli y S. Aureus.
7. ¿Cuáles son los peligros del uso indiscriminado de los antibióticos?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>82 / 160</b>

8. ¿Está indicado el uso de combinaciones de antibióticos?, fundamente su respuesta.

9. Explicar las limitaciones actuales de la terapia antibiótica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Brooks G. Carroll K. Microbiología médica. 27<sup>a</sup> ed. Jawetz, Melnick, Adelberg México: Mc Graw Hill education; 2016.
2. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Microbiología médica. 7<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2014
3. González J. Laboratorio de microbiología: Instrumentación y principios básicos. La Habana: Ciencias Médicas, 2004.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>83 / 160</b>

# Microorganismos patógenos y enfermedad.

## OBJETIVOS:

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

## INTRODUCCIÓN:

Al principio de la década de 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 que permite observar las células de *Mycobacterium tuberculosis* como finos bacilos de color azul sobre un fondo marrón de células humanas.

También descubrió que *M. Tuberculosis*, una bacteria de crecimiento lento y muy dificultoso en el laboratorio podía cultivarse en suero de sangre coagulada. Basándose en estos hallazgos, Koch abordó la demostración de que *M. 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 causara una enfermedad en particular.

Koch comenzó su búsqueda examinando pacientes tuberculosos para detectar la presencia de células de *M. Tuberculosis*.

Encontró que la bacteria estaba presente en todos los pacientes (bacilos azules sobre el fondo marrón del tejido).

Posteriormente, Koch cultivó las bacterias en suero de sangre coagulada y aisló cultivos puros de *M. Tuberculosis*, que inoculó en cobayas que morían posteriormente de Tuberculosis. Por tanto, sin lugar a dudas, *M. Tuberculosis* causaba la tuberculosis.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>84 / 160</b>

El trabajo de Koch con *M. 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:

1. El microorganismo causal debe encontrarse en todos los individuos que presentan la enfermedad.
2. Dicho microorganismo debe ser aislado en cultivo puro.
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
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 en las postrimerías de su carrera cuando trataba de determinar el agente causal del cólera.

Así, 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.

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.

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 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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>85 / 160</b>

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.

#### **MATERIALES:**

- Ratón
- Jeringas estériles
- Mechero
- Colorantes de Gram
- Asa y porta-asa bacteriológica
- Solución salina estéril
- Cepas:
  - E. coli enteropatógena o Salmonella typhi
- EMB
- Gelosa simple
- Verde brillante
- Citrato de Simons
- Caldo urea
- Manitol rojo de fenol
- TSI o Kligler
- LIA
- SIM

#### **SERVICIOS**

- Gas
- Agua
- Electricidad

#### **DESARROLLO:**

Primera parte:

1. Limpiar el área abdominal de un ratón e inocular por vía intraperitoneal 1 ml de una suspensión del microorganismo proporcionado.
2. Realizar la observación microscópica de la capa proporcionada teñida por la técnica de Gram.
3. Aislar la cepa en medios EMB, gelosa simple y verde brillante y sembrar en las pruebas bioquímicas. Incubar 24-48 horas/37°C. Interpretar resultados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>86 / 160</b>

Se puede tener un ratón de control inoculando por vía intraperitoneal 1 ml de agua destilada estéril.

Se debe realizar diariamente observaciones anotando las anomalías que se presentan en el transcurso de la semana posterior a la inoculación.

Segunda parte:

1. 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 y hacer un frotis. Teñirlo por la técnica de Gram. O inocular la solución salina al ratón y posteriormente aspirar 2 ml, realizar el frotis.
2. Hacer un aislamiento en los medios de cultivo y pruebas bioquímicas e incubar a 37° por 24-48 horas.
3. Observar las características coloniales y microscópicas de los microorganismos recuperados del animal inoculado.
4. 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.
5. Realizar la observación de la morfología microscópica por medio de la tinción de Gram.

## RESULTADOS

- El Cobayo inoculado con E. Coli enferma, presentándose hipoactivo.
- Tras la disección del cobayo se encuentran los órganos blanco dañados (pulmón, riñón, corazón), presentando necrosis.
- Al cultivar líquido intraperitoneal del cobayo se encontró cepas de E. Coli, cumpliendo así los postulados de Koch.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS

- Citrato de Simmons: negativo, E. coli es incapaz de crecer en el cultivo por lo que mantiene su color verde.
- Caldo urea: negativo, E. coli no utiliza la urea como fuente de carbono por lo que se debería de observar un color rosa pálido.
- Manitol rojo de fenol: positivo, el caldo toma una coloración amarillenta.
- SIM: movilidad: positivo; H<sub>2</sub>S: negativo, no hubo ennegrecimiento de la zona de crecimiento; indol:negativo, no se presenta anillo de color rosado en la superficie.
- LIA: positivo en la descarboxilación de la lisina por lo que todo el medio es púrpura y es negativo en la producción de ácido sulfhídrico.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>87 / 160</b>

- TSI: debido a que E. Coli fermenta glucosa, lactosa y sacarosa el tubo queda de color amarillo por lo que significa que es Ácido/Ácido; es producción de gas es positivo y en producción de ácido sulfhídrico es negativo.

### MEDIOS DE CULTIVO

- EMB: debido a que E. Coli fermenta rápidamente lactosa produce colonias de color verde metálico.
- Verde brillante: este medio es selectivo para especies de Salmonella (excepto S. Typhi) por lo que las colonias de E. Coli no crecerán en el cultivo.

### **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:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>88 / 160</b>

## BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks G. Carroll K. Microbiología Médica. 27ª ed. México: Mc Graw Hill education; 2016.
2. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Microbiología médica. 7ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
3. González J. Laboratorio de microbiología: Instrumentación y principios básicos. La Habana: Ciencias Médicas, 2004.

# Reacciones de precipitación en gel (OUCHTERLONY)

## OBJETIVO:

- Efectuar una reacción de precipitación por medio de pruebas inmunológicas de laboratorio.

## INTRODUCCIÓN:

Uno de los principales retos de la ciencia médica moderna es la traducción de los adelantos básicos de la inmunquímica y la inmunobiología en procedimiento 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.

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>89 / 160</b>

ferrita etc.) estos 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 interacciones antígeno-anticuerpo a veces se expresan como manifestaciones terciarias, tales reacciones por definición son expresiones biológicas de la interacción antígeno-anticuerpo y pueden ser útiles para el paciente, pero en otras ocasiones son causa de enfermedad por lesión inmunológica.

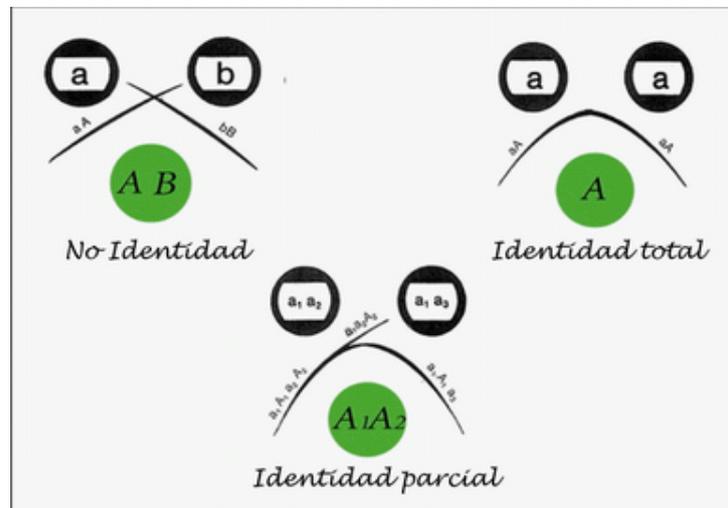
Pueden obtenerse aún más datos sobre las reacciones complejas entre antígeno y anticuerpo mediante un método simple, desarrollado principalmente por Ouchterlony en Suecia, que consiste en poner soluciones de antígeno y anticuerpo en pocillos separados dispuestos en una placa de agar. Con este método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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>90 / 160</b>

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.



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

En "A" se colocó el mismo antígeno en los pocillos 1 y 2, y el antisuero se hallaba en el pocillo 3.

En "B" se colocaron distintos antígenos en los pocillos 4 y 5 y el antisuero para ambos se hallaba en el pocillo 6.

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

Si se pone una solución de antígeno puro 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.

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, y lo llamamos, y lo llamamos reacción de no identidad.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>91 / 160</b>

No obstante, si el antígeno situado en uno de los pocillos y el antisuero que se halla en el pocillo central constituye una 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.

### **MATERIAL:**

- Portaobjetos con agar (con pocillos)
- Cajas de Petri
- Papel filtro
- Solución de antígeno
- Soluciones de anticuerpo Desarrollo
- Se llenarán los pozos con el antígeno en el centro y los pozos de la base con los sueros, y que queden perfectamente llenos en la caja Petri.
- Incubar 24-48 horas a temperatura ambiente.
- Leer resultados (buscar bandas de precipitación)

### **SERVICIOS:**

- Agua
- Luz
- Gas

### **CUESTIONARIO**

1. ¿Qué importancia tiene los estudios de laboratorio?
2. ¿Defina antígeno y anticuerpo?
3. ¿Qué factores pueden alterar los resultados?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>92 / 160</b>

4. ¿Qué importancia tiene para el médico las reacciones antígeno anticuerpo?

5. ¿Enuncie y explique cada uno de los tipos de bandas de identidad?

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Murphy K. Travers P. Inmunología de Janeway. McgrawHill. 2009.
- Brooks G. Carroll K. Microbiología Médica. 27ª ed. México: Mc Graw Hill; 2016.
- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt. Inmunología fundamentos. 12ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>93 / 160</b>

# Reacción de precipitación en capilar.

## OBJETIVO:

- Efectuar una reacción de precipitación por medio de pruebas inmunológicas.

## INTRODUCCIÓN:

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

### PRUEBA CUANTITATIVA DE PRECIPITINA EN MEDIO LÍQUIDO

Las reacciones de precipitación en medio líquido pueden analizarse cuantitativamente, y determina la cantidad Ag-Ac existente en el precipitado.

En ésta práctica, el emplear una serie de capilares, la cantidad del precipitado varía dependiendo de la proporción de los reactivos, y si colocamos en éstos el mismo volumen de antisuero como cantidades crecientes, el precipitado alcanza un máximo, y poco a poco hay una disminución de éste.

En éstas formas 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.
- Zona de exceso de antígeno: Hay Ag libre en el líquido que sobrenada.

## MATERIAL

- Gradilla
- Gradilla de plastilina
- Solución salina o buffer.
- Tubos de ensaye
- Tubos capilares
- Pipeta de 1 ml
- Pipeta de 5 ml



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>94 / 160</b>

- Tubo con antisuero humano total
- Tubos con suero humano

## DESARROLLO:

1. En los tubos de ensaye se efectuarán disoluciones seriadas y proporcionales del Ag con la solución salina, emplea 9 tubos.
2. Agregar en cada tubo 0.05ml de solución salina, al primer tubo, agregar 0.05 ml del suero extraído, de este tubo, toma r 0.05 ml y pasarlo al tubo, y así terminar con todos los tubos.
3. Previamente los capilares se dividirán con un marcado en 4 partes iguales.
4. Se introducirá un capilar dentro del tubo del Ag (1er tubo) y por capilaridad se dejará hasta la 1era cuarta parte.
5. Se gira a 180° para dejar que descienda el líquido.
6. Por el extremo no utilizado, se llenará la otra cuarta parte, teniendo cuidado de que no existan burbujas que impidan la mezcla entre el Ag y el Ac.
7. 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.
8. Se tendrá un volumen final a la mitad del tubo capilar y tapando un extremo con el dedo se colocará en la barra de plastilina por el extremo contrario, que previamente fue marcada con el número correspondiente.
9. Se repetirá el mismo procedimiento de llenado de los capilares con cada tubo y sus diferentes disoluciones.
10. Se tendrá un tubo capilar testigo con el Ag, y otro con el Ac.
11. Refrigerar por 24-48 hrs.
12. Efectuar lecturas y leer la cantidad de precipitado en milímetros.
13. Se efectuará una gráfica donde se muestre la zona de exceso de Ag, zona de equivalencia y zona de exceso de Ac.
14. Colocando en el eje de las abscisas la disolución del tubo, y en las ordenadas los milímetros de precipitado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>95 / 160</b>

## CUESTIONARIO

1. ¿Qué ventajas presenta este método, en relación con el gel de agar?
2. ¿Qué importancia médica tiene este método?
3. ¿Cuándo estaría indicado un estudio de esta índole?
4. ¿Con qué objeto se efectúan diluciones?
5. Explique la inmunidad humoral y celular.
6. Explique la curva (gráfica) de la relación Ag-Ac.

## BIBLIOGRAFÍA

- Murphy K. Travers P. Inmunología de Janeway. McgrawHill. 2009.
- Brooks G. Carroll K. Microbiología Médica. 27ª ed. México: Mc Graw Hill; 2016.
- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt. Inmunología fundamentos. 12ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Carroll K, Morse S, Mietzner T, Miller S, Hobden J, Mitchell T, et al. Microbiología médica de Jawetz. 27ª ed. México: Mc Graw Hill education; 2016, p. 63-4



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>96 / 160</b>

- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Microbiología médica. 7ª ed. Barcelona: Elsevier; 2013, p. 11-5
- González J. Laboratorio de microbiología: Instrumentación y principios básicos. La Habana: Ciencias Médicas, 2004, p. 68-86.

CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>97 / 160</b>

# Reacciones de aglutinación.

## OBJETIVOS:

- Que el alumno compruebe cómo se lleva a cabo una reacción de aglutinación por medio de una prueba inmunológica (reacción Ag-Ac)

## INTRODUCCIÓN:

Hasta cierto punto, la precipitación y la aglutinación pueden considerarse manifestaciones de la misma interacción Ag-Ac, la única diferencia es el estado soluble, 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 Ac's 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.

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:

- Jeringa desechable.
- Tubos de ensaye 13/100.
- Baño maría.
- Portaobjetos excavados.
- Ag VDRL.
- Microscopio.
- Pipeta de Pasteur.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>98 / 160</b>

### SERVICIOS:

- Agua
- Luz

### DESARROLLO:

1. Se procederá a extraer 5ml de sangre a un alumno.
2. Se colocará en un tubo de ensaye de 13/100.
3. Se dejará coagular a temperatura, o en su defecto en la estufa, durante 5-10 minutos.
4. Se centrifugará 300 rpm/5 mins.
5. A continuación, separar el suero con la pipeta Pasteur.
6. Se colocará el suero en un tubo limpio y se llevará a baño maría.
7. Se colocará el tubo a baño maría a 60°C durante un minuto con el fin de inactivarlo.
8. Se colocará una gota del suero en un portaobjetos excavado y ahí mismo se le agregará una gota del Ag VDRL.
9. Se hará la mezcla con un aplicador de madera y se "leerá" en el microscopio la presencia de grumitos (aglutinación). Si existen, la prueba será "positiva", de lo contrario será negativa.

### 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 Ag e inmunógeno?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>99 / 160</b>

4. ¿Cuál de las pruebas realizadas es positiva y por qué?
  
5. ¿Qué método seguiría para que la reacción fuera negativa en caso de que fuera positiva?
  
6. ¿Qué significa Ag VDRL?
  
7. ¿Qué enfermedad es la que normalmente nos diagnostica?
  
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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>100 / 160</b>

### BIBLIOGRAFÍA:

- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1<sup>a</sup> ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.

CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>101 / 160</b>

# Gonadotropina Coriónica Humana.

## OBJETIVO:

- Comprobar si el método de presencia de GCH en orina es eficaz en el diagnóstico de embarazo

## INTRODUCCIÓN:

Una prueba de embarazo es toda aquella técnica usada para la búsqueda de los signos hipotéticos que permiten confirmar un embarazo. Consiste en detectar la presencia de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) en el plasma materno o en la orina, y es el procedimiento que aporta quizá el mayor nivel de probabilidad de diagnóstico confiable.

Otras técnicas, como el ultrasonido obstétrico, también confirman el embarazo, pero el término prueba de embarazo suele implicar pruebas bioquímicas, aplicadas a partir de los 4 días de la concepción.

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

Signos presunciales:

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

## PRUEBAS ENDOCRINAS:

La eliminación 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.

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA:

La prueba hCG de embarazo en un solo paso en placa (Orina/Suero) es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección cualitativa de la Gonadotropina Coriónica Humana en orina o suero, para el diagnóstico precoz del



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>102 / 160</b>

embarazo. La prueba 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.

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.

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 INMUNO VALORACIONES ESTÁNDAR GCH EN TUNO**

### **VENTAJAS**

- Procedimiento sencillo.
- Varias veces más sensible que las pruebas rápidas en portaobjetos.
- Menos errores técnicos que las pruebas rápidas en portaobjeto.

### **DESVENTAJAS**

- Relativa insensibilidad
- Se requiere un valor de GCH de 0.5 a 1.0 UI/ml. para una prueba positiva.
- 90% de exactitud sólo después de 40 días de la falta del último período menstrual.
- Proteinuria importante (100mg/dl.) puede causar anillos atípicos.
- Vibración o sacudidas pueden causar puntos finales deformados, no concluyentes.

### **CONCLUSION**

Pruebas de elección en hospitales que no cuentan con equipo de radioinmunovaloraciones para pacientes que se someten a raspado diagnóstico o histerectomía de elección.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>103 / 160</b>

La práctica consiste en efectuar una prueba para el diagnóstico del embarazo en la que se detecta inmunológicamente la gonadotropina coriónica humana (GCH) en orina por inhibición de la aglutinación hemática.

#### 1) Orina negativa

Paso A.- Orina (sin GCH) más suero anti GCH. No hay reacción (el anti GCH permanece activo).

Paso B.- Se añade a la mezcla anterior eritrocitos recubiertos con GCH. Se aglutinan debido al suero anti GCH formando una malla o patrón homogéneo en el fondo del tubo.

#### 2) Orina positiva

Paso A.- Orina (con GCH) más suero anti GCH neutralización (inactivación) del anti GCH por reacción inmunológica.

Paso B.- Se añaden eritrocitos recubiertos con GCH. No se aglutinan. Se sedimentan formando un anillo en el fondo del tubo.

Las pruebas para el diagnóstico de embarazo que se encuentran en el mercado, son varias y presentan sensibilidades para detectar desde 1000 UI de GCH/litro de orina (1 UI.ml).

#### **MATERIAL:**

- Muestra de orina
- Muestra de sangre
- Gotero
- 2 tubos de ensayo
- Reactivos de GCH
- Centrifuga

#### **SERVICIOS:**

- Agua
- Luz

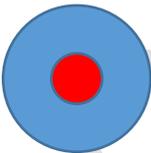
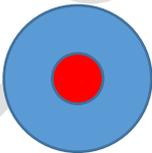
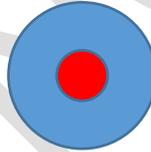
#### **PROCEDIMIENTO:**

1. Recolectar la muestra.
2. Dejar enfriar la muestra.
3. Filtrar o centrifugar a 3000-4000 rpm 5-10 minutos.
4. Emplear dos tubos limpios y secos.
5. Depositar el contenido de un gotero hasta la marca de solución control (0.25) en otro tubo (control).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>104 / 160</b>

6. Agregar 5 gotas de orina (0.25 ml) con gotero a cada uno de los tubos (paciente y control).
7. Colocar en el fondo de cada tubo una gota de eritrocitos previamente suspendidos y mezcle.
8. Cuidar que los glóbulos sedimenten correctamente.No vibraciones, no calor.
9. Observar los resultados.
10. Positivos en una hora
11. Negativos en dos horas

### Lectura e interpretación

	Positivo	Patrón	Negativo
Tubo control			
Tubo paciente			

La orina interfiere en la formación del anillo.

### CUESTIONARIO:

1. ¿Cuáles son los métodos que se pueden emplear?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>105 / 160</b>

2. ¿Cuáles son los métodos más usuales y por qué?
3. ¿En qué se basan dichos métodos?
4. Describa las indicaciones para determinar GCH.
5. ¿Cuándo se encuentran resultados falsos positivos?
6. ¿Cuándo se encuentran resultados positivos falsos?
7. ¿Con qué otros métodos se puede diagnosticar un embarazo?
8. ¿Cómo se clasifican los signos para diagnóstico de embarazo?

#### **BIBLIOGRAFÍA:**

- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1<sup>a</sup> ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.
- Romero C.R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ed. Editorial panamericana. 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>106 / 160</b>

# Fagocitosis:

## INTRODUCCIÓN:

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. Anticuerpo y complemento rara vez bastan para inactivar a los microorganismos y no son por completo capaces de efectuar su destrucción y eliminación.

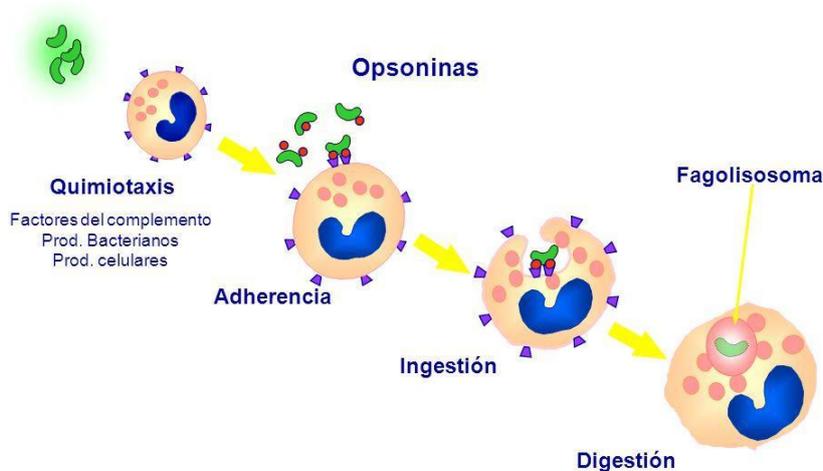
Por otra parte, los fagocitos eliminan fácilmente muchos microorganismos y otras partículas extrañas, pero son incapaces de discriminar entre los objetos extraños y los no extraños sin la ayuda de los anticuerpos.

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.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>107 / 160</b>

## Fagocitosis: Etapas



©. M. Litzschwab, 2006

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  $2.5 \times 10^{12}$  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.

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;



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>108 / 160</b>

- 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 (macrófagos 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.

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.

## QUIMIOTAXIS

Gracias a ella los movimientos sin orientación de 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, Kalicrinas, y en algunas de las sustancias producidas por los linfocitos como linfoquininas y linfotoxina. 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 irritación 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>109 / 160</b>

La activación de los fagocitos por el recubrimiento del antígeno, se llama opsonificación (preparación para la comida y adquiere gran valor en los procesos de defensa del organismo contra la infección por gérmenes bacterianos)

Los anticuerpos que tienen esta propiedad de opsonificación son exclusivamente de tipo IgG, o IgM y especialmente la G1 y G3.

El complemento provee también factores de activación opsónica 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.

## 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.

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  $O_2^-$  – 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
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>110 / 160</b>

- 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.
- Proteinasa básica.
- Hialuronidasa.
- Lisozima.
- Colagenasa.
- Arilsulfatasas A y B.
- Fosfolipasa.
- Lipasa ácida
- Lactoferrina
- Fagocitina y proteínas
- Pirógeno endógeno
- Activador de plasminógeno
- Hemolisina.

#### **MATERIAL:**

- Tubos de ensayo
- Portaobjetos
- Anticoagulante
- Pipeta
- Microorganismo Staphylococcus
- Colorante de Wright
- Agua destilada
- Centrífuga
- Microscopio

#### **SERVICIOS:**

- Agua
- Gas
- Electricidad

#### **DESARROLLO:**

1. Se obtendrán 5 ml de sangre humana por equipo.
2. Se colocarán inmediatamente en un tubo conteniendo anticoagulante y se agitará suavemente varias veces.
3. Se centrifugará a 3000 rpm/minutos.
4. Se separará la capa de células blancas y se colocarán en un tubo de 13x100.
5. Se adicionará 0.05 ml de microorganismo de Staphylococcus, agitar y ponerlos en baño maría a 37°C por una hora.
6. Tomar un portaobjetos muy limpio (limpiado con alcohol).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>111 / 160</b>

7. Colocar una gota en uno de los extremos y hacer una extensión con otro portaobjetos.

8. Dejar secar el frotis al aire y teñir 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 por la evaporación.

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.

9. Dejar actuar la mezcla durante 7 minutos.

10. Lavar 30 seg. Con agua corriente.

11. Dejar secar al aire y observar a inmersión.

12. Efectuar esquemas.

13. Determinar el porcentaje de leucocitos fagocitantes.

## RESULTADOS:

## CUESTIONARIO:

1.- Defina qué es la fagocitosis.

2.- Mencione brevemente cuál es el mecanismo de la inflamación.

3.- ¿De qué origen embrionario pueden ser las células con capacidad fagocitaria?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>112 / 160</b>

4.- ¿Qué es el fenómeno de Diapédesis?

5.- ¿Qué es el fenómeno de Quimiotactismo?

6.- ¿Qué nombres reciben los fagocitos en los siguientes tejidos?

- a) Hígado:
- b) Sangre:
- c) Sistema nervioso:
- d) Tejido conectivo:
- e) Pulmón:

#### **BIBLIOGRAFÍA:**

- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7ª ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>113 / 160</b>

# Demostración de la lisozima en secreciones

## INTRODUCCIÓN:

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 producción 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.

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 1992, Fleming informó la presencia de una sustancia 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 la pus, 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>114 / 160</b>

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

En un estudio de informa que varias estirpes bacterianas de la flora bucal normal se mostraron resistentes a la acción de la Lisozima.

Las bacterias que no fueron destituidas ni tampoco inhibidas por la Lisozima fueron las siguientes; Bacteriodes oralis, Bacteroides melaninogenicus, Difteroides anaerobios, Difteroides facultativos, Bacilos fusiformes, algunas especies de lactobaciluos, peptoestreptococos, Streptococcus salivarius, la espiroqueta Treponema, microdentium Veillonella calescens y Vibrio sputorum.

En algunos estudios experimentales, los resultados han indicado que el estreptococo cariogeno 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.

La Lisozima es una enzima que en la saliva sus fuentes son la glándula parótida, submandibular y sublingual; los surcos gingivales y los leucocitos se a saliva que se has destruido.

#### **MATERIAL**

- Saliva
- Lágrimas
- Solución salina
- Microscopio

#### **SERVICIOS:**

- Electricidad
- Agua
- Gas natural

#### **DESARROLLO:**

1. Colocar sobre un cultivo de Micrococcus Lysodeikticus, discos de papel filtro impregnado con:

a) Solución salina



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>115 / 160</b>

- b) Saliva
- c) Lágrimas.

2. Incubar a 37oC durante 1 hora.
3. Observar la presencia de lisis cuando está presente la Lisozima.

### RESULTADOS:

### CUESTIONARIO:

1. ¿A qué nivel estructural actúa la Lisozima en las bacterias?
2. ¿Cuál es la función de la Lisozima?
3. Diga todos los sitios del cuerpo humano en donde se puede localizar la Lisozima.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>116 / 160</b>

### BIBLIOGRAFÍA:

- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1<sup>a</sup> ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.

CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>117 / 160</b>

# Antiestreptolisinas.

## INTRODUCCIÓN:

La cuantificación de *antiestreptolisinas* 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.

## MATERIAL:

- Reactivos de estreptolisinas "O" e hidrosulfito de sodio.
- 9 tubos de ensayo 13x100.
- Gradillas.
- Jeringas.
- Torundas con alcohol.
- Ligadura.
- Solución salina al 85%.
- solución de glóbulos rojos al 5%.
- Aplicadores de madera.
- Pipetas Pasteur.
- Centrifuga
- Balanza granataria de dos platillos.
- Baño maria o estufa a 37°C.

## SERVICIOS:

- ✓ Agua
- ✓ Gas
- ✓ Electricidad

## DESARROLLO:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>118 / 160</b>

1. A un alumno de grupo sanguíneo "O" se le extraen 10 ml, por punción venosa, colocando 5 ml, en un tubo con anticoagulante, este se dejará coagular (acelerando este fenómeno introduciéndolo en la estufa a 37°C durante 5 min, una vez pasado este tiempo con un aplicador de madera se romperá la red de fibrina y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se obtendrán dos fases, y con una pipeta Pasteur se separa la fase líquida (que será nuestro suero problema), se colocará en un tubo limpio, para después determinar el título de antiestreptolisina.
2. Suspensión de glóbulos rojos: el tubo con anticoagulante se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min, y se separa el plasma con una pipeta Pasteur desenchándola. Se lavará el paquete celular 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%.
3. Dilución del suero problema: se harán las siguientes diluciones, utilizando solución salina diluyente:

1:10 → 0.5 de suero + 4.5 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>119 / 160</b>

La prueba se monta de acuerdo al siguiente protocolo:

	<b>1:10</b>		<b>1:100</b>			<b>1:500</b>	
<b>Tubos</b>	1	2	3	4	5	6	7
<b>Vol. De la dilución salina en ml.</b>	0.2	1.0	0.5	0.4	0.3	1	0.8
<b>Vol. De solución salina en ml.</b>	0.8	0	0.5	0.6	0.7	0	0.2

Agitar los tubos:

- Agregar a cada tubo 0.5 ml de estreptolisina.
- Agitar e incubar a 37°C durante 15 min.
- Agregar a cada tubo 0.5 ml. de la suspensión de glóbulos rojos.
- Agitar e incubar a 37°C durante 45 min agitando cada 15 min.
- Centrifugar los tubos durante un minuto a 1500 rpm
- Títulos en unidades Todd 50 100 200 333 500 625 1250.
- **Nota:** Es importante agregar dos tubos mas de control, uno con positivo y uno con negativo, (eliminando la estreptolisina "O", suero, etc).

**RESULTADOS:**



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>120 / 160</b>

### CUESTIONARIO:

1. Mencione características de estreptomicina 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>121 / 160</b>

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.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Murphy K. Travers P. Inmunología de Janeway. McgrawHill. 2009.
- Brooks G. Carroll K. Microbiología Médica. 27<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill; 2016.
- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt. Inmunología fundamentos. 12<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>122 / 160</b>

# Complemento.

## OBJETIVOS:

- Comprender la importancia del complemento
- Efectuar la prueba de fijación de complemento

## INTRODUCCIÓN:

El complemento es un conjunto de 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 cascada del complemento es una serie de reacciones enzimáticas que conducen a la muerte o lisis de una célula o algún acontecimiento importante por lo general lesivo.

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

C1 consiste de las tres proteínas, C1q, C1r, C1s, mantenidas juntas por  $u\text{Ca}^{++}$  como ligando. El efecto del antígeno sobre el anticuerpo (IgG, IgM) es un cambio de 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, o sea, 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 está activa a la proenzima, C1s.

Los sustratos de C1s, son C4, C2. C4 se desdobla a C4a y C4b, Y este último se une con C1. En presencia de iones  $\text{Mg}^{++}$ , C2 se desdobla a C2a y C2b. C2a se une a C14b para formar C14 b2a, una peptidasa conocida como convertasa de C3. Desdobla a C3 en una pequeña reacción,  $c\#a$ , 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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>123 / 160</b>

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 consi(sitios de derrame) a través de las cuales escapan iones K<sup>+</sup>, pequeñas moléculas orgánicas y macromoléculas como ARN y proteínas, y a través de los cuales entran iones Na<sup>+</sup>. El resultado es que la presión osmótica en el interior de las células aumenta, entra agua, y la célula se hincha.

Hay una vía alterna para la activación del complemento que evita C142. 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 C1q y que port 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.

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

- 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 (-), 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**

#### **MATERIAL:**

- Hemolisina, Complemento, Zymosan
- Tubos de Ensaye.
- Solución salina amortiguada de trietanolamina (TBS) frío
- Glóbulos rojos de carnero
- Gradilla
- Pipetas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>124 / 160</b>

- Centrifuga
- Baño maria

### SERVICIOS:

- ✓ Agua
- ✓ Gas
- ✓ Electricidad

### DESARROLLO:

1. Para el desarrollo de la práctica se colocaran las soluciones como lo indica el siguiente cuadro, en cada uno de los 3 tubos.

Tubo	Zimosan	Comple- mento	Incubar (30°-37°)	Eritrocitos	HEM	Incubar (30°-37°)	TBS FRIO
1	0.25ml	---		0.25ml	0.25ml		1.25ml
2	0.25ml	0.25ml		0.25ml	0.25ml		1.0ml
3	---	0.25ml		0.25ml	0.25ml		1.25ml

### RESULTADOS:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>125 / 160</b>

### CUESTIONARIO:

1. ¿Qué es el complemento?
2. Enuncie la vía clásica y la vía alterna del complemento
3. Enuncie 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?

### BIBLIOGRAFÍA:

- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7ª ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>126 / 160</b>

# Proteína C Reactiva.

## INTRODUCCIÓN:

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, sin embargo, conceptualmente es útil separar la inflamación incluyen infecciones bacterianas y virales, tumores, infarto agudo al miocardio y procesos reumáticos. 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 vagos puede ayudar a determinar si deben llevarse a cabo más estudios.

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. La proteína C reactiva (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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>127 / 160</b>

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.

Otras implicaciones de PCR incluyen el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias pélvicas y de sepsis neonatal.

En la práctica efectuaremos una prueba en placa sensible y específica para la 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:**

- Látex anti proteína C reactiva
- Suero positivo para control
- Suero negativo para control
- Una placa de vidrio
- Centrífuga
- Equipo para venopunción

#### **SERVICIOS:**

- Agua corriente
- Electricidad
- Gas natural

#### **DESARROLLO:**

##### **PRUEBA CUALITATIVA**

1. Extraer sangre
2. Centrifugar a 2000 rpm, 5 minutos.
3. Separar el suero



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>128 / 160</b>

4. Diluya el suero a probar (1:10) con solución salina; dos gotas (0.1 ml del suero en 3.9 ml. de solución salina)
5. Colocar una gotita de la dilución anterior de las divisiones de la placa de vidrio
6. Añadir una gota de látex anti proteína.
7. Oscile suavemente la placa durante 3 minutos, observe si se presenta aglutinación macroscópica.

**INTERPRETACIÓN POSITIVO:** Aglutinación visible con forma de agregados y fondo claro; comparable con control positivo.

**INTERPRETACIÓN NEGATIVO:** 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.

### **PRUEBA CUANTITATIVA**

1. Preparar diluciones del suero problema en solución salina de la siguiente manera: Colocar 5 tubos de ensaye en una gradilla, depositar 0.5 ml de sol. Salina en cada uno.
2. Añadir 0.5 ml de suero diluido 1:40 (como en la prueba cualitativa) al primer tubo.
3. Mezcle bien y transfiera 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 un capilar o gotero poner una gota de cada dilución en las divisiones de la placa de vidrio con anterioridad marcadas.
5. Añadir una gota de látex anti proteína C reactiva a cada división.
6. Mezcle con un aplicador desde la dilución la más elevada a la más baja.
7. Oscile suavemente la placa durante 3 minutos y observe si se presenta aglutinación macroscópica.

### **INTERPRETACIÓN:**

La dilución más elevada del suero que muestre floculación visible, se considera como el título de proteína C reactiva en el suero problema.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>129 / 160</b>

## RESULTADOS:

## CUESTIONARIO:

1. ¿En qué momento se encuentra indicada esta prueba?
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?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>130 / 160</b>

## BIBLIOGRAFÍA:

- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7ª ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.

CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>131 / 160</b>

# Determinación del grupo sanguíneo y pruebas cruzadas.

## OBJETIVO:

- Describir los fundamentos de los sistemas de grupos sanguíneos ABO y Rh.
- Explicar la relación entre grupos sanguíneos, transfusiones de sangre y enfermedad hemolítica del recién nacido.
- Conocer el método para determinar el grupo sanguíneo.
- Reconocer la importancia médica de conocer el tipo de sangre y el Rh en cada individuo.

## INTRODUCCIÓN:

No todas las respuestas del sistema inmune producen un resultado conveniente. 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 llevado a cabo como un análisis de rutina, en pacientes internos, ambulatorios, intervenciones quirúrgicas, problemas de ictericia en el recién nacido, trasplantes, donación de sangre, etc.

### 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>132 / 160</b>

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- .

Cuando una persona Rh- recibe sangre Rh+, ésta 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>133 / 160</b>

### **MATERIAL:**

1. Portaobjetos
2. Lancetas y aplicadores
3. Sueros hemoclasificadores del sistema ABO
4. Torundas, ligaduras y jeringas
5. Gradilla
6. Tubos de hemólisis (cuatro)
7. Pipeta de 1 ml.
8. Solución
9. Centrifuga

### **SERVICIOS:**

1. Luz
2. Agua

### **DESARROLLO:**

#### **Determinación del Grupo Sanguíneo**

1. Se limpiará, con una torunda con alcohol, el lóbulo de la oreja de un alumno.
2. Puncionar con una lanceta estéril, esperar a que salga una gota de sangre.
3. Se colocan tres gotas de sangre, de manera separada, en n portaobjetos limpio.
4. Se adiciona una gota de suero anti-A, una gota de suero anti-B y otra anti-D, en cada gota de sangre respectivamente.
5. Se mezclarán con un aplicador de madera.
6. Observar el fenómeno que se presenta en cada prueba.
7. Reportar el tipo de sangre de acuerdo al siguiente cuadro en donde se observe aglutinación.

<b>INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b>	
<b>Antisuero</b>	<b>Grupo Sanguíneo</b>
Anti-A	Tipo A



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>134 / 160</b>

Anti-B	Tipo B
Anti-A y anti-B	Tipo AB
No aglutinación	Tipo O
Anti-D	Rh (+)
No aglutina anti-D	Rh (-)

### Pruebas cruzadas:

1. Obtener 5 ml de sangre de dos alumnos: donador y receptor.
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 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.
7. Agitar los tubos y centrifugar a 3000 rpm durante cinco minutos.
8. Observar si existe aglutinación, que se interpretará como incompatibilidad de grupos sanguíneos. Si no se observa aglutinación se interpretará como compatibilidad de grupos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>135 / 160</b>

## 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?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>136 / 160</b>

## BIBLIOGRAFÍA:

- Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. 5o Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier. (2004).
- Hernández Llop Alina. Microbiología y Parasitología medica. Editorial Ciencias medicas. El Vedado la Habana Cuba. 2006.
- Janeway Ch. A. Travers P. Walport M. Shlomchik M.J. 2o Ed. "Inmunologia . "El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. (2003).
- Parham Meter, Inmunología 2o Edición Editorial Médica Panamericana,( 2006)
- Roitt Ivan, Brostoff J. Male D. "Inmunología. Fundamentos" 9 Ed. Panamericana(2004).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>137 / 160</b>

# Factor reumatoide.

## OBJETIVO:

- Establecer la importancia de la prueba de Factor Reumatoide en el paciente.
- Describir las pruebas clínicas utilizadas para la determinación del Factor Reumatoide.
- Conocer el cuadro clínico.

## INTRODUCCIÓN:

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 al 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 millón.

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>138 / 160</b>

positiva, así como también en algunas otras enfermedades (que se enuncian más adelante).

En el laboratorio efectuaremos la prueba de “Reumatex” la cual es una prueba rápida para la determinación de factor reumatoide. El reactivo de látex- globulina aglutinará en presencia de un suero, adecuadamente diluido, que contenga el factor reumatoide.

### **MATERIALES:**

- Látex globulina (5ml) partículas de poliestireno sensibilizadas con gammaglobulina humana.
- Suero positivo para control (2ml).
- Suero negativo para control (2ml)
- 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 y un cartoncillo negro.
- Palillos.

### **SERVICIOS:**

- Agua
- Luz

### **DESARROLLO:**

#### *PRUEBA CUALITATIVA EN PLACAS DE VIDRIO.*

1. 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.
2. Colocar una gota de la mezcla anterior en uno de los óvalos de la placa de vidrio, y el cartoncillo negro debajo de la misma, para facilitar la lectura macroscópica.
3. Agregue una gota del reactivo Látex- Globulina
4. Mezcle con un palillo perfectamente extendiéndolo sobre toda la superficie del óvalo.

-Controles



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>139 / 160</b>

**NEGATIVO:** Coloque en un óvalo una gota de suero negativo de control y agregue una gota de látex – globulina. Mezcle con un palillo.

**POSITIVO:** El mismo procedimiento anterior, pero utilizando suero positivo de control.

Oscile suavemente la placa en ambos controles por uno o dos minutos y observe macroscópicamente si aparece aglutinación.

-Interpretación:

Compare el resultado del suero problema con los controles negativo y positivo.

**NEGATIVO:** Suspensión uniforme sin aglutinación visible, comparable al control negativo

**POSITIVO DÉBIL:** Aglutinación visible por formación de pequeños agregados ó solo aglutinación parcial.

**POSITIVO:** Aglutinación visible por la formación de agregados grandes y fondo claro, comparable al control positivo.

#### *PRUEBA SEMICUANTITATIVA EN PLACA DE VIDRIO.*

Esta prueba deberá llevarse a cabo con suero que ha dado una reacción positiva por el método de lectura cualitativa en placa de vidrio.

1. Efectuar diluciones del suero del paciente como se indica
2. Colocar 9 tubos limpios en una gradilla y marcarlos
3. 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.
4. 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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>140 / 160</b>

5. 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 y continuar el mismo procedimiento que para prueba cualitativa.

-Interpretación:

El título del suero corresponderá a la última dilución en que se presenta aglutinación del reactivo látex-globulina.

#### POSIBLES CAUSAS DE AGLUTINACIÓN INESPECÍFICA

- Lecturas posteriores a los tres minutos de efectuada la mezcla del suero y el látex- globulina
- Plasmas con fibrina
- Suero con alto contenido de lípidos

Sueros provenientes de personas sanas pueden presentar reacciones falsas positivas (por lo general débiles), pero esta incidencia es baja.

También puede obtener reacciones positivas en enfermedades diferentes a la artritis reumatoide, por ejemplo, lupus eritematoso diseminado, cirrosis hepática, esclerosis sistémica progresiva, lepra, sarcoidosis, etc. Y otras enfermedades inflamatorias crónicas.

#### RESULTADOS:

#### CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la importancia de determinar el factor reumatoide?

2. ¿Cuáles son los métodos que se pueden emplear?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>141 / 160</b>

3. ¿Cuáles serían las indicaciones de esta prueba?

4. Enuncie el cuadro clínico de la artritis reumatoide

5. ¿En qué enfermedades también se encontrarían resultados positivos?

6. ¿Qué reacción inmunológica se presenta en esta prueba?

#### **BIBLIOGRAFÍA:**

- Krupp, Tierney. Manual de diagnóstico clínico y de laboratorio. 8° ed. Manual moderno. 2008
- Martín Abreu, Luis. Fundamentos del diagnóstico. 11va ed. Méndez Editores. 2008
- Delves P, Martín S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7ª ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>142 / 160</b>

# Inmunidad específica.

## INTRODUCCIÓN:

El sistema fagocitario con otros mecanismos, constituye la primera línea de defensa contra el ataque de agentes patógenos. 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 espontáneamente 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 Brusa de Fabricius. La resección del primero produce una marcada detención en algunos aspectos del mecanismo inmunitario animal, siempre y cuando se haga esta intervención después del nacimiento, Se aprecia una atrofia de gran parte del tejido linfóide 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 caquécticos, 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 Brusa, dejando intacto del ritmo, el animal rechazara 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 de la Brusa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>143 / 160</b>

### **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.

A fin de cumplir cabalmente su cometido de defensa, inicia de producción de una serie de factores con funciones específicas y que amplifican la respuesta de defensa, los más importantes son:

### **Factor de Referencia (FT).**

Es una sustancia es de 10,000 de peso molecular, dializable, capaz de producir transformación y proliferación de linfocitos situados a distancia. Su acción amplifica la reacción inmunológica de defensa, al activar buen número de linfocitos situados en otros lugares del organismo.

### **Linfotoxina.**

Es una sustancia termoestable con un peso molecular de 90,000, capaz de destruir un gran número de células o gérmenes. Este efecto citotóxico es irreversible y se lleva a cabo primordialmente por la inhibición en la producción de ARN a nivel del núcleo de la célula afectada.

### **Factor antimigración de los macrófagos.**

La producción de esta sustancia por parte de los linfocitos, hace que los macrófagos que están "patrullando" el organismo se detengan en el lugar de ataque del antígeno y se concentren en este sitio para reforzar la acción fagocitaria de los neutrófilos.

### **Factor Armador de Macrófagos.**

Hace que los macrófagos se tornen más agresivos contra determinado antígeno y se conviertan en "macrófagos bravos".

Es una molécula especial de Ig producida por estos linfocitos y que va a actuar activando el linfocito B en la producción de anticuerpos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>144 / 160</b>

### **Interferon.**

Factor que impide la replicación de los virus.

### **Otros Factores.**

Parece que los linfocitos T producen otros factores no suficientemente individualizados aún, y que tendrían un flujo directo sobre neutrófilos, basófilos, eosinófilos reclutando estas células del sitio de agresión de un antígeno.

Por medio de todos estos factores y especialmente lo de la linfotóxina, El linfocito T cumple su función de defensa del organismo.

El conjunto de estos mecanismos constituye la llamada inmunidad celular.

### **MATERIAL:**

- Cámara de Bloom ya preparada para MIF.

### **SERVICIOS:**

- ✓ Agua
- ✓ Gas
- ✓ Electricidad

### **DESARROLLO:**

1. En la práctica observaremos el factor inhibidor de la migración de macrófagos con una cámara de Bloom ya preparada para MIF como material.
2. En dicha cámara y el monto de la inhibición de la migración de las células de un extremo se coloca antígeno y en el otro extremo no lleva nada es el que se emplea de testigo.
3. El linfocito T al ser activado por un Ag, produce: IFN, que activa a linfocitos que estén distantes, LT, que puede destruir células o gérmenes, MIF, que concentra los macrófagos en el sitio de agresión, IgT, regulan el funcionamiento de los LB, MAF, hace que los macrófagos sean "agresivos", Interferon, impide la replicación de los virus intracelularmente.
4. Si en una caja de Petri, con medio de cultivo se coloca germen Ag Y sobre ella un tubo de capilar con una suspensión de macrófagos, estos saldrán del tubo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>145 / 160</b>

en forma de abanico en busca del Ag. Si se agrega en el lugar de contacto en el tubo que contiene los macrófagos y la capa de agar. El extracto de factor antimigración de los macrófagos (MIF) producido por linfocitos activos inmunológicamente, los macrófagos permanecerían concentrados en ese lugar y no habrá lugar en la formación del abanico.

## RESULTADOS:

## CUESTIONARIO:

- 1.- Defina MIF.
- 2.- Describa la respuesta inmune celular.
- 3.- ¿Cuál es la importancia de la respuesta inmune celular?
- 4.- ¿Qué es el linfoblasto? ¿Cuál es su importancia?
- 5.- ¿Qué son las linfocinas?
- 6.- Describa la respuesta inmune humoral.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>146 / 160</b>

7.- ¿Cuál es la importancia de la respuesta inmune humoral?

8.- Defina inmunoglobulinas y cuales existen.

9.- Enuncie los mediadores de RIC y RIH.

**BIBLIOGRAFÍA:**

- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1<sup>a</sup> ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>147 / 160</b>

# Choque Anafiláctico.

## OBJETIVO:

- Comprender el choque anafiláctico clínica e inmunológicamente, a partir del provocado en el animal de experimentación (cobayo).

## INTRODUCCIÓN:

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 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. Para 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 mismo Ag, o sustancia de estructura parecida pueden inducir una reacción patológica.

Gell y Coombs han clasificado estas reacciones alérgicas en tipo I, II, III y reacciones alérgicas IV.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>148 / 160</b>

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, 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) cininas para provocar 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 de choque.

#### **DESARROLLO:**

1. A cobayos nuevos de 200-300 gr. de peso administrarles la dosis sensibilizante de antígeno; 0.1 ml. de ovoalbúmina de 10%.
2. Esperar 14 días.
3. Administrar la dosis de choque, mediante inyección intracardiaca de 0.1 ml. de ovoalbúmina a 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.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>149 / 160</b>

Los síntomas que generalmente se observan son:

- Erizamiento de pelo de la cabeza y espalda
- Prurito en la nariz
- Estornudos
- Tos
- Taquipnea
- Bradipnea
- Respiración espadmódica
- Defecación
- Micción
- Convulsiones
- Muerte

Lo anterior se desarrolla en poco tiempo (por lo general 8-12 minutos)

La inyección intraperitoneal da síntomas menos severos AUTOPSIA DE LOS ANIMALES.

Se estudiará de la misma forma al testigo, 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

Dos semanas después de la sensibilización activa, provocación con el mismo antígeno que ocasiona una reacción anafiláctica y la muerte.

### **CUESTIONARIO:**

1. Mencione la clasificación del fenómeno de hipersensibilidad.
  
2. ¿Por qué la inmunoglobulina está mediada la hipersensibilidad inmediata?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>150 / 160</b>

- ¿Qué determina la prueba de shock, y cuál es su importancia?
- Enuncie y explique cómo actúan los mediadores químicos (mínimo 5)
- Explique ampliamente todas las características de IgE
- ¿Qué importancia tiene para el médico este tipo de reacción?
- ¿Qué cambios presento el cobayo de control y por qué?
- Enuncie el cuadro clínico de choque anafiláctico
- Enumere sustancias que puedan desencadenar un choque anafiláctico en el humano.

#### **BIBLIOGRAFÍA:**

- Murphy K, Travers P. Inmunobiología de Haneway. McgrawHill. 2009.
- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología fundamentos. 12ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011
- Owen J, Punt J, Stranford S. Kuby Inmunología. 7ª ed. México: Mc Graw Hill; 2013
- Romero L, Jiménez M, Garcés M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.
- Krupp, Tierney. Manual de diagnóstico clínico y de laboratorio. 8º ed. Manual moderno
- Martín Abreu, Luis. Fundamentos del diagnóstico. 11va ed. Méndez Editores. 20



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	<b>1</b>	<b>151 / 160</b>

# REGLAMENTO DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

## MEDICINA

### LABORATORIOS L-123 \* L-124

DADO QUE LOS OBJETIVOS FUNDAMENTALES DE LOS TRABAJOS DE LABORATORIO EN LA ENSEÑANZA DE LA MICROBIOLOGÍA SON EN ORDEN DE IMPORTANCIA.

- I. ESTIMULAR EL APRENDIZAJE DE LOS ALUMNOS POR MEDIO DE ACTIVIDADES PRÁCTICAS EN EL LABORATORIO.
- II. INSISTIR EN LOS ASPECTOS CUANTITATIVOS DE LA CIENCIA.
- III. ENSEÑAR A LOS ESTUDIANTES A HACER OBSERVACIONES EXACTAS.
- IV. DESARROLLAR EN LOS ESTUDIANTES UNA ACTITUD CRÍTICA ANTE LOS NUEVOS ADELANTOS CIENTÍFICOS.
- V. APOYAR EL MATERIAL TEÓRICO DE LA CLASE.
- VI. CAPACITAR A LOS ALUMNOS EN EL MANEJO ADECUADO DE TÉCNICAS Y APARATOS USADOS EN LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICATIVA DE LA MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.

ES IMPRESCINDIBLE EL CUMPLIMIENTO DEL SIGUIENTE REGLAMENTO:

1. TODA PERSONA QUE PERMANEZCA EN EL LABORATORIO DEBERÁ TENER PUESTA UNA BATA BLANCA DE MANGA LARGA Y ALGODÓN.
2. EL GRUPO EN GENERAL ES RESPONSABLE DE LA LIMPIEZA Y CONSERVACIÓN DEL EQUIPO Y MATERIALES COMUNES DEL LABORATORIO DURANTE LA PRÁCTICA.
3. PARA EL TRABAJO EN EL LABORATORIO, LOS INTEGRANTES DEL GRUPO FORMARÁN EQUIPOS CON EL NÚMERO D



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>152 / 160</b>

EPERSONAS QUE DETERMINE EL PROFESOR TITULAR DE LABORATORIO.

4. LOS PROFESORES Y TODOS LOS ALUMNOS QUE INTEGRAN UN EQUIPO SON RESPONSABLES DEL BUEN DESARROLLO DE CADA PRÁCTICA, ASÍ COMO DEL MATERIAL QUE SE LES SUMINISTRE PARA LLEVARLAS A CABO.
5. EL ALUMNO DEBERÁ CONDUCIRSE ADECUADAMENTE EN EL LABORATORIO Y EN EL MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL DE LABORATORIO.
6. TODOS LOS ALUMNOS QUE INTEGRAN UN EQUIPO SON RESPONSABLES DE LA LIMPIEZA DE SU ÁREA DE TRABAJO DURANTE LA PRÁCTICA Y DE QUE ÉSTA SE ENCUENTRE LIMPIA AL TERMINAR LA SESIÓN Y ABANDONAR EL LABORATORIO.
7. EL ALUMNO DEBERÁ LIMPIAR CON DESINFECTANTE LA MESA AL INICIO Y TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.
8. EL MATERIAL NECESARIO PARA DESARROLLAR UNA PRÁCTICA DEBERÁ SER PEDIDO EN EL INTERLABORATORIO, USANDO UN VALE IMPRESO EXPRESAMENTE PARA DICHO FIN Y ADJUNTANDO A ÉSTE LA CREDENCIAL VIGENTE DE LA FES "ZARAGOZA" DE LA PERSONA QUE FIRMÓ EL VALE, EL LISTADO DEL MATERIAL DE CADA UNA DE LAS PRÁCTICAS SE PUBLICARÁ EN LA PUERTA DE ACCESO DEL INTERLABORATORIO.
9. AL RECIBIR EL MATERIA, EL USUARIO DEBE REVIZAR QUE ÉSTE SE ENCUENTRE LIMPIO, EN BUEN ESTADO Y COMPLETO. AL TPERMINO DE LA PRÁCTICA, DEBERÁ SER ENTREGADO COMPLETO, TAL Y COMO SE RECIBIÓ.
10. SI POR ALGUNA RAZÓN EL MATERIAL QUE SE ENTREGUE AL INTERLABORATORIO ESTÁ DETERIORADO O INCOMPLET, EL USUARIO DEBERÁ HACER UN VALE ADICIONAL POR ESE MATERIAL, Y DEJAR SU CREDENCIAL HASTA QUE SE REPONGA LO DAÑADO O FALTANTE, HAY COMO LÍMITE DOS SEMANAS PARA REPONER DICHO MATERIAL, CUMPLIDO ESE TIEMPO NO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>153 / 160</b>

SE LE PERMITIRÁ LA ENTRADA A LA PRÁCTICA A LOS MIEMBROS DEL EQUIPO DEUDOR.

11. DURANTE EL TRANCURSO DE UNA PRÁCTICA, EL ALUMNO SÓLO PODRÁ UTILIZAR LOS APARATOS, EQUIPOS Y REACTIVOS QUE HAY EN EL LABORATORIO SI ESTÁ SIENDO ASESORADO POR EL PROFESOR.
12. TODO MATERIAL DEVUELTO AL INTERLABORATORIO DESPUÉS DE SU USO, TENDRPA QUE CUBRIR CON LOS REQUISITOS QUE LOS DOCENTES Y EL PERSONAL DEL INTERLABORATORIO ESPECIFIQUEN.
13. EL MATERIAL UTILIZADO DURANTE LA PRÁCTICA, SE DEBERÁ ENTREGAR MÁXIMO 10 MINUTOS ANTES DE QUE CONCLUYA EL HORARIO ASIGNADO.
14. EL ALUMNO O ALUMNOS DEBERÁN PRESENTARSE A LA LECTURA DE RESULTADOS CON SU BATA PUESTA Y EN EL HORARIO ESTABLECIDO PARA ELLO (HORARIO PUBLICADO EN LAS PUERTAS DEL ACCESO AL INTERLABORATORIO).
15. CADA EQUIPO DE TRABAJO, DEBERÁ TRAER EN CADA UNA DE LAS PRÁCTICAS EL MATERIAL QUE SE ESPECIFICA EN LOS PROTOCOLOS DE LAS PRÁCTICAS, ASÍ COMO EL QUE ES SOLICITADO POR SUS PROFESORES AL INICIO DEL SEMESTRE.
16. ESTÁ PROHIBIDO INTRODUCIR ALIMENTOS, FUMAR Y HACER USO INADECUADO DEL EQUIPO E INSTALACIONES DE LABORATORIO.
17. QUEDA ESTRICTAMENTE PROHIBIDO EL PASO AL INTERLABORATORIO PARA CUALQUIER ALUMNO O PERSONA AJENA AL ÁREA.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>154 / 160</b>

18. AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA, AL ABANDONAR EL PROFESOR EL LABORATORIO, NO PODRÁ PERMANECER NINGÚN ALUMNO EN EL INTERIOR DE ÉSTE.

## 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 la NOM-087 –Ecol-SSA1-2002
- Enlistar las normas aplicables al trabajo dentro del laboratorio.
- Aplicar las normas vigentes relacionadas al trabajo en el laboratorio

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas, 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.

*La presente Norma Oficial Mexicana (NOM) establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos así como las especificaciones para su manejo. Esta NOM es de observancia obligatoria para los establecimientos que generen residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios a terceros que tengan relación directa con los mismos.*

*Los desechos generados deberán ser separados de acuerdo a sus características biológicas y estado físico, tal como se muestra en la siguiente tabla.*

<b>Tipo de residuo</b>	<b>Estado físico</b>	<b>Recipiente</b>	<b>Color</b>
<b>Sangre</b>	Líquido	Recipientes herméticos	Rojo
<b>Cultivos y cepas de agentes infecciosos</b>	Sólidos	Bolsa de polietileno	Rojo
<b>Patológicos</b>	Sólido	Bolsa de polietileno	Amarillo
	Líquido	Recipientes herméticos	Amarillo
<b>Residuos no anatómicos</b>	Sólido	Bolsa de polietileno	Rojo
	Líquido	Recipientes herméticos	Rojo
<b>Objetos punzocortantes</b>	Sólidos	Recipientes rígidos	Rojo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
<b>SGC-FESZ-MC-ML03</b>	<b>10/ 11 /2017</b>	1	<b>155 / 160</b>

### ***Inactivación de muestras***

*Cuando se carezca de recipientes herméticos y se tengan que desechar tubos con sangre, ya sea anti coagulada o coagulada, o bien cuando se trate de otro fluido, éstos 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, debe hacerse pasar el contenido*

*inactivado por un colador. El tubo así podrá ser desechado a la basura municipal y los restos de coágulos serán envueltos en papel periódico y desechados a la bolsa roja.*

CONCESION