



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Carrera Cirujano Dentista

TERCER AÑO

ÁREA BIOLÓGICA

Manual de Prácticas de Laboratorio del

Módulo

**"Mecanismos Infecciosos y Respuesta Inmune del
Sistema Estomatognático"**

Fecha de aprobación por el CAC:
29 de Enero de 2019

Vigencia: **29/01/2019-29/01/2021**



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	2 / 155

Revisión, reestructuración y actualización del manual del módulo "MIRISE": 2019

C.D. Diana María Buendía Martínez

C.D. Niria Rebeca Castro Rico

Dr. Rubén Marroquín Segura

Dra. María Teresa de Jesús Zaragoza Meneses

Colaboradores:

C.D. Esp. Diego Ulises Arellano García

QFB María Elena Tejeda Rosales

Revisión, reestructuración y actualización del manual del módulo "MIRISE": 2016

Mtra. Inés Vásquez Díaz

EPMB. Gabriela Alejandra Albiter Farfán

Dra. María Teresa De Jesús Zaragoza Meneses

C. D. Diana María Buendía Martínez

C. D. Niria Rebeca Castro Rico

C.D. Yolanda García Méndez

Dr. Edgar Ledesma Martínez

Colaboradores:

C.D. Alejandro Muzquiz Shamosh

QFB. María Elena Tejeda Rosales



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	3 / 155

Revisión, reestructuración y actualización Julio 2013:

Organización: Mtra. Laura Arias Vera

Responsable Académico: Dra. María Teresa De Jesús. Zaragoza Meneses

Q. B. P. Ma. Emelina Del C. Amil Estrada

C. D. Diana Ma. Buendía Martínez

C. D. Niria Rebeca Castro Rico

C.D. Yolanda García Méndez

C.D. Alejandro Muzquiz Shamosh

C. D. María Teresa De Jesús Zaragoza Meneses

QFB. María De Las Mercedes Zamudio Durán



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	4 / 155

ÍNDICE

Criterios de Evaluación del laboratorio.....	6
Reglamento del laboratorio.....	8
Manejo de RPBI.....	10
Introducción.....	12
Objetivo General.....	12

UNIDAD I MICROBIOLOGÍA

Práctica 1: Factores de patogenicidad de microorganismos de cavidad bucal...	13
Práctica 2: Identificación de <i>Staphylococcus</i>	21
Práctica 3: Microorganismos de importancia en caries dental.....	29
Práctica 4: Pruebas de susceptibilidad de caries dental.....	43
Práctica 5: Morfología microscópica de <i>Mycobacterium</i> (BAAR +).....	49
Práctica 6: Microorganismos de importancia en patología pulpar y absceso dental.....	55
Práctica 7 y 8: Aislamiento e identificación de los microorganismos de importancia en la enfermedad periodontal.....	64
Práctica 9: Identificación de cándida en cavidad oral.....	74
Práctica 10: Acción antimicrobiana de algunas soluciones de uso común en la práctica odontológica.....	83
Práctica 11: Antibiograma.....	92



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	5 / 155

UNIDAD II: INMUNOLOGÍA

Práctica 1: Mecanismos de defensa inespecíficos en cavidad oral.....	99
Práctica 2: Reacciones de precipitación en capilar.....	106
Práctica 3: Reacciones de precipitación en gel.....	113
Práctica 4: Reacciones de aglutinación.....	119
Práctica 5: Fijación de complemento.....	125
Práctica 6: Choque anafiláctico.....	131
Práctica 7: Antiestreptolisinas.....	138
Práctica 8: Determinación de Anticuerpos heterófilos como diagnóstico de la mononucleosis infecciosa.....	144
Práctica 9: Determinación del título de anticuerpos en saliva y suero contra cepas potencialmente cariogénicas y su relación con el C.P.O.....	148
Identificación de cambios.....	155



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	6 / 155

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DEL LABORATORIO

- Para tener derecho a examen ordinario, el alumno deberá tener como mínimo un 80% de asistencia a las prácticas de laboratorio.
- La evaluación de laboratorio es determinada para cada alumno con base en los resultados obtenidos en:
 1. El trabajo desarrollado durante la práctica.
 2. El reporte de la práctica así como su contenido.
 3. Los exámenes formativos.
- El reporte de cada práctica, deberá ser entregado en la siguiente sesión de laboratorio, en el momento de tomar la asistencia (no se aceptan reportes extemporáneos).
- El reporte de cada práctica, se entregará en un folder adicional y deberá contener los siguientes apartados:
 - a) **OBJETIVO:** Se describe la importancia y finalidad de realizar la práctica.
 - b) **INTRODUCCIÓN:** debe contener antecedentes históricos, generalidades del tema, fundamento y mecanismos de las reacciones o procesos que se llevan a cabo en la práctica.
 - c) **RESULTADOS:** Describir, dibujar o esquematizar los resultados de los procesos o reacciones que se efectuaron en la parte experimental.
 - d) **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:** describir cual es la interpretación que se hace de los resultados obtenidos en la parte experimental, relacionando éstos con los conceptos teóricos.
 - f) **CUESTIONARIO:** resolución de las preguntas del protocolo de prácticas.
 - g) **BIBLIOGRAFÍA:** Anotar los libros consultados según los criterios de Vancouver.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	7 / 155

En la evaluación del reporte de la práctica, se tomará la siguiente escala de calificación:

	Puntaje:
a) Objetivo	1.0
B) Introducción	1.0
C) Resultados	2.5
D) Discusión y/conclusiones	2.5
E) Cuestionario	2.0
F) Bibliografía	1.0

- Exámenes parciales: se realizarán de dos a tres evaluaciones parciales de laboratorio, de acuerdo al número y temática de las prácticas. Las evaluaciones no acreditadas se presentarán en primera y segunda vuelta.

Para obtener una calificación aprobatoria, es necesario que las evaluaciones de todos los exámenes de laboratorio sean aprobatorias

- La calificación total de laboratorio se determina con base al siguiente porcentaje:

- a) Promedio de exámenes 50%
- b) Promedio de reportes 50%

- La calificación aprobatoria de laboratorio es indispensable para tener derecho a la calificación final del Módulo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	8 / 155

CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA e INMUNOLOGÍA

Dado que los objetivos fundamentales de los trabajos de laboratorio en la enseñanza de la Microbiología son:

- Apoyar los conocimientos adquiridos en la teoría mediante la demostración de fenómenos en prácticas.
- Favorecer el aprendizaje de los alumnos por medio de técnicas de laboratorio
- Desarrollar en los estudiantes una actitud crítica por medio de la interpretación de los resultados de las prácticas, orientándolos hacia aspectos relacionados con su práctica profesional.
- Capacitar a los alumnos en el trabajo científico del laboratorio para promover el interés por la investigación científica.

Es imprescindible el cumplimiento del siguiente reglamento:

- a. Toda persona que permanezca en el laboratorio deberá tener puesta una bata de manga larga.
- b. La asistencia a las prácticas de laboratorio es obligatoria y por lo tanto, se pasará lista a todos los integrantes del grupo al inicio de cada práctica.
- c. No se permitirá la entrada a ningún alumno, pasados quince minutos del inicio de la práctica.
- d. El grupo en general, es responsable de la limpieza y conservación del equipo y materiales comunes del laboratorio durante la práctica.
- e. Para el trabajo en el laboratorio, los integrantes del grupo formarán equipos con el número de personas que determine el profesor responsable del mismo.
- f. Todos los alumnos que integran un equipo, son responsables de la limpieza de su área de trabajo durante la práctica, así como del material que se les suministra para llevarlas a cabo, y de que ésta se encuentre limpia al terminar la sesión y abandonar el laboratorio.
- g. El material necesario para desarrollar una práctica, deberá ser solicitado en el interlaboratorio, usando un vale impreso expresamente para dicho fin y adjuntando a éste la credencial de la persona que firmó el vale.
- h. Al recibir el material, el usuario debe revisar que esté completo y sin daños.
- i. Todo material y equipo devuelto al interlaboratorio después de su uso, tendrá que



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	9 / 155

- estar completo y sin daño alguno.
- j. En el caso de ser material que requiera ser guardado en el interlaboratorio para una observación posterior, éste deberá estar etiquetado con una leyenda que incluya equipo, grupo y fecha.
- k. Si por alguna razón, el material que se entregue al interlaboratorio está deteriorado o incompleto, el usuario deberá hacer un vale adicional por ese material y dejar su credencial hasta que se reponga lo dañado o faltante. Hay como límite dos semanas para reponer dicho material; cumplido ese tiempo, no se les permitirá la entrada a prácticas a los miembros del equipo deudor.
- l. Durante el transcurso de una práctica, el alumno sólo podrá utilizar los aparatos que hay en el laboratorio, si está siendo asesorado por un profesor.
- m. Cada equipo de trabajo, deberá traer para cada una de las prácticas el material que le indique su profesor:
- Un rollo de masking tape
 - Paño lavable para limpieza que no suelte pelusa
 - Jabón para su limpieza personal
 - Algodón
 - Marcador
 - Lápiz graso
 - Asa bacteriológica
 - Papel seda
 - Toallas de papel para secarse las manos
 - El material adicional que se requiera para cada práctica
- n. Se prohíbe fumar y hacer uso inadecuado del equipo y las instalaciones del laboratorio
- o. Se prohíbe ingerir alimentos o bebidas en el interior del laboratorio
- p. Durante su estancia en el laboratorio, los alumnos deberán apagar su teléfono celular,
o cualquier otro aparato de comunicación, debido a que en las prácticas se maneja material biológico y existe riesgo de contaminación.
- q. Para cualquier alumno o persona ajena, queda prohibido el paso al interlaboratorio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	10 / 155

Manejo de RPBI

TIPO DE RESIDUO	ESTADO FISICO	ENVASADO	COLOR	
Sangre	Líquido	Recipientes herméticos	Rojo	
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólido	Bolsas de polietileno	Rojo	
Patológicos	Sólido	Bolsas de polietileno	Amarillo	
	Líquido	Recipientes herméticos	Amarillo	
No anatómicos	Sólido	Bolsas de polietileno	Rojo	
	Líquido	Recipientes herméticos	Rojo	



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	11 / 155

Objetos punzocortantes *	Sólido	Recipientes rígidos de polipropileno	Rojo	
--------------------------	--------	--------------------------------------	------	---

* Excepto material de vidrio de laboratorio roto

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Diario Oficial de la Federación el 17 de febrero de 2003

Guía para el manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos en unidades de salud. Secretaría de Salud. 2003.

www.salud.gob.mx



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	12 / 155

INTRODUCCIÓN

El perfil profesional del Cirujano Dentista de la FES Zaragoza en el Plan de Estudios actual del tercer año de la carrera, promueve el conocimiento teórico-práctico que permita abordar el proceso salud-enfermedad en población adulta y mujer embarazada, realizando actividades de investigación que fundamentan el diagnóstico integral comunitario e individual así como la conducta odontológica a seguir para dar solución a las enfermedades bucales y sistémicas de la población, tomando en cuenta las técnicas y procedimientos indicados para dar solución a dichos problemas y la integración de los conocimientos teórico-prácticos adquiridos.

El módulo de Mecanismos Infecciosos y Respuesta Inmune del Sistema Estomatognático, se ubica en el tercer año de la carrera de Cirujano Dentista en el Plan de Estudios ya que, en este momento el alumno cuenta con los conocimientos necesarios para realizar diagnósticos integrales y establecer la conducta odontológica adecuada para cada paciente.

La parte práctica de este módulo complementa e integra los conocimientos teóricos que el alumno va adquiriendo durante el año escolar, manteniendo la congruencia vertical y horizontal, favoreciendo la integración del conocimiento en tiempo y forma con prácticas que apoyan el proceso enseñanza y aprendizaje.

OBJETIVO GENERAL

El manual del módulo Mecanismos Infecciosos y Respuesta Inmune del Sistema Estomatognático (MIRISE) tiene como objetivo contribuir a la aplicación práctica de los conocimientos obtenidos en el componente teórico como parte del proceso de formación integral del estudiante del tercer año de la carrera de Cirujano Dentista en el área de microbiología e inmunología. De tal manera que permite al estudiante comprender de una mejor forma los aspectos fisiopatológicos que se presentan en el organismo humano como parte de los mecanismos de defensa, haciendo énfasis en cavidad oral.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	13 / 155

UNIDAD I MICROBIOLOGÍA

Práctica No. 1

FACTORES DE PATOGENICIDAD DE MICROORGANISMOS DE CAVIDAD BUCAL

OBJETIVO

Dar a conocer al alumno los mecanismos que tienen las bacterias para producir daño al organismo, así como las interacciones huésped parásito que se observan en cavidad bucal.

Para realizar la práctica, el alumno debe revisar previamente los siguientes conceptos:

- 1.- Definición de Patogenicidad y Virulencia
- 2.- Definición de Flora Normal
- 3.- Definición de Oportunista

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de los daños al organismo, son de suma importancia para la prevención, diagnóstico y tratamiento de las diferentes enfermedades diferentes microorganismos que se encuentran en el organismo y que pueden o no ser causantes de enfermedad, así como los mecanismos o medios de que estos microorganismos se valen para causar de cavidad bucal.

Todas las bacterias se han dividido en dos grandes grupos: patógenas y no patógenas. El término patógeno se refiere a la capacidad que tiene un microorganismo para producir enfermedad, esta capacidad bacteriana de causar daño o producir enfermedad se debe a las características propias de cada una de ellas, tomando en cuenta los siguientes criterios entre otros:

- Características de la pared y membrana celular
- Producción de endotoxinas
- Producción de exotoxinas
- Producción de enzimas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	14 / 155

No debemos olvidar que los mecanismos de defensa de nuestro cuerpo juegan un papel muy importante en la presencia de la enfermedad, es decir, si los mecanismos de defensa del huésped se encuentran en estado óptimo no se producirá enfermedad, pues el microorganismo al penetrar al organismo debe primero adherirse a los tejidos mismos que deben tener pH, temperatura y aporte nutricional adecuados para que el agente agresor se multiplique e invada al organismo, también debe tener los atributos necesarios para vencer o engañar a los mecanismos de defensa como fagocitosis, complemento, lisozima, Inmunoglobulinas, etc. y por último debe producir enzimas y toxinas suficientes y capaces de producir daño.

En todo el organismo, se encuentran una gran cantidad de bacterias que no son patógenas y si son necesarias para el correcto funcionamiento del cuerpo humano, por ejemplo los Lactobacilos que se encuentran en gran cantidad en el intestino y que ayudan a la digestión, sin estos microorganismos se presentarían diarreas muy severas, a estos y otros muchos microorganismos que cohabitan sin causar daño se les conoce como Flora Normal Bacteriana; en algunos momentos algunos de estos microorganismos se pueden transformar en patógenos por cambios o deficiencias de los mecanismos de defensa y entonces reciben el nombre de Oportunistas porque son causantes de enfermedad.

Algunos de los factores de patogenicidad microbiana son:

1. Cápsula: Es una capa externa a la pared celular constituida de polisacáridos y en algunos casos polipéptidos, su función principal es defender a las bacterias que la poseen de la fagocitosis; la presencia de esta se encuentra altamente relacionada con la virulencia de un microorganismo.

2. Adherencia: Ciertas bacterias tienen estructuras especializadas como el pili que le permiten adherirse a los epitelios o mucosas, o producen y/o contienen sustancias que les permiten adherirse a las superficies de las células humanas: todos estos elementos potencian su capacidad de causar daño.

3. Invasividad: Uno de los dos principales mecanismos mediante los cuales las bacterias provocan enfermedad es la invasión del tejido seguida de inflamación. Muchas bacterias producen enzimas cuya función es ayudarles a invadir varios tejidos, algunas de estas enzimas son:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	15 / 155

- *Colagenasa y Hialuronidasa*: Exotoxinas que degradan sus respectivos sustratos intercelulares (colágeno y ácido hialurónico), lo cual permite a la bacteria que se disemine a través del tejido, la producen principalmente *Streptococcus pyogenes* y *Porphyromona melaninogénica* entre otras.

- *Coagulasa*: Es una enzima producida principalmente por *Staphylococcus aureus* la cual acelera la producción de un coágulo de fibrina a partir de fibrinógeno, este coágulo protege a la bacteria de la fagocitosis al cubrir el área infectada o recubrir al microorganismo con una capa de fibrina.

- *Proteasa anti IgA*: La cual degrada IgA permitiendo al microorganismo adherirse a las membranas mucosas, es principalmente producida por *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*.

- *Leucocidinas*: Destruyen leucocitos, neutrófilos y macrófagos facilitando el desplazamiento bacteriano limitando a los mecanismos de defensa.

4. Producción de Toxinas: El segundo mecanismo importante usado por las bacterias para originar o causar enfermedad es la producción de toxinas, las cuales se dividen en Endotoxinas y Exotoxinas.

a) Exotoxinas: son sintetizadas por varios grupos de bacterias Gram positivas y Gram negativas, son polipéptidos que permiten a la bacteria fijarse a la membrana celular penetrando en la célula y tener actividad tóxica. La toxicidad de estas sustancias es muy elevada y es producida por varios microorganismos entre otros *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*. etc. En casi todos los casos, la toxina es la que causa más daño al organismo que la propia bacteria. Ejemplos:

Hemolisinas: Son exotoxinas que causan hemólisis (lisis o ruptura de eritrocitos) es producida principalmente por Estreptococos y Estafilococos coagulasa positivos.

1.- Estreptolisina O: Es sensible al oxígeno, produce in vitro lisis de eritrocitos en cajas de agar sangre, tiene efecto leucotóxico y cardiotóxico, es antigénica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	16 / 155

2.- Estreptolisina S: Tiene características similares a la Estreptolisina O pero esta no es inmunogénica (porque no genera anticuerpos)

Lecitinasa: Enzima extracelular producida por ciertas bacterias como *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* entre otros, su función es romper las lecitinas y que en agar yema de huevo forma una zona de opacidad alrededor de las colonias de los microorganismos productores de esta enzima.

Catalasa: Enzima que rompe la molécula de H_2O_2 convirtiéndola en H_2O + Oxígeno libre.

Bacteriocinas: Una bacteriocina es una toxina proteica sintetizada por una bacteria con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas. Las bacteriocinas son muy importantes en medicina, ya que suelen ser producidas por especies no patogénicas que colonizan el cuerpo humano. Si estas desaparecen por alguna causa, se da la oportunidad de infectar a un microorganismo que habitualmente no sería capaz.

Algunas de las enfermedades donde están implicadas exotoxinas como principales causantes de daño tenemos: Difteria, tétanos, gangrena gaseosa, botulismo, ántrax, choque tóxico, fiebre escarlatina, diarrea, cólera, tosferina, etc.

b) Endotoxinas: Son partes integrales de las paredes celulares de cocos y bacilos Gram negativos, son lipopolisacáridos, de baja toxicidad, generalmente son las causantes de fiebre, hipotensión, vasodilatación e inflamación. Existen bacterias que producen endotoxinas y exotoxinas que por sí solas no son capaces de hacer daño al organismo, pero que al unirse como bacteria secundaria al agente causal de alguna enfermedad, potencializa sus productos transformándose estos en toxinas dañinas para el huésped, por ejemplo *Streptococcus agalactiae* al unirse con *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* produce en agar sangre un efecto conocido como CAMP positivo en el cual se potencializa el efecto de la hemólisis, conocida así por sus siglas CAMP (de Christie, de Atkins y de Munich-Peterson).

Los *Streptococcus* del grupo B (*S. agalactiae*) secretan el factor CAMP, una proteína termoestable y difusible que interactúa con la β hemolisina secretada por *S. aureus* el cual produce esfingomielinasa C que al unirse con el factor CAMP provoca un sinergismo de la hemólisis (Punta de flecha)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	17 / 155

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepas bacterianas:

Staphylococcus aureus productor de beta-toxina.
Streptococcus pyogenes
Streptococcus agalactiae

Medios de Cultivo:

- 1 Tubo con plasma humano
- 2 cajas con agar sangre de carnero al 5%
- 1 caja con agar yema de huevo (agar LV)

Mechero e incubadora

SERVICIOS

Agua, luz y gas.

PROCEDIMIENTO

A) Hemolisinas:

Tomar una muestra de exudado faríngeo de un compañero con un hisopo estéril, y sembrarlo en una caja con agar sangre por estría cruzada, incubar por 24 horas a 37°C. Observar los tipos de hemólisis que se presentan y hacer lectura de la morfología colonial de las colonias cultivadas.

B) Prueba de CAMP:

Inocular una estría recta simple en una tercera parte central del agar sangre con *Staphylococcus aureus*, colocar lo más cerca posible una estría recta perpendicular a la anterior con *Streptococcus pyogenes* y otra al otro extremo con *Streptococcus agalactiae*, teniendo cuidado de que ninguna estría haga contacto. Incubar a 37°C por 24 horas, observar la presencia de una zona con forma de punta de flecha con hemólisis incrementada en la unión entre los Estreptococos y Estafilococos.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	18 / 155

C) Catalasa:

Tomar un portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado, colocarle una gota de Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) colocar una muestra de *Staphylococcus aureus* mezclándolo en la gota de H₂O₂, observar cuidadosamente la formación o no de burbujas por efecto de la molécula de Oxígeno libre.

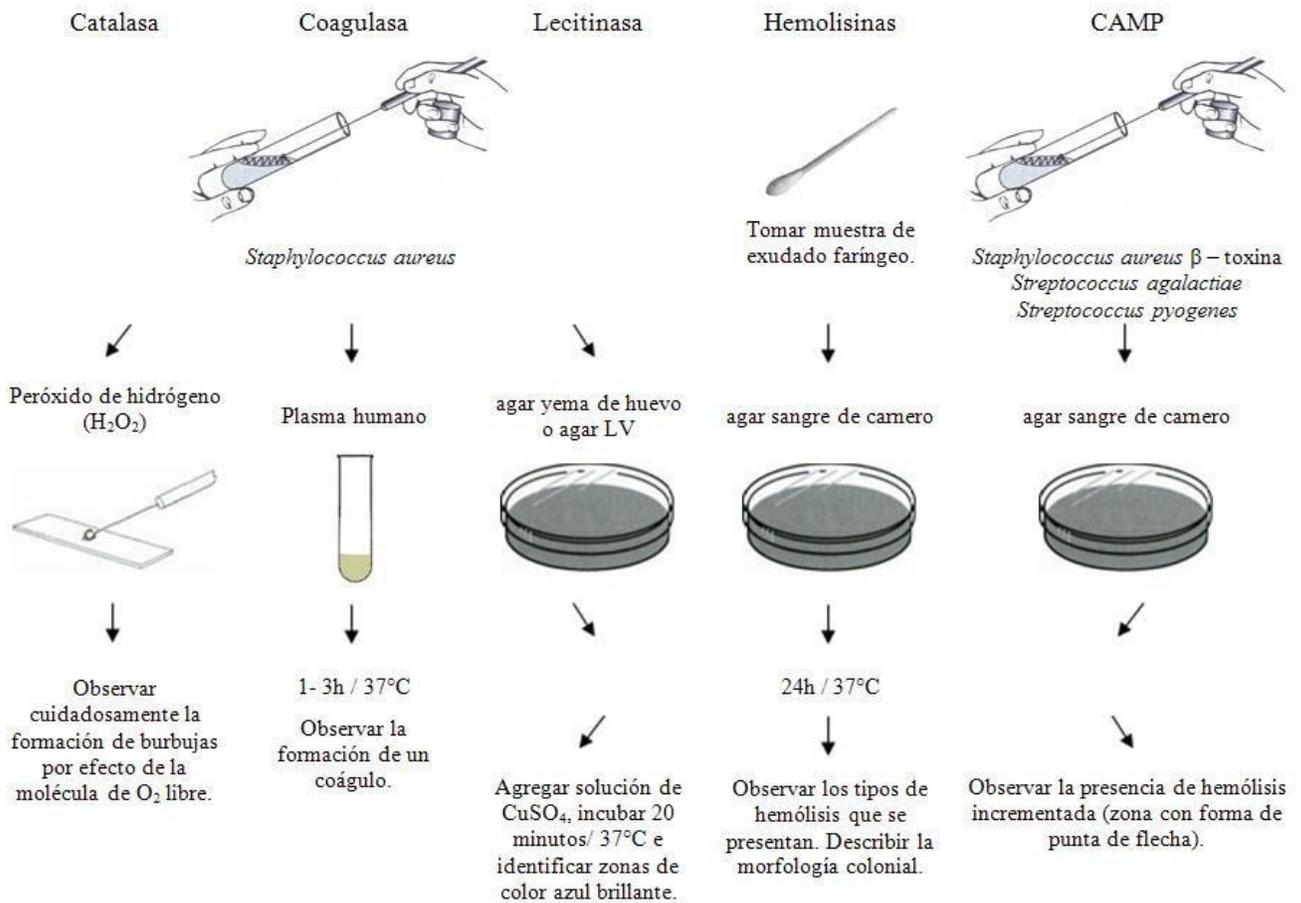
D) Lecitinasas:

Inocular la caja con agar yema de huevo con una muestra de *Staphylococcus aureus* por estría cruzada, incubar a 37°C por 24 horas, observar una zona opaca u opalescencia alrededor de las colonias agregar solución saturada de sulfato de cobre eliminar el exceso de reactivo y dejar secar, incubar por 20 minutos identificar las zonas que contienen ácidos grasos libres por la formación de jabón insoluble de color azul brillante.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	19 / 155

PROCEDIMIENTO





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	20 / 155

RESULTADOS

Leer morfología colonial de las bacterias cultivadas, tipo de hemólisis, y presencia o ausencia de cada una de las enzimas y/o toxinas mencionadas anteriormente.

Cuestionario

- 1.- ¿Cuales son las principales diferencias entre exotoxinas y endotoxinas?
- 2.- Defina y diferencie patogenicidad y virulencia
- 3.- Mencione en qué tipo de infecciones de cavidad bucal intervienen los mecanismos de patogenicidad demostrados hoy en la práctica.
- 4.- Mencione que factores de patogenicidad posee *Staphylococcus aureus* que son importantes en cavidad bucal.

BIBLIOGRAFIA

1. Arce MAY. Inmunología e inmunopatología oral. México: El manual moderno, S.A. de C.V.; 2009.
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
3. Carrol, K.C ; Stephen.A.M; Mietzner.T; Microbiología médica 27a ed. México: Mc Graw Hill-Interamericana 2016.
4. Engleberg NK, Di Rita VJ, Dermody TS. Mecanismos de las enfermedades microbianas. 5a. ed. Filadelfia: 2013.
5. González FRM, Molina LJ. Microbiología bucal. 4a. ed. México: Méndez editores; 2009.
6. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
7. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Inmunología. 8a. ed. España: Elsevier; 2014.
8. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca; 2011.
9. Negroni M. Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3a. ed. Argentina: Médica panamericana; 2018.
10. Ryan JK, Ray CG. Microbiología médica de Sherris. 6a. ed. México: Mc Graw Hill-Interamericana editores; 2017.
11. Spicer WJ. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas: texto y atlas en color. España: Elsevier; 2009.
12. Struthers JK, Westran RP. Bacteriología clínica. Bcelona España: Masson; 2005.
13. Tay ZJ. Microbiología y parasitología clínica. 4a. ed. México: Méndez editores; 2012.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	21 / 155

Práctica No. 2

IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS

OBJETIVO

El alumno diferenciará cepas patógenas y no patógenas de estafilococos mediante características específicas observadas en los medios de cultivo y pruebas bioquímicas.

Para realizar la práctica, el alumno deberá revisar previamente los siguientes temas:

1. Morfología de *Staphylococcus*.
2. Factores de patogenicidad producidos por *Staphylococcus aureus*.
3. Patologías en que está involucrado este microorganismo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En la gran mayoría de las infecciones supurativas de cavidad oral se encuentra involucrado el género *Staphylococcus*. Casi todas las personas tendrán algún tipo de infección por *Staphylococcus aureus* durante su vida, cuya intensidad va desde envenenamiento por alimentos o infecciones cutáneas menores a infecciones graves que ponen en peligro la vida.

Los estafilococos son cocos Gram positivos que se pueden encontrar aislados, en pares y se dividen en más de un plano formando racimos irregulares, por lo general son acapsulados, aunque se han descrito formas capsuladas. Son inmóviles, figuran entre los microorganismos no esporulados más resistentes.

Los estafilococos se encuentran frecuentemente en la cavidad bucal. Aunque no en gran cantidad las dos especies de particular interés son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Ambos son aerobios y anaerobios facultativos relativamente resistentes al calor y hasta cierto grado a desinfectantes. El *Staphylococcus aureus* es coagulasa, catalasa y manitol positivos y transforman los teluritos en telurios. Crecen en presencia de cloruro de sodio al 10%, son halófilicos.

Se considera que los estafilococos son causa de ciertas infecciones de la cavidad bucal y de las piezas dentales y compiten con los estreptococos como el agente más frecuente de



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	22 / 155

las infecciones bacterianas de la cavidad bucal. Los conductos radiculares infectados y abscesos dentales, frecuentemente muestran al cultivo la presencia de *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus causa una gran variedad de enfermedades en el humano, los tres grupos más importantes son: las infecciones de la piel, de los órganos y de los tejidos profundos y las toxinosis, la toxinosis es la formación de toxinas que corresponde al microorganismo

Entre las primeras destacan por su frecuencia la foliculitis, la celulitis, el impétigo; en el segundo grupo se incluyen enfermedades de mayor gravedad como las bacteremias, endocarditis, meningitis, osteomielitis, neumonías, mastitis, abscesos diversos, las infecciones de heridas postquirúrgicas, artritis séptica, enterocolitis y las infecciones genitourinarias, adquiridas tanto en ambiente comunitario como intrahospitalario. En el grupo de intoxicaciones están: la intoxicación alimentaria, necrosis epidérmica tóxica, síndrome de piel escaldada y el síndrome de choque tóxico. Se han encontrado en infecciones endodónticas y en algunos abscesos periapicales.

Otra de sus características es que presentan resistencia a los antibióticos eficaces para bacterias Gram positivas, incluyendo penicilina y los de amplio espectro. Pueden producir enfermedad tanto por su capacidad para multiplicarse y extenderse con amplitud por los tejidos como por su producción de sustancias extracelulares. Algunas de estas sustancias son enzimas, otras se consideran toxinas, aunque pueden funcionar como las anteriores.

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LOS ESTAFILOCOCOS

CARACTERÍSTICAS	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Pigmento de colonias en agar S-110	Amarillo	Blanco
Agar Sal y Manitol	+	-
Agar Vogel Jonhson	Negro	Blanco
Coagulasa	+	-
Hemolisinas	+	-
Lipasa	-	-
Catalasa	+	+
Fermentación de azúcares		
Fermentación de manitol	+	-
Fermentación de sacarosa	+	+
Fermentación de glucosa en aerobiosis	+	-
Licuefacción de gelatina	-	-



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	23 / 155

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS:

A) Coagulasa

Staphylococcus aureus produce esta enzima, puede incidir en un mecanismo alternativo, ya sea como una enzima o un activador de un compuesto plasmático para convertir el fibrinógeno en fibrina, lo cual sugiere que la coagulasa es una sustancia similar a la protrombina.

B) Catalasa

Los *Staphylococcus* producen catalasa que convierte al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba de la catalasa diferencia a los estafilococos que son positivos, de los estreptococos, que son negativos.

C) Fosfatasa

Staphylococcus aureus y *Staphylococcus epidermidis* producen esta enzima que rompe la fenolftaleína difosfato produciendo un cambio de color debido a la fenolftaleína liberada que reacciona con un álcali para dar un color rosa brillante.

D) Beta -Lactamasas

Staphylococcus aureus produce estas enzimas que hidrolizan al anillo beta lactámico de la penicilina (penicilinasas) o cefalosporina (cefalosporinasas) aunque son parcialmente activas contra ambos grupos.

E) DNAsas

Staphylococcus aureus y *Staphylococcus epidermidis* las producen, la actividad de la desoxirribonucleasa se correlaciona bien con la actividad de coagulasa. Se producen zonas claras alrededor de las cepas y se coloca azul de toluidina 0.1% se produce un color rosa alrededor del crecimiento de las cepas.

F) Hemolisinas

Staphylococcus aureus produce hemolisinas alfa, beta, gama y delta, siendo la hemolisina beta de mayor importancia por su patogenicidad. La hemolisina beta es una



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	24 / 155

fosfolipasa que presenta propiedades hemolíticas sobre los eritrocitos, produciendo hemólisis beta la cual se observa por un halo transparente alrededor de la colonia.

G) Toxina exfoliativa

Esta toxina de *Staphylococcus aureus* está constituida por lo menos por dos proteínas que producen la descamación generalizada del síndrome estafilocócico de piel escaldada. Hay anticuerpos específicos que protegen al sujeto contra la acción exfoliativa de la toxina.

H) Hialuronidasa o factor de difusión: Degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo facilitando la diseminación de la infección.

Staphylococcus en agar sangre produce beta hemolisis alrededor de la colonia.

Staphylococcus epidermidis en agar sangre no produce hemolisis.

En agar Vogel Johnson, el crecimiento de los gérmenes es inhibido casi totalmente por el telurito. El manitol sirve como sustancia reaccionante para la diferenciación, pues es degradada a ácido por la mayoría de los *Staphylococcus* patógenos. Los *Staphylococcus* patógenos reducen además el telurito de potasio a telurio metálico y en consecuencia producen colonias de color negro.

La formación de ácido se comprueba por el viraje a amarillo que sufre el manitol con rojo de fenol.

MATERIAL Y REACTIVOS

CEPAS: *Staphylococcus aureus*
Staphylococcus epidermidis

MEDIOS: 1 caja agar sal y manitol
1 caja agar S-110
1 caja agar sangre de carnero
1 caja Vogel Johnson

TUBOS: 2 Caldo: Glucosa con rojo fenol
2 Caldo: Manitol con rojo fenol
2 Plasma citratado



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	25 / 155

- Hisopo
- Portaobjetos
- Mechero
- Incubadora

REACTIVOS: Peróxido de Hidrógeno

SERVICIOS: Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

A) FERMENTACIÓN DE MANITOL

Sembrar una caja de agar sal y manitol la mitad con *Staphylococcus aureus* y la otra mitad con *Staphylococcus epidermidis* por estría cruzada. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

B) PRODUCCIÓN DE HEMOLISINAS

Sembrar en agar sangre la mitad con *Staphylococcus aureus* y la otra mitad con *Staphylococcus epidermidis* por estría cruzada. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

C) PRODUCCIÓN DE COAGULASA

En un tubo con plasma citratado, inocular una asada por suspensión de una cepa de *Staphylococcus aureus* y en otro tubo con *Staphylococcus epidermidis*. Incubar durante 1 a 3 horas a 37° C.

D) PRODUCCIÓN DE CATALASA

Tornar una asada de la cepa de *Staphylococcus aureus* y suspender sobre un portaobjeto, adicionarle 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno. Realizar lo mismo con *Staphylococcus epidermidis*.

E) MEDIOS DE CULTIVO DIFERENCIAL Y SELECTIVO

Agar: Vogel Johnson

Sembrar una caja con agar Vogel Jonhson la mitad con *Staphylococcus aureus* y la otra mitad con *Staphylococcus epidermidis* por estría cruzada. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	26 / 155

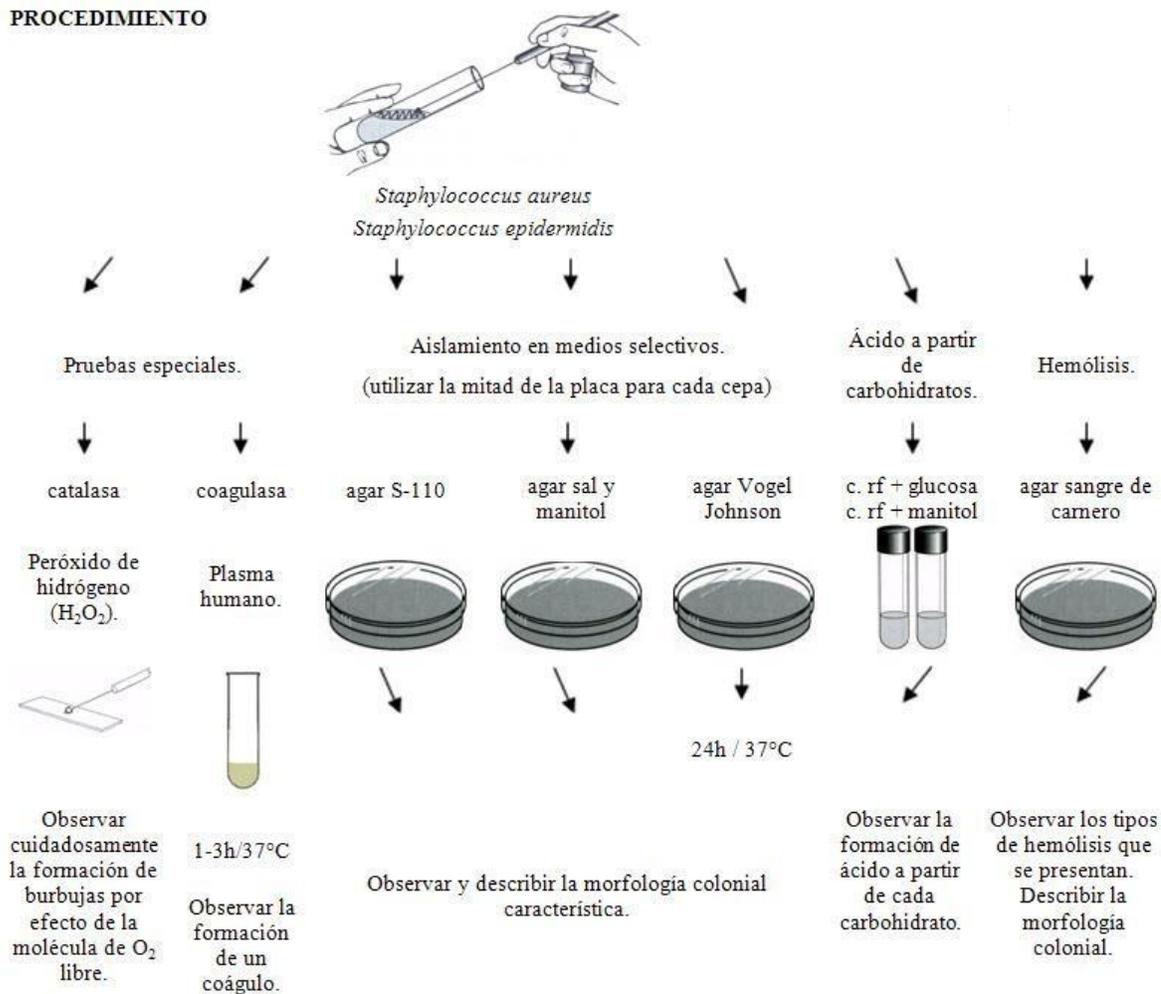
Agar: S-110

Sembrar una caja con agar S-110 la mitad con *Staphylococcus aureus* y la otra mitad con *Staphylococcus epidermidis* por estría cruzada. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

F) PRUEBAS BIOQUÍMICAS

- En un tubo de glucosa con rojo de fenol inocular una asada por agitación de una cepa de *Staphylococcus aureus* y en otro tubo con *Staphylococcus epidermidis*.
- En un tubo de manitol con rojo de fenol inocular una asada por agitación de una cepa de *Staphylococcus aureus* y en otro tubo con *Staphylococcus epidermidis*.

PROCEDIMIENTO





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	27 / 155

RESULTADOS

- De cada una de las cajas de agar sembradas reportar morfología colonial.
- En la caja de agar sal y manitol observar cambio de coloración del medio por efecto de la fermentación del manitol.
- Caja agar Vogel Johnson *Staphylococcus aureus* producen colonias pequeñas negras, con halo amarillo *Staphylococcus epidermidis* colonias pequeñas, negro-grisáceas, sin halo.
- Caja de agar S 110 *Staphylococcus aureus*; Las colonias son lisas, redondas de bordes enteros, cremosas de color blanco porcelana o amarillo. *Staphylococcus epidermidis*; las colonias son lisas, de forma circular con bordes enteros ligeramente irregulares de color blanco.
- Caja de agar sangre; Observar los tipos de Hemolisis.
- En la prueba de coagulasa; observar la formación del coagulo.
- En la prueba de catalasa; esperar ver la formación inmediata de burbujas y reportar la prueba como (+), si no hay burbujeo se reporta (-).
- En las Pruebas Bioquímicas reportar cambio de coloración de rojo a amarillo como (+).

Cuestionario

- 1.- Mencione la etiopatogenia de la celulitis y de la osteomielitis
- 2.- Mencione la importancia que tiene la contaminación de alimentos por *Staphylococcus aureus*
- 3.- Explique cómo actúa la coagulasa producida por *Staphylococcus aureus* y su importancia en la patogenia.
- 4.- Mencione los factores de patogenicidad que produce el *Staphylococcus aureus* en el absceso periapical
- 5.-Describa la conducta a seguir en un paciente que presente un absceso periapical



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	28 / 155

BIBLIOGRAFÍA

1. Arce MAY. Inmunología e inmunopatología oral. México: El manual moderno, S.A. de C.V.; 2009.
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
3. Carrol, K.C ; Stephen.A.M; Mietzner.T; Microbiología médica 27a ed. México: Mc Graw Hill-Interamericana 2016.
4. Engleberg NK, Di Rita VJ, Dermody TS. Mecanismos de las enfermedades microbianas. 5a. ed. Filadelfia: 2013.
5. González FRM, Molina LJ. Microbiología bucal. 4a. ed. México: Méndez editores; 2009.
6. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E: microbiología médica. 25a. ed. México: McGraw Hill interamericana; 2011.
7. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
8. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Inmunología. 8a. ed. España: Elsevier; 2014.
9. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca; 2011.
10. Negroni M. Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2018.
11. Nolte, WA.: Microbiología Odontológica. 3a. ed. México: Interamericana; 1986.
12. Prats G. Microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2017.
13. Ryan JK, Ray CG. Microbiología médica de Sherris. 6a. ed. México: Mc Graw Hill-Interamericana editores; 2017.
14. Spicer WJ. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas: texto y atlas en color. España: Elsevier; 2009.
15. Struthers JK, Westran RP. Bacteriología clínica. Barcelona España: Masson; 2005.
16. Tay. Z.J ; Gutierrez. M; López. R; Molina. J ;Manjarrez. M.E: Microbiología y parasitología clínica. 4a ed. Méndez 2012.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	29 / 155

Práctica No. 3

MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN CARIES DENTAL

OBJETIVO

Proporcionar al alumno el conocimiento de las características metabólicas, fisiológicas y morfológicas de algunos de los microorganismos involucrados en el proceso de caries dental.

Para realizar esta práctica, el alumno deberá revisar previamente lo siguiente:

- 1.- Definición de caries dental.
- 2.- Relación entre *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans* en el proceso de caries dental.
- 3.- Importancia de *Streptococcus mutans* en la formación de placa dentobacteriana.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento profundo de los microorganismos involucrados en la caries dental es de suma importancia para el cirujano dentista ya que se enfrentará diariamente a esta patología y al conocer a estas bacterias podrá aplicar medidas preventivas contra esta enfermedad que es actualmente clasificada como una enfermedad bacteriana, multifactorial y un problema de salud pública mundial.

La caries dental es una enfermedad multifactorial en la cual intervienen factores intrínsecos y extrínsecos, el aspecto microbiológico es uno de los principales factores productores de caries.

La cariología moderna considera que en el desarrollo de caries dental intervienen elementos relativos al hospedero que no se consideraban en la triada inicial de Keyes, entre los que están:

Factores Socioeconómicos	Factores Culturales	Hábitos dietéticos e higiénicos
Anatomía Dental	Saliva	Microorganismos cariogénicos
Respuesta Inmune	Tiempo	

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	30 / 155

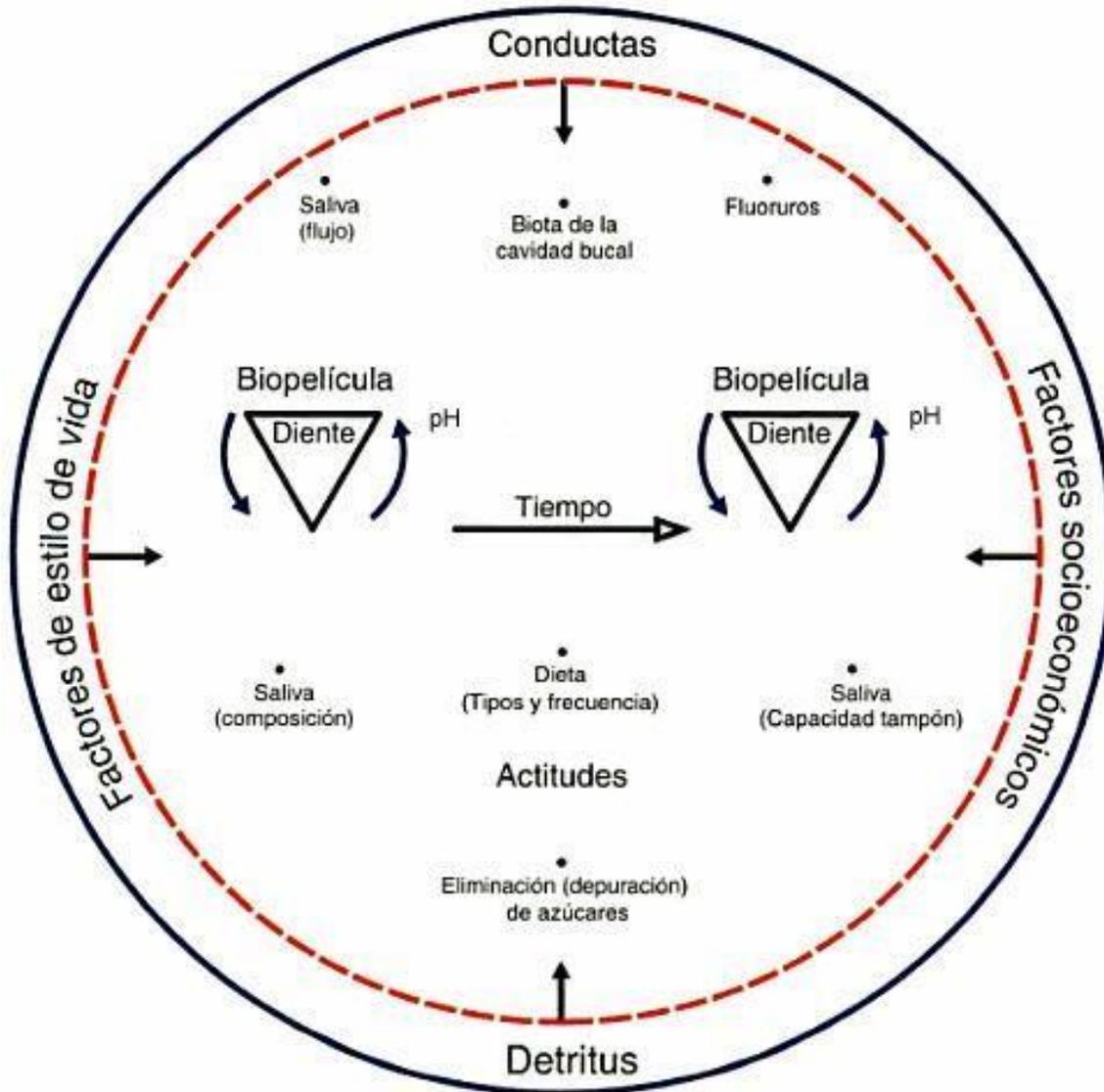


Figura 1. Factores asociados a la etiología de la caries dental. Adaptado de Fejerskov, 2004. • Fuente: Negroni, Microbiología estomatológica. p 248.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	31 / 155

Todos ellos interactúan en el proceso de caries dental como se puede observar en la figura 1 que describe los factores asociados a la etiología de la caries dental.

Como sabemos después del cepillado dental en un lapso no mayor a 2 horas se forma la película adquirida que se encuentra libre de bacterias inicialmente, después son varios los mecanismos que intervienen en la colonización bacteriana inicial de las superficies dentales:

- Colonización primaria (adherencia bacteriana a la película adquirida)
- Colonización secundaria (agregación interbacteriana y multiplicación)

La **colonización primaria** se inicia una vez establecida la película adquirida en la cual comienzan a depositarse las primeras poblaciones bacterianas en forma específica.

En un primer momento, las bacterias colonizadoras son estreptococos del grupo viridans como *Streptococcus mutans* y/o *Streptococcus sanguis*, esto dependerá de la presencia de sacarosa, pues se ha reportado que existen placas dentobacterianas no cariogénicas, es decir sin presencia de *Streptococcus mutans*.

La **colonización secundaria** se divide en dos fases:

1. *Agregación interbacteriana*: El desarrollo de la población bacteriana en la placa en transformación es un proceso progresivo durante el cual la placa aumenta de grosor y complejidad.

En esta etapa el mecanismo de adherencia y adición bacteriana depende exclusivamente de la sacarosa y de la síntesis extracelular de los polímeros de glucosa a partir del desdoblamiento de la sacarosa en glucosa y fructosa, *Streptococcus mutans* produce en presencia de glucosa polímeros adherentes llamados dextranas que permiten la colonización de otros microorganismos, dando paso a la siguiente fase.

2. *Multiplicación*: al principio la población bacteriana está constituida por cocos Grampositivos, transformándose rápidamente en una placa compleja que incluye otros cocos, bacilos y filamentos Grampositivos. Por otra parte las condiciones acidogénicas creadas por los colonizadores primarios facilitan el desarrollo de especies diferentes tales como *Veillonella* y lactobacilos, que prefieren un medio ácido para su desarrollo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	32 / 155

Numerosos estudios han demostrado que *Streptococcus mutans* está relacionado con el inicio de la placa dentobacteriana y su presencia en ella implica cariogenicidad, este microorganismo fue descrito por primera vez por Clarke en 1924, y es parte del grupo viridans donde también están:

- *Streptococcus sanguis*: Involucrado en caries de superficies, puntos y fisuras.
- *Streptococcus salivarius*: Puede producir lesiones semejantes a caries *in vitro*, pero se encuentra en pocas cantidades en la placa dentobacteriana.
- *Streptococcus mitis*: Se encuentra en la placa dentobacteriana.

El género *Lactobacillus* se considera un invasor secundario de la placa dentobacteriana, este microorganismo es un gran productor de ácido láctico y se encuentra entre las bacterias más acidófilas conocidas, también son capaces de producir ácidos a un pH muy bajo (acidúricos) aunque estas características son potencialmente cariogénicas. Los lactobacilos presentan poca afinidad por las superficies dentales y en consecuencia no se le implica en el comienzo de caries del esmalte, sin embargo están implicados en el avance de las lesiones de dentina.

Otros microorganismos como *Neisseria*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Rothia* tienen poco potencial acidógeno y acidotolerante por lo que tienen un bajo potencial cariogénico.

Algunos *Actinomyces* predominan en la placa dental, caries de dentina, cálculo dental y en caries radicular. Éstos se pueden presentar solos o en asociación con otras especies por su capacidad de formar levanas a partir de fructuosa forman ácido butírico y propiónico.

Microbiológicamente los *Streptococcus* del grupo *viridans* han sido aislados de todos los sitios de la boca y comprenden un gran porcentaje de la microbiota normal. Son cocos Grampositivos, de forma esférica u oval, que se agrupan en pares o cadenas, inmóviles, no esporulados, catalasa negativos, aerobios y anaerobios facultativos, al fermentar azúcares producen ácido láctico y fórmico, etanol y bióxido de carbono, con crecimiento óptimo a 37° C.

Al ser cultivados en agar mitis salivarius que es un medio selectivo para este grupo se diferencian fácilmente por presentar colonias altas, convexas, apulvinadas, celestes, mucoides de 0.5 a 1 mm de diámetro, opacas, y tienen aspecto de vidrio esmerilado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	33 / 155

Microbiológicamente los *Lactobacillus* se han aislado de caries activas y profundas son microaerófilos o anaerobios, con forma de bacilos Grampositivos, no esporógenos, generalmente inmóviles, con requerimientos nutricionales complejos, algunas especies producen ácido láctico como producto final de su metabolismo (homofermentativos: *L. acidophylus* y *L. casei*) y otros producen diferentes ácidos orgánicos y gas como productos finales (heterofermentativos: *L. fermentum*, *L. brevis*). Su medio de cultivo selectivo es principalmente Agar Rogosa.

Microbiológicamente los *Actinomyces* son muy comunes en la placa supragingival humana, en caries radicular y en enfermedad periodontal; son bacilos rectos o curvos, pleomórficos, Grampositivos, en ocasiones con células ramificadas, anaerobios, microaerófilos o facultativos, forman microcolonias a las 24 ó 48 horas de cultivo, crecen en agar sangre de carnero como medio enriquecido. Dentro de este grupo se encuentran *A. viscosus*, *A. israelii*, *A. bovis*, *A. naeslundii*, *Arachnia propionica* y *Rothia dentocariosa*.

Pruebas bioquímicas: Son pruebas de metabolismo microbiano que sirven para identificar plenamente el género y la especie de un microorganismo, es la única forma para asegurar qué microorganismo estamos cultivando, por ejemplo: si sembramos en un medio selectivo para *Staphylococcus*, podemos asegurar que lo que crecerá serán microorganismos de este género (*Staphylococcus*) pero no podremos decir la especie hasta no realizar las pruebas bioquímicas. Estas pruebas de metabolismo son muy variadas generalmente se basan en la capacidad de cada especie microbiana para fermentar azúcares, formar gas, producir ácidos, etc.

Teniendo estos resultados, se debe acudir a tablas ya conocidas y que se encuentran en la gran mayoría de los libros de microbiología, en este caso se anexa a esta práctica las tablas necesarias para identificar a los microorganismos que cultivaremos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	34 / 155

MATERIAL Y REACTIVOS

Medios de cultivo:

- 1 placa de agar Mitis Salivarius (SMS).
- 1 placa de agar Rogosa
- 1 placa de agar sangre de carnero al 5% (AS).
- 1 tubo con caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente con caries con 72 horas de incubación a 37°C.
- Hisopo estéril.

Pruebas bioquímicas:

Estreptococos

- 1 tubo de caldo manitol con rojo de fenol (RF)
- 1 tubo con caldo sorbitol con rojo de fenol (RF)
- 1 tubo de caldo nitrato

Lactobacilos

- 1 tubo de caldo nitrato
- 1 tubo de caldo salicina con rojo de fenol
- 1 tubo de caldo sorbitol con rojo de fenol

Catalasa:

- 1 frasco con peróxido de hidrógeno
- 1 portaobjetos

Gram: Equipo para tinción: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina

Mechero e incubadora

SERVICIOS: Agua, luz y gas.

PROCEDIMIENTO

Esta práctica se realiza en dos sesiones:

Primera sesión

A) Estreptococos

- Tomar con un hisopo estéril una muestra del caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente con caries con 72 h de incubación a 37°C y sembrar una placa de agar mitis salivarius por estría cruzada.

Etiquetar la caja e incubar a 37° C por 24 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	35 / 155

B) Lactobacilos

- Tomar con un hisopo estéril una muestra del caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente con caries, con 72 h de incubación a 37°C y sembrar una placa de agar Rogosa por estría cruzada.
- Etiquetar la caja e incubar a 37°C por 24 horas en atmósfera parcial de anaerobiosis.

C) Actinomicetos

- Tomar con un hisopo estéril una muestra del caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente con caries, con 72 h de incubación a 37°C y sembrar una placa de agar sangre de carnero al 5% por estría cruzada.
- Etiquetar por separado e incubar a 37°C por 24 horas en atmósfera parcial de anaerobiosis.

Segunda sesión

A) De la placa de agar Rogosa tomar una colonia y sembrar un tubo con caldo nitrato por agitación.

De esta misma placa tomar una colonia y sembrar un tubo con caldo salicina con rojo de fenol por agitación.

De esta misma placa tomar una colonia y sembrar un tubo con caldo sorbitol con rojo de fenol por agitación.

Etiquetar los 3 tubos e incubar a 37°C por 24 horas.

B) De la placa de agar mitis salivarius tomar una colonia y sembrar un tubo caldo manitol con rojo de fenol por agitación.

De la misma placa tomar una colonia y sembrar un tubo caldo sorbitol con rojo de fenol por agitación.

De la placa de agar mitis salivarius tomar una colonia y sembrar un tubo con caldo nitrato por agitación

Etiquetar estos tubos e incubar a 37°C por 24 horas.

C) Realizar la prueba de catalasa y la tinción de Gram de una colonia característica de cada una de las tres cajas sembradas en la primera parte de esta práctica



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	36 / 155

TINCIÓN DE GRAM

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884. Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales.

La tinción de Gram se basa en realizar primero un extendido de una muestra en una gota de agua colocada sobre un portaobjeto y posteriormente fijarlo al calor con el método de Koch, a este procedimiento se le conoce como "frotis".

REALIZACIÓN DEL FROTIS



Colocar 2 gotas de agua



Con el asa esteril tomar una muestra de microorganismos y mezclarla con el agua



Fijar al calor con ayuda del mechero



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	37 / 155

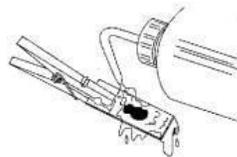
TÉCNICA

Una vez realizado el frotis se siguen los siguientes pasos:

1.- Cubrir superficie del preparado con cristal violeta y dejar en contacto por 1 minuto (colorante primario).



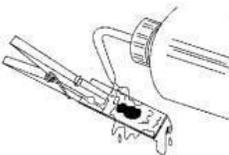
2.- Lavar con agua.



3.- Cubrir la muestra con yodo lugol por 1 minuto (mordiente).



4.- Lavar con agua



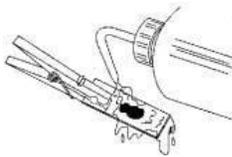


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	38 / 155

5.- Colocar alcohol acetona por 15 segundos (decolorante).



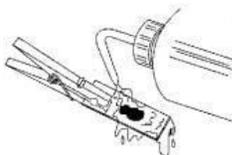
6.- Lavar con agua.



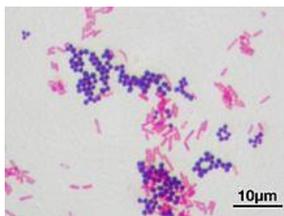
7.- Cubrir la muestra con safranina por 1 minuto (color de contraste).



8.- Lavar con agua.



9.- Dejar secar y observar al microscopio



López JLE, Hernández DM, Colín CCA, Ortega PS, Cerón-GG, Franco CR. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Medigraphic 1(3) 2014 p 10-18



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	39 / 155

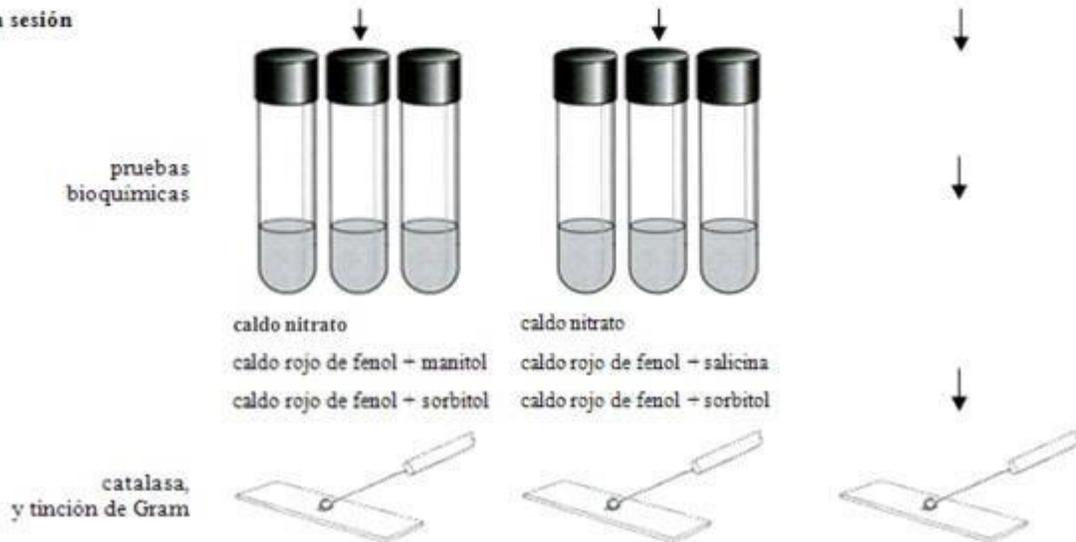
RESULTADOS DE LA PRIMERA Y SEGUNDA SESIÓN

PROCEDIMIENTO

Primera sesión



Segunda sesión





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	40 / 155

Nota: Esta es una práctica en dos sesiones, pero se entregará un solo reporte de prácticas.

- Estreptococos:

Leer la morfología colonial de una colonia aislada en la placa de agar mitis salivarius, reportar los resultados correspondientes a la prueba de catalasa, tinción de Gram y de las pruebas bioquímicas mencionando con base en estos resultados el género y especie de la bacteria cultivada (auxiliarse de la tabla 1).

Para la correcta lectura de la prueba de Caldo Nitrato agregar 2 gotas de cada componente del reactivo de Griess (1 gota de Ácido Sulfanílico y 1 gota de Alfa Naftil Amina) y observar una coloración rosa, que significa una prueba positiva.

- Lactobacilos:

Leer la morfología colonial de una colonia aislada en la placa de agar Rogosa, reportar los resultados correspondientes a la prueba de catalasa, tinción de Gram y de las pruebas bioquímicas mencionando con base en estos resultados el género y especie de la bacteria cultivada (auxiliarse de la tabla 2).

Para la correcta lectura de la prueba de Caldo Nitrato agregar 2 gotas de cada componente del reactivo de Griess (1 gota de Ácido Sulfanílico y 1 gota de Alfa Naftil Amina) y observar una coloración rosa, que significa una prueba positiva.

- Actinomicetos:

Leer la morfología colonial de una colonia aislada en la placa de agar sangre, reportar los resultados correspondientes a la prueba de catalasa y tinción de Gram de las colonias crecidas en este medio.

Material de apoyo:

Tabla 1: Diferenciación de algunos estreptococos del grupo viridans

Tabla 2: Diferenciación de lactobacilos

Cuestionario

- 1.- Explique la patogenia de la caries dental.
- 2.- Mencione la importancia de los microorganismos anaerobios en la producción de caries dental.
- 3.- Explique por qué se agrega sacarosa al agar mitis salivarius
- 4.- Mencione por qué es selectivo el agar Rogosa para los lactobacilos.
- 5.- Defina caries dental dando un enfoque multidisciplinario.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	41 / 155

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
2. Carrol, K.C ; Morse S.A; Mietzner, T,A; Miller, S. Microbiología médica. 27a ed. México Mc Graw Hill; 2016.
3. Levinson W, Jawetz E. Microbiología e inmunología médicas: evaluación, repaso. 8ª ed. México: Manual Moderno; 2006.
4. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
5. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2018.
6. Ruiz. A; Moreno. G; Tratado SEIMC de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica ed. Panamericana 2006.

Tabla 1. Diferenciación de algunos *Streptococcus* del grupo *viridans*

Especie	<i>S. mutans</i>		<i>S. rattus</i>		<i>S.sobrinus</i>		<i>S. crisetus</i>	<i>S. ferus</i>
Serovar	E	F	B	D	G	H	A	C
Determinante antigénico (serovar)	glucosa (β) (1-4)	glucosa (α) (1-4)	galactosa	galactosa (β) (1-6)	galactosa	ND	glucosa (β) (1-6)	ND
Carbohidrato de pared celular	glucosa / ramnosa		galactosa / ramnosa		glucosa / lactosa / ramnosa		glucosa / lactosa / ramnosa	glucosa / ramnosa

Fermentación

Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+/-	+/-	-	+	+
Rafinosa	+	+	+	-	-	-	+	-
Melobiosa	+/-	+	+	-	-	-	+	ND
NH ₃ a partir de arginina	-	-	+	-	-	-	-	-
Crecimiento en bacitracina	+	-	+	-	+	-	-	-



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	42 / 155

Tabla 2

Diferenciación de lactobacilos

Especie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Crecimiento a 15° C	-	-	-	-	+	+	+	D	-	-
Crecimiento a 45° C	+	+	+	+	d	-	-	-	+	-
Gas de glucosa	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Producción de ácido a partir de carbohidratos

Arabinosa	-	-	-	-	-	d	-	-	D	-
Galactosa	+	D	-	+	+	+	w	-	+	-
Lactosa	+	-	d	+	d	+	d	D	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Manitol	-	-	-	+	+	+	d	-	-	D
Molecitoso	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Salicina	+	+	+	d	+	+	-	D	-	-
Sorbitol	-	-	-	l	l	l	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 1.- *Lactobacillus acidophilus*
- 2.- *Lactobacillus jensenii*
- 3.- *Lactobacillus leichmannii*
- 4.- *Lactobacillus salivarius*
- 5.- *Lactobacillus casei*

- 6.- *Lactobacillus plantarum*
- 7.- *Lactobacillus brevis*
- 8.- *Lactobacillus celobiosus*
- 9.- *Lactobacillus fermenti*
- 10.- *Lactobacillus odontolyticus*

+ = 85 a 100% de las cepas son positivas
 - = 15 % de las cepas son positivas
 d = 16 a 84 % de las cepas son positivas
 w = reacción débil
 l = reacción tardía



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	43 / 155

Práctica No. 4

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CARIES DENTAL

OBJETIVO

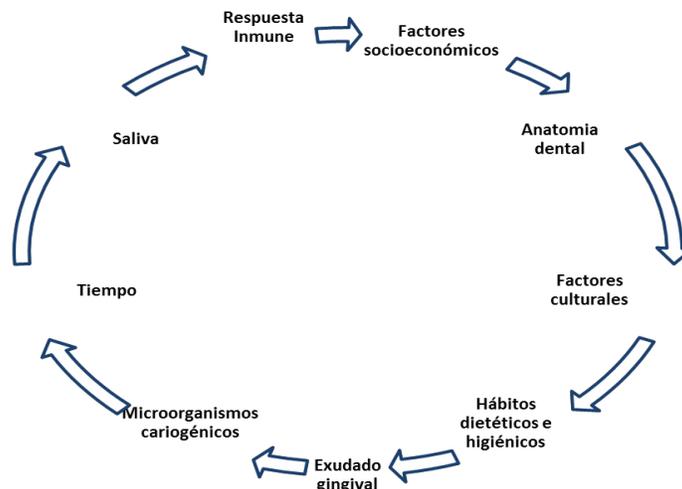
Que el alumno conozca algunas de las pruebas microbiológicas utilizadas para determinar la susceptibilidad de desarrollar caries dental.

Para realizar esta práctica, el alumno deberá revisar previamente lo siguiente:

- 1.- Los principales agentes causales microbianos de la caries dental.
- 2.-Cuál es la relación de la placa dentobacteriana (biofilm) y la caries dental.
- 3.- Cuales son las características metabólicas de los microorganismos cariogénicos

FUNDAMENTO TEÓRICO

La caries dental es una enfermedad multifactorial en la cual intervienen factores intrínsecos y extrínsecos, el aspecto microbiológico es uno de los principales factores productores de caries. La cariología moderna considera que en el desarrollo de la caries intervienen elementos relativos al hospedero o huésped que no se consideraban en la triada inicial de Keyes, entre los que están:





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	44 / 155

Las pruebas de susceptibilidad de caries se han empleado durante muchos años en la investigación odontológica y algunas se han adaptado para el uso rutinario en el consultorio dental. Estas pruebas son útiles para el diagnóstico y pronóstico de la susceptibilidad de desarrollo de caries del individuo. Estas pruebas son capaces de predecir la formación de caries con 3 a 6 meses de anticipación y se basan en la teoría acidogénica de la caries, es decir, en la presencia, número y acción de los microorganismos que metabolizan azúcares como la glucosa. No son pruebas definitivas para el diagnóstico pero sin embargo son útiles en la formación del estudiante, porque le permite obtener conocimientos sobre la importancia que tiene la presencia, el número y las características de los microorganismos de la cavidad oral.

Se han descrito numerosas pruebas de susceptibilidad de caries en la literatura mundial. El hecho más significativo de que se hayan elaborado, nos demuestra que los investigadores están interesados en identificar si existe susceptibilidad individual a la caries y esto sugiere que existe una necesidad muy clara de que se establezca una buena prueba. Actualmente en la práctica clínica es posible medir el nivel de ***Streptococcus mutans*** y de especies de ***Lactobacillus*** en saliva mediante métodos comerciales o de laboratorio sencillos como: Dentocult LB (*Lactobacillus*), Dentocult SM (*Streptococcus*), prueba de Snyder, prueba de fermentación de manitol, determinación de fluido salival y determinación de capacidad amortiguadora salival.

Las primeras cuatro pruebas mencionadas son específicas para cuantificar bacterias (Dentocult LB, Dentocult SM) o para conocer la capacidad de los microorganismos de fermentar azúcares y producir ácidos (prueba de Snyder, prueba de fermentación de manitol).

PRUEBA DE MANITOL

Es una prueba diseñada para detectar *Streptococcus mutans* por su capacidad de fermentar manitol, ya que es el único *Streptococcus* Gram positivo de la cavidad bucal que fermenta este carbohidrato acidificando el medio; este efecto de cambiar el pH se observa por la reacción del púrpura de bromocresol, que es un colorante indicador de pH, el cual en un medio neutro se observa color morado y cuando cambia ese pH neutro por pH ácido el color cambia o vira de morado a amarillo en 24 horas. Esta prueba es solo cualitativa, es decir solo evidencia la presencia de *Streptococcus mutans* pero no indica cuantas bacterias están presentes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	45 / 155

PRUEBA DE SNYDER

La prueba de Snyder sirve para determinar la capacidad de los microorganismos de la saliva para producir ácidos cuando una muestra de la misma es inoculada en un tubo que contiene medio de cultivo con agar rico en glucosa y con indicador de pH, que en este caso el utilizado es el verde de bromocresol.

La glucosa es metabolizada por las bacterias de la saliva generando ácidos, lo que origina una disminución del pH que vira el color verde original del medio hacia amarillo con un cambio de pH neutro a uno ácido, esta prueba es cualitativa, pero se puede obtener el riesgo a caries o a la cantidad aproximada de lactobacilos por la velocidad de cambio de color o acidificación del medio, ya que se debe de leer durante 24, 48 y 72 horas, esto nos indicará que si hay muchas bacterias cariogénicas y gran producción de ácido el cambio sucederá a las 24 horas, si la cantidad de bacterias y el ácido formado por ellas es moderado cambiará a las 48 horas y si es muy bajo en cuanto a bacterias y ácido cambiará a las 72 horas, también puede ser que no cambie lo cual indica que no hay bacterias productoras de ácido en la saliva.

Otras pruebas de interés odontológico son la prueba Dentocult SM, selectiva para *Streptococcus mutans* y la Dentocult LB para *Lactobacillus* las cuales se basan en la densidad de crecimiento en la tira por UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) de saliva. Las cuales nos llevarán a catalogar al paciente con bajo, medio y alto recuento de bacterias y por lo tanto un alto, medio o bajo o nulo riesgo de padecer caries dental.

Todas estas pruebas microbiológicas nos auxilian en la prevención de caries dental y están apoyadas básicamente en la capacidad de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* de fermentar carbohidratos produciendo ácidos los cuales inician la desmineralización del esmalte dental



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	46 / 155

MATERIAL Y REACTIVOS

2 tubos con medio Snyder
2 tubos con caldo Manitol con púrpura de bromocresol
2 tubos de ensaye estériles
2 pipetas estériles de 1 ml
1 gradilla
1 mechero
Baño María
Incubadora.

SERVICIOS: Agua, luz, gas

PROCEDIMIENTO

- Colectar dos muestras de saliva en los tubos estériles, siempre cerca del mechero y levantar índice CPO a cada uno de los donadores de saliva.

- Medio Snyder:

- Colocar los tubos con medio Snyder en baño maría hasta que estos se licúen, dejarlos enfriar hasta una temperatura aproximada de 45° C.
- Tomar 0.5 ml de saliva y colocarla en el tubo con medio Snyder.
- Agitar hasta que la saliva y el medio queden perfectamente mezclados.
- Incubar a 37° C por 24,48 y 72 horas (hasta que cambie de verde a amarillo, pero no más de 72 horas).
- Leer resultados a las 24, 48 y 72 horas.

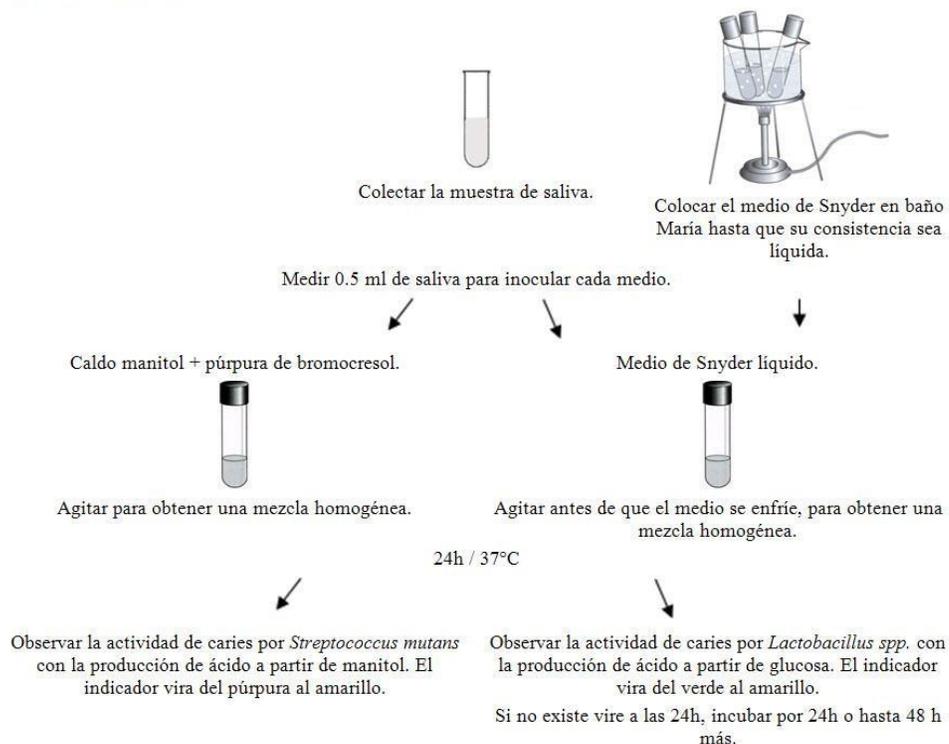
Caldo Manitol

- Tomar 0.5 ml de saliva y colocarlos en el caldo manitol.
- Agitar hasta que la saliva y el medio queden perfectamente mezclados.
- Incubar a 37° C por 24 horas.
- Leer cambio de color.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	47 / 155

PROCEDIMIENTO



RESULTADOS

PRUEBA DE SNYDER

Leer el cambio de color durante tres días comparando el cambio de color con un tubo sin inocular y acudir a la siguiente tabla para analizar los resultados, correlacionar estos con el índice CPO.

Actividad de caries	Tiempo de Incubación		
	24 horas	48 horas	72 horas
Marcada	Positivo	Positivo	Positivo
Moderada	Negativo	Positivo	Positivo
Ligera	Negativo	Negativo	Positivo
Negativa	Negativo	Negativo	Negativo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	48 / 155

PRUEBA DE MANITOL

Leer cambio de color de morado a amarillo a las 24 horas de incubación, si se presenta cambio significa que en la saliva del donador está presente *Streptococcus mutans*. Relacionar este resultado con el índice CPO.

Cuestionario

1. Mencione las medidas preventivas que le daría a un paciente con alto riesgo de caries dental.
2. Explique porque en un paciente con caries activa se encuentra un mayor número de *Lactobacillus*
3. Mencione los factores que intervienen en el proceso carioso además del bacteriano.
4. Mencione los métodos empleados para la inmunización contra la caries dental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
2. Carrol, K.C ; Morse S.A; Mietzner, T,A; Miller, S. Microbiología médica. 27a ed. México Mc Graw Hill; 2016
3. Levison W. Jawetz E. Microbiología e Inmunología autoevaluación y repaso. 7ª. Ed. México: El Manual Moderno;2006.
4. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
5. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca; 2011.
6. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3a. ed. Argentina: Médica panamericana; 2018.
7. Struthers JK, Westran RP. Bacteriología clínica. Bcelona España: Masson; 2005.
8. Tay. Z.J ; Gutierrez. M; López. R; Molina. J ;Manjarrez. M.E: Microbiología y parasitología clínica. 4a ed. Méndez 2012.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	49 / 155

PRÁCTICA No. 5

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *MYCOBACTERIUM* (BAAR+)

OBJETIVO

El alumno estudiará las características del género *Mycobacterium*, enfatizando en las especies patógenas para el hombre.

Describirá el procedimiento para tinción de los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Para realizar la práctica, el alumno revisará previamente lo siguiente:

- 1.- Enfermedades que se encuentran involucradas con este microorganismo.
- 2.- Por qué se utiliza la técnica de Ziehl-Neelsen para esta bacteria.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las infecciones del hombre por micobacterias son básicamente de dos tipos:

- 1) tuberculosis, que suele ser una infección de las vías respiratorias (*M. tuberculosis*), pero que a veces se adquiere por ingestión de productos lácteos (*M. bovis*).
- 2) lepra (*M. leprae*), que es principalmente una enfermedad de la piel.

Ambos padecimientos son crónicos y pueden durar años, ocasionando lesiones destructivas como resultado de la reacción de inmunidad celular contra los microorganismos y sus productos.

Las especies de micobacterias patógenas para el hombre son: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium bovis*.

Son bacterias de forma bacilar ocasionalmente filamentosas, raras veces presenta micelio aunque también se pueden encontrar formas cocoides, son inmóviles, no capsuladas, aerobio estricto, no forma esporas y en cultivos jóvenes son bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	50 / 155

Los bacilos tuberculosos (agente causal de la tuberculosis humana) están caracterizados por su resistencia al alcohol y a los ácidos, por lo tanto son llamados bacilos “ácido alcohol resistentes” (BAAR). Se tiñen con dificultad, pero una vez teñidos resisten la decoloración por los ácidos o por el alcohol, lo cual depende de la integridad de su cubierta de cera.

Se emplea la técnica de Ziehl Neelsen para la identificación de las bacterias. Esta consiste en cubrir el frotis con carbolfucsina de color rojo y se calienta hasta que comienza a emitir vapor durante unos 7 minutos para que el colorante penetre en la bacteria es importante no dejar secar la preparación humectandola con el mismo colorante, lavar con agua, y decolorar con alcohol ácido, lavar con agua y por último se cubre con una solución de azul de metileno durante 30 segundos.

La presencia de pared celular peptidoglicolípida y el tamaño de la micobacteria son dos de las características más importantes usadas para distinguir estos microorganismos de los hongos, ya que contiene significativamente altas concentraciones de lípidos en su pared.

Los microorganismos tienen un crecimiento lento. Su tiempo de desarrollo macroscópico de las colonias es de 2 a 60 días. En el medio Lowenstein-Jensen su agente inhibidor es el verde de malaquita, sus colonias son elevadas, rugosas, de consistencia seca, granular, adherentes no pigmentadas en forma de coliflor.

Aspectos Orales

Es importante tomar en consideración que cerca del 3% de pacientes con tuberculosis de evolución crónica y con neumonía por *Mycobacterium tuberculosis*, presentan manifestaciones orales, que involucran tejidos blandos, ganglios linfáticos y tejidos óseos incluyendo alvéolos de dientes recién extraídos.

La presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en cavidad oral, implica un constante riesgo de infección tanto para el odontólogo como para todo el equipo de salud y convertirse en otra fuente de diseminación de la infección, considerando que un gran número de microorganismos incluyendo éste, puede ser transmitido por saliva y esputo

Debe tomarse en cuenta el riesgo al que se expone el dentista en adquirir la tuberculosis y convertirse en otra fuente de diseminación de la infección.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	51 / 155

El bacilo tuberculoso es capaz de sobrevivir en muchas superficies durante semanas y muestra una gran resistencia a muchos desinfectantes. El principal medio de transmisión de *Mycobacterium tuberculosis* es por gotas de saliva.

En pacientes que presentan una baja resistencia en su respuesta inmune, se observa un aumento de la susceptibilidad a la tuberculosis por ejemplo: en individuos con SIDA, o bajo tratamiento con inmunosupresores.

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepas:

Mycobacterium phlei
Nocardia sp

Colorantes Ziehl – Neelsen:

fucsina de Ziehl Neelsen
alcohol ácido
azul de metileno

Otros:

-asa bacteriológica	-rejilla de alambre con tela de asbesto
-portaobjetos	-recipiente de aluminio, solución desinfectante.
-mechero de Bunsen	-microscopio
-tripie	-aceite de inmersión
-pinzas	

SERVICIOS: agua, luz, gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	52 / 155

PROCEDIMIENTO

- 1.- A partir de un cultivo con *Mycobacterium phlei*, preparar frotis.
- 2.- A partir de un cultivo con *Nocardia sp*, preparar frotis.
- 3.- Fijar ambos frotis al calor con mucha precaución.
- 4.- Teñir con técnica de Ziehl-Neelsen

Después de utilizar el asa, **no esterilizarla directamente al fuego**, colocarla en solución desinfectante.

Tinción de Ziehl-Neelsen

- 1.- Cubrir el frotis con colorante de Ziehl (fucsina básica). Mantenerlo a emisión de vapores durante 7 minutos, procurando que no se seque, adicionando más colorante. Lavar frotis con agua.
- 2.- Decolorar con alcohol ácido. Lavar con agua.
- 3.- Cubrir con azul de metileno durante 30 segundos. Lavar con agua y dejar secar.
- 4.- Observar en el microscopio a 100X (inmersión).

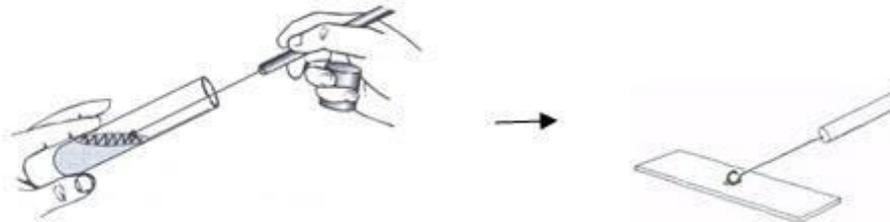


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	53 / 155

PROCEDIMIENTO

Frotis.

- *Mycobacterium phlei*
- *Nocardia sp.*



Esterilización del asa.

- Limpiar el asa bacteriológica



- Flamear el asa.



Tinción.

Cubrir el frotis con fucsina de Ziehl y llevar a emisión de vapores por 7 minutos.



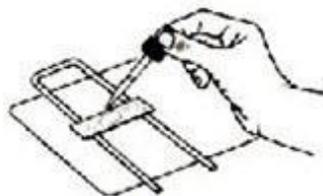
Lavar con agua. ↓

Decolorar con alcohol ácido.



Lavar con agua. ↓

Cubrir con azul de metileno durante 30 segundos.



Lavar con agua y dejar secar.

Observar en el microscopio a 100X (inmersión).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	54 / 155

RESULTADOS

* Observar y describir la morfología microscópica de cada uno de los microorganismos utilizados.

* Los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) deben observarse de una coloración roja.

Cuestionario

- 1.- ¿Cuáles son las características microscópicas bacterioscópicas del género *Mycobacterium*?
- 2.- ¿Cuáles son las características de cultivo de este género?
- 3.- ¿A qué se denomina bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR)?
- 4.- ¿Qué es la baciloscopía?
- 5.- Mencione el riesgo ocupacional del dentista ante un enfermo tuberculoso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
2. Carroll, K.C ; Morse S.A; Mietzner, T.A; Miller, S. Microbiología médica : 27a ed. México Mc Graw Hill; 2016.
3. Negroni, M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica 3a ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2018.
4. Nolte WA. Microbiología odontológica. México: Interamericana; 1986
5. Slots J, Taubman MA and Yankell S: Contemporary oral microbiology and immunology. 3ª ed. Saint Louis: Mosby; 1992.
6. Willett NP and White RR. Essential dental microbiology. Norwalk: Appleton & Lange; 1991



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	55 / 155

Práctica No. 6

MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN PATOLOGIA PULPAR Y ABSCESO DENTAL

OBJETIVO

Que el alumno conozca las características morfológicas y metabólicas de los microorganismos involucrados en la etiología de estas infecciones, así como su aislamiento e identificación.

Para realizar la práctica, el alumno deberá revisar previamente lo siguiente:

1. Conocer las diferentes reacciones pulpares y su clasificación clínica.
2. Definición de absceso dental.
3. Tratamiento de patologías pulpares.
4. Efectos de los factores de virulencia microbianos.

FUNDAMENTO TEORICO

Los microorganismos desempeñan un papel importante en los procesos infecciosos de la pulpa y los tejidos periradiculares, haciendo énfasis que sin ellos no habría trastornos endodónticos, por lo tanto la disminución o eliminación de los microorganismos del sistema de conductos y la prevención de las reinfecciones debe de ser el objetivo principal de todos los procedimientos terapéuticos.

Los dientes con pulpas dañadas pueden preservarse por tratamientos endodónticos cuyo objeto será mantener el canal radicular libre de microorganismos. La adecuada esterilización, trabajo biomecánico, irrigación y obturación del sistema de conductos permitirá la remisión de cualquier infección perirradicular residual y reparará los defectos óseos alrededor de ápice de los dientes tratados.

Las infecciones de la pulpa y la región perirradicular pueden ser producidas por diferentes causas:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	56 / 155

- La caries dental es la causa más común del daño de la pulpa a través de los túbulos dentinarios, ya que la bacterias productoras de ácido los invaden y desmineralizan sus paredes
- Cuando la pulpa está expuesta a la microbiota bucal a través de una cavidad abierta por fracturas, traumatismos, intervención dental o por iatrogenia.
- Por microorganismos que pueden penetrar a la pulpa desde una bolsa periodontal por invasión directa de los conductos accesorios o por el foramen apical.
- Por infección retrógrada por vía hematógena causada por estreptococos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos.

En términos generales se utilizan los datos objetivos y subjetivos para clasificar la patología sospechada, de modo que las denominaciones asignadas representan la presencia de tejido sano o enfermo. Estas clasificaciones resultantes se utilizan para determinar la necesidad de una terapia de conductos.

- **Pulpa normal:** Los dientes con pulpas normales no muestran síntomas espontáneamente.
- **Pulpitis reversible:** Cuando la pulpa está irritada de modo que su estimulación resulta incomoda al paciente pero revierte rápidamente después eliminar el agente irritante.
- **Pulpitis irreversible:**
 - Sintomática. Muestran un dolor intermitente o espontáneo cuando se ven expuestos a cambios rápidos de temperatura (especialmente a estímulos fríos).
 - Asintomática. Producida por caries profundas que no darán ninguna sintomatología, aunque clínica y radiográficamente la caries haya avanzado hasta la pulpa.
- **Necrosis pulpar:** La vascularización pulpar es inexistente y los nervios no son funcionales (pulpa desvitalizada).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	57 / 155

La pulpa como los tejidos perirradiculares de dientes vitales sanos se hayan invariablemente libres de microorganismos. El tejido pulpar reacciona rápidamente con una respuesta inflamatoria frente a distintos irritantes que pueden ser microbianos, mecánicos, químicos, térmicos, eléctricos y radiaciones.

Se define absceso dental como una complicación de la caries, que también puede resultar de un trauma en el diente. Las lesiones en esmalte y dentina permiten que las bacterias infecten la pulpa. La infección puede propagarse desde la raíz del diente hasta el hueso de soporte ocasionando acumulación de pus e inflamación de los tejidos.

Las patologías pulpares y periapicales son unos de los padecimientos que más llevan a los pacientes a acudir a una consulta de urgencia debido a su sintomatología. Es de gran importancia realizar un correcto diagnóstico en este momento para brindar la terapéutica adecuada. Se han realizado muchas investigaciones sobre la flora microbiana de las infecciones del canal radicular encontrando que los microorganismos más frecuentes son estreptococos del grupo viridians y *Staphylococcus aureus* junto con algunos otros géneros aerobios y facultativos.

Con métodos adecuados se ha logrado aislar una considerable flora anaerobia de estas infecciones, predominando los cocos Gram positivos como *Peptococcus*, *Peptoestreptococcus*, *Streptococcus* beta hemolíticos del grupo H y K de Lancefield que juegan un papel importante, ya que se observan rutinariamente en la enfermedad periapical; cocos Gram negativo como *Veillonella*, bacilos Gram positivos como *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Actinobacteria*, *Corynebacterium* y bacilos Gram positivos como *Pophyromonas*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Proteobacterias*, *Espiroquetas* y *Fusobacterium*.

Recientemente se han encontrado otros microorganismos, entre las cuales se encuentran el *Enterococcus* *genus* y *Enterococcus fecalis*, el cual es una bacteria anaerobia facultativa Gram positivos, que frecuentemente infecta canales radiculares y se infiltra en la células inmunológicas, haciéndose presente en las lesiones periapicales, produciendo un proceso inflamatorio en el cual se involucra la lipooxigenasa que genera leucotrienos que activan las células polimorfonucleares.

Estas bacterias anaerobias están condicionadas por el ambiente en la región apical. Muchas de ellas son exigentes y tienen requerimientos muy específicos para el



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	58 / 155

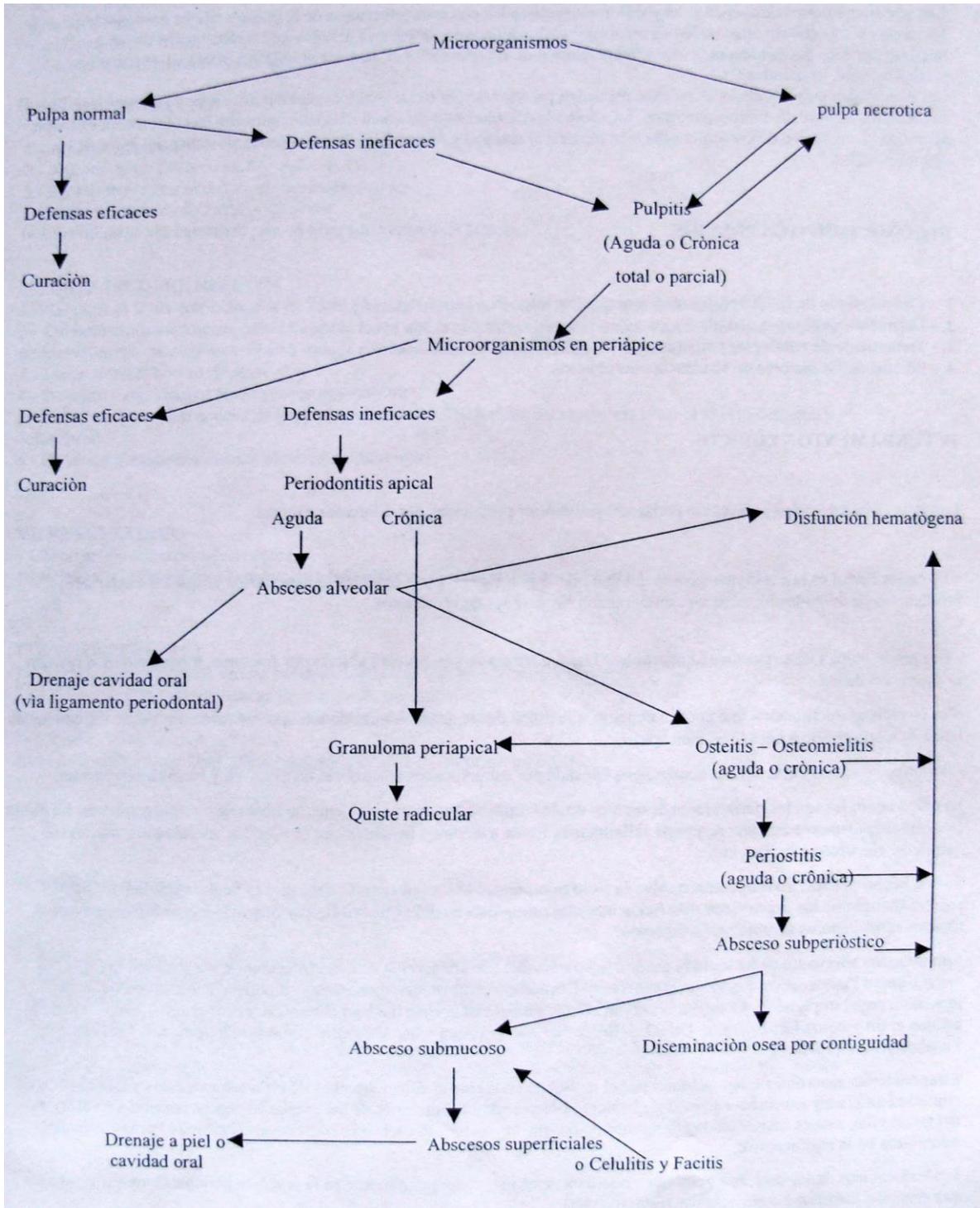
crecimiento obteniendo sus nutrientes de los exudados séricos presentes en el borde del tejido vital, es una de las explicaciones de por qué las bacterias anaerobias constituyen la principal proporción de la microbiota en la región apical.

Las endotoxinas de las bacterias Gram negativas desempeñan un papel importante en la reacción periapical, ya que producen una reacción inflamatoria periapical y resorción ósea.

Las bacterias que utilizan principalmente carbohidratos como fuente de energía como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Neisserias*, se encuentran en exceso, porque no son exigentes y tienen su origen en la parte coronal del conducto de la raíz.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	59 / 155





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	60 / 155

MATERIAL Y REACTIVOS

Muestras bacterianas	1 tubo con caldo BHI (infusión cerebro corazón) con muestra de absceso dentoalveolar 1 tubo con caldo de tioglicolato sembrado con muestra de absceso dentoalveolar
Medios de cultivo	2 placas de agar sangre 1 placa de Vogel Johnson 1 placa de agar Bilis Esculina 1 tubo de plasma humano
Colorantes	1 equipo de Gram
Reactivos	Peróxido de hidrógeno
Otros	Mechero de Bunsen e incubadora

SERVICIOS Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

Esta práctica se lleva a cabo en dos sesiones

PRIMERA SESIÓN

1. Tomar con un hisopo estéril una muestra de caldo BHI con muestra de absceso dentoalveolar y sembrar una placa de agar sangre y la placa de agar Vogel Johnson por estría cruzada, incubar a 37° durante 24 horas.
2. Tomar con un hisopo estéril una muestra de caldo tioglicolato con muestra de absceso dentoalveolar y sembrar una placa de agar sangre y la placa de agar Bilis-Esculina por estría cruzada, incubar en anaerobiosis a 37° durante 24 horas.

SEGUNDA SESIÓN

3. Seleccione colonias bien aisladas de las cuatro placas sembradas en la sesión anterior. Anotar en tablas su morfología colonial y condiciones bajo las que crecieron (aerobiosis y anaerobiosis).
4. A partir de sus cuatro medios de cultivo sembrados haga una selección de las colonias y realice un frotis de cada uno de ellos y tíñalo por la técnica de Gram. Anote los resultados en una tabla.
5. De las colonias sembradas en anaerobiosis, que resulten ser cocos Gram positivos, hacer prueba de catalasa.
6. Si obtiene una colonia de estafilococos en el medio de Vogel Johnson, hacer prueba de catalasa y coagulasa.

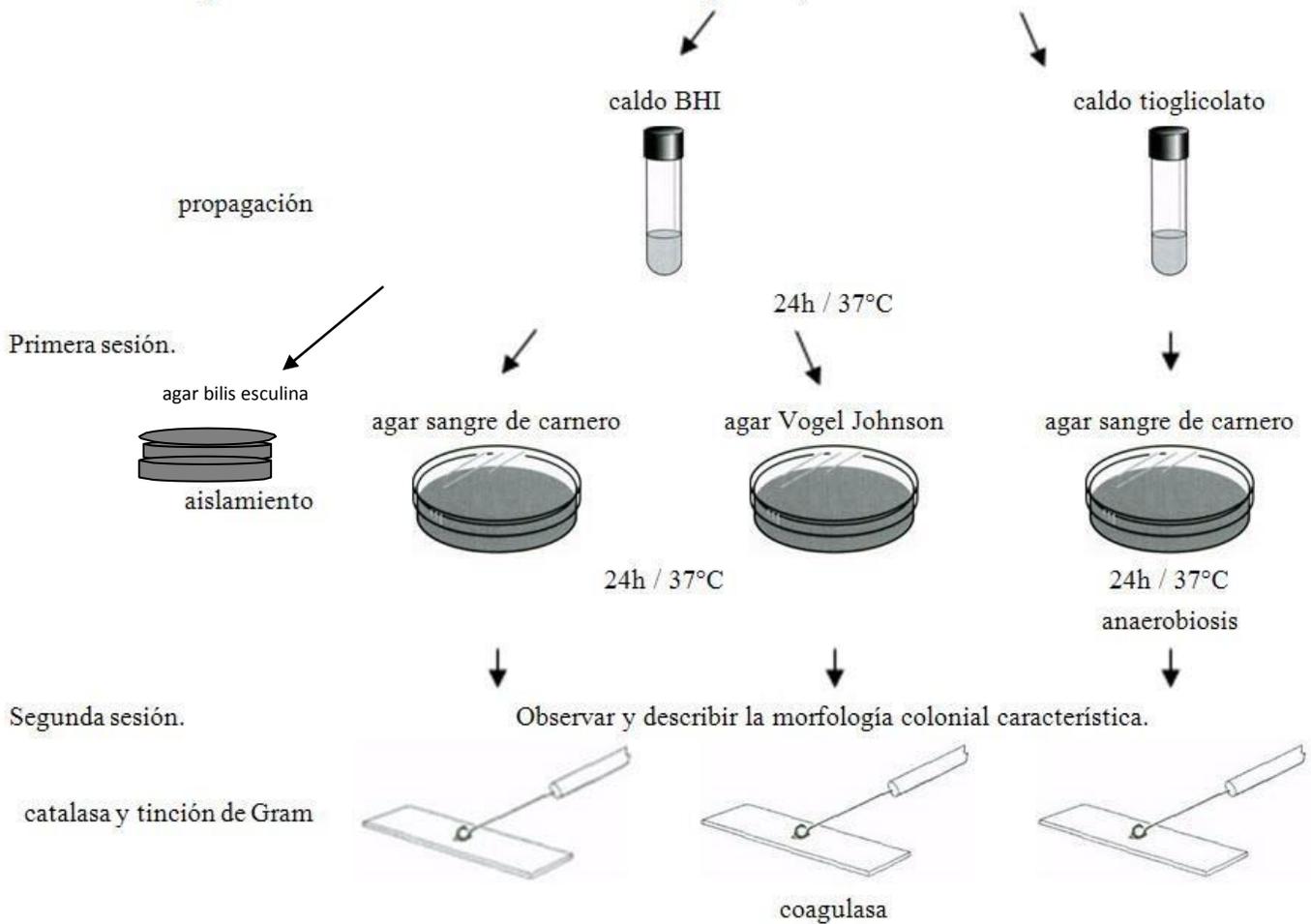


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	61 / 155

PROCEDIMIENTO

Previo a la sesión práctica.

Tomar muestra de la porción purulenta e inocular en los medios.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	62 / 155

RESULTADOS

Anotar en las tablas su morfología colonial, requerimientos de oxígeno, tipo de hemólisis, morfología microscópica, Gram, prueba de catalasa y coagulasa. De las colonias sembradas en anaerobiosis, que resulten ser cocos Gram positivos reportar como posible peptoestreptococcus, a las que resulten ser cocos Gram negativos, reportar como sospechosos de veillonella, a los bacilos Gram positivos reportar como posibles bacilos difteroides o lactobacillus, y a los bacilos Gram negativos como posibles porphyromonas o prevotella.

Cuestionario

1. ¿Qué microorganismos son los más frecuentemente aislados de infecciones de pulpa y absceso dental?
2. Explique ¿para qué se utiliza el medio de tioglicolato?
3. Mencione tres factores de virulencia producidos por bacterias asociadas a abscesos dentoalveolares y diga su función.
4. Describa las características clínicas e histológicas del absceso dentoalveolar.
5. ¿Qué importancia tiene el control bacteriológico en los tratamientos del sistema de conductos?

BIBLIOGRAFÍA

1. Hargreaves KM, Berman LH. Las vías de la pulpa. 11a ed. Estados Unidos: Elsevier; 2016.
2. González FRM, Molina LJ. Microbiología bucal. 4a. ed. México: Méndez editores; 2009.
3. Guven K, Huma O, Gulcin A, Mugem G, Omour G, Kadriye S, Bekir S. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. Journal of Endodontics. 2011;37(3): 376-381.
4. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
5. Marsh PD, Martin MV. Microbiología Oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca; 2011.
6. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2018.
7. Nolte WA. Microbiología Odontológica. 3a. ed. México: Interamericana; 1986.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	63 / 155

8. Willet NP, White RR. Essential dental microbiology. Ed. Appleton Lange. USA. 1991.
9. Zeyun M, Yixing W, Xiaofei Z, Chengfei Z, Shenglin L, Lijian J, Ya S, Markus H. Role of polymorphonuclear neutrophils in the clearance of *Enterococcus faecalis* derived from saliva and infected root canals. Journal of Endodontics. 2011;37(3):346-352.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	64 / 155

Prácticas No. 7 Y 8

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

OBJETIVO

Que el alumno conozca los principales géneros microbianos involucrados en el desarrollo de la enfermedad periodontal, así como las características fisiológicas y condiciones de cultivo que permiten el aislamiento de estos microorganismos.

Para realizar la práctica, el alumno deberá revisar previamente los siguientes temas

- 1.- Definición de placa dentobacteriana y cálculo dental
- 2.- Definición de enfermedad periodontal
- 3.- Clasificación de periodontitis
- 4.- Tratamiento de la enfermedad periodontal

FUNDAMENTO TEÓRICO

La principal función del periodonto consiste en unir el diente con el ligamento óseo de los maxilares y mantener la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. El periodonto es también conocido como aparato de inserción o tejido de sostén de los dientes, constituye una unidad de desarrollo biológico y funcional que se modifica con la edad, estado sistémico y medio ambiente bucal.

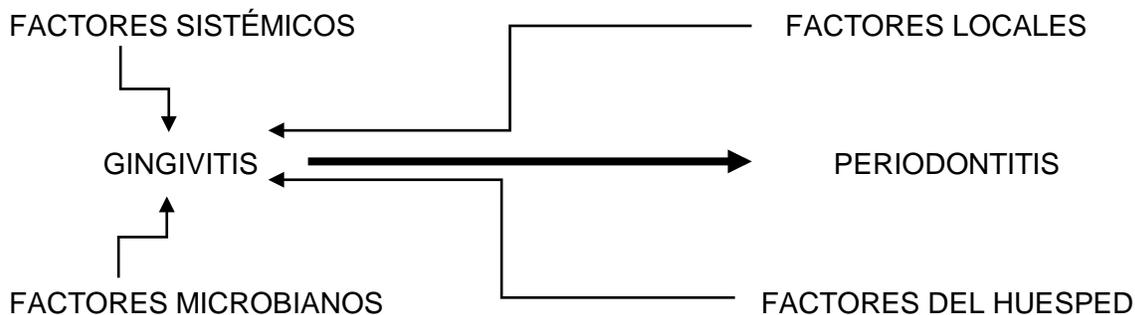
Se denomina periodonto a los tejidos que revisten y soportan al diente incluyendo a la encía, mucosa alveolar, cemento, ligamento periodontal, hueso alveolar y de soporte. El periodonto se forma con los tejidos de soporte y protección del diente dividiéndose en dos partes: la encía cuya función principal es proteger los tejidos subyacentes, y el aparato de inserción, compuesto de ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar.

La gingivitis es la inflamación de la encía. La periodontitis es la inflamación de los tejidos que rodean al diente. Por lo general un cambio progresivamente destructivo lleva a la pérdida del ligamento y hueso alveolar, por una extensión de la inflamación de la encía al ligamento y hueso adyacente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	65 / 155

La diferencia entre gingivitis y periodontitis tiene un contenido clínico y anatómico más que microbiológico. Desde un punto de vista anatómico, se produce periodontitis cuando la agresión bacteriana es capaz de generar una lesión de las fibras más coronales del ligamento periodontal, o fibras transeptales, con afección y destrucción de los tejidos de soporte del diente. No todos los individuos con gingivitis progresan a una periodontitis. Para que esto ocurra, es preciso que intervengan una serie de factores, que pueden esquematizarse así:



Los más importantes con respecto al área microbiológica son los factores microbianos, es decir, la placa, el cálculo y la microbiota oral, los factores locales del huésped a nivel del periodonto en forma de hiper-respuesta donde pueden intervenir las hipersensibilidades tipo I, III y IV, y la hiperactivación del complemento por la vía alterna y las células fagocíticas que llevan a cabo una fagocitosis excesiva o hipo-respuesta donde la respuesta del huésped se encuentra por debajo de los límites normales y por lo tanto existe una falta de control microbiano y de sus factores de virulencia.

En 1963 Løe y Silness argumentaron que la placa dentobacteriana ya sea supra o subgingival, era el agente etiológico responsable de la gingivitis y la periodontitis. Sin embargo, la presencia de placa dentobacteriana o de cálculo no indica que exista enfermedad periodontal.

La gingivitis no tratada conduce a una periodontitis. Las observaciones clínicas junto con la investigación microbiológica básica han permitido una clasificación descriptiva de varias



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	66 / 155

formas de periodontitis: Antiguamente, la clasificación de la Periodontitis reconocía muchísimos tipos, pero desde 1999 se simplificó. Ahora, podemos distinguir dos grandes clases, y aunque hay más, son las más importantes: *Periodontitis crónica* y *Periodontitis agresiva*.

La periodontitis es una enfermedad destructiva que afecta con mayor frecuencia a los adultos. La periodontitis crónica es la más común y se caracteriza por ser de evolución lenta. La formación de bolsas periodontales y la reabsorción del hueso alveolar pueden demorar años y el tiempo que transcurre en que se inicia la enfermedad y en que se llega a perder un diente, puede llegar a contarse en décadas. En todo caso, esto no significa que la periodontitis crónica no pueda pasar por períodos de mayor actividad y rapidez en la destrucción.

La cavidad bucal forma un complejo ecosistema compuesto por más de 700 especies bacterianas. Generalmente los géneros *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* y *Actinomyces* representan más del 80% de toda la flora cultivable. En la etiología de las enfermedades periodontales cabe destacar por frecuencia y la importancia de sus complicaciones, una serie de especies como son *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Tannerella forsythensis*.

PERIODONTITIS AGRESIVA

A diferencia de la patología anterior, la Periodontitis Agresiva se caracteriza por ser de muy rápida evolución en la destrucción de los tejidos y porque el tiempo que transcurre desde su inicio hasta la pérdida del diente, puede ser muy breve. La velocidad de su avance es lo que determina su gravedad.

Aunque la prevalencia de este tipo de periodontitis es baja, puede atacar a los niños y adolescentes siendo su comienzo alrededor de la pubertad, afectando primordialmente los primeros molares e incisivos. Se observa una discrepancia entre la gravedad de la destrucción periodontal y la escasez en la cantidad de placa y signos de inflamación.

El término de “periodontitis juvenil” fue sustituido por el de “periodontitis agresiva” como fue descrito por la Academia Americana de Periodoncia a finales de 1999.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	67 / 155

La forma localizada y generalizada de periodontitis agresiva se caracteriza por rápida pérdida de inserción y de soporte óseo. En la periodontitis agresiva intervienen diferentes factores etiológicos, entre ellos genéticos, ya que los antecedentes familiares sugieren una predisposición genética asociada al cromosoma X, microbiológicos e inmunológicos.

El agente etiológico responsable de este tipo de periodontitis más frecuentemente reportado por la literatura es el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sin embargo hay estudios donde predominaron las *Porphyromonas gingivalis*. Se han identificado varios microorganismos anaerobios Gram-negativos involucrados en la patogenia de la periodontitis agresiva, entre ellos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium sp.*, *Treponema denticola*, virus de Epstein Barr y citomegalovirus. Un gran número de bacterias parece estar asociado más a la bolsa periodontal que al surco gingival sano. Al inspeccionar las propiedades biológicas de estos organismos, es aparente que poseen propiedad destructiva. No puede decirse que alguna bacteria específica sea el agente etológico de estas enfermedades. Se sabe que las bacterias viven en estrecha relación por lo que han sido agrupadas en complejos bacterianos en base a su naturaleza y relación.

El *Aggregatibacter* pertenece a la familia *Pasteurellacea*, es un cocobacilo de 0.4-0.5x1.0-1.5 μm , no móvil, no esporulado, capsulado, con fimbrias, anaerobio facultativo que desarrolla mejor en condiciones de anaerobiosis. Su pared celular presenta las llamadas endotoxinas o lipopolisacaridos típico de una bacteria Gram negativa. Al presentar fimbrias, vesículas, así como producir un material amorfo extracelular proteico, es como puede adherirse a las células huésped. Siendo esta adherencia el primer paso de todo proceso infeccioso. Dentro de sus factores de virulencia encontramos: leucotoxina, toxina de distensión citoletal, endotoxina, proteínas unidas a los receptores Fc, proteína similar a GROE₁, colagenasa, citotoxinas, epiteliotoxinas, alteraciones locales inmunitarias, bacteriocinas, adhesinas, invasinas e inhibidor de quimiotaxis.

La propiedad de sinergismo en infecciones producidas por estreptococos anaerobios orales se ha examinado, y la enzima bacteriana hialuronidasa, se ha demostrado que es un intermediario en el proceso sinergista. Se ha descrito una gran variedad de enzimas asociadas con bacterias del surco gingival que son capaces de degradar un sustrato que es un componente del huésped y así alterar o destruir los componentes tisulares del huésped. (Ver tabla I)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	68 / 155

Tabla 1

Tipo de bacterias	Enzimas producidas	Sustratos
Estafilococo	Hialuronidasa, coagulasa, gelatinasa	Ac. hialurónico, plasma, gelatina
Estreptococo	Hialuronidasa, estreptocinasa, estreptodornasa, hemolisinas, β -glucuronidasa	Acido hialurónico, fibrina, fibrinógeno, nucleoproteínas, eritrocitos, uniones glucorónicas
Coryneformes:	Hialuronidasa, condroitin sulfatasa	Ácido hialurónico, arilsulfatos
Fusobacterias	Proteasas, sulfatasas	Proteínas, arilsulfatos
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Colagenasa, epiteliotoxinas, endotoxina	Colágena, epitelio, endotelio.
Cocos Gram (-)	Proteasas, neuramidasa	Proteínas, ácido siálico.

Un diagnóstico temprano de la periodontitis agresiva mejora su pronóstico, que de por sí es reservado.

MATERIAL Y REACTIVOS

Muestras bacterianas:

- 1 tubo con muestra de cálculo dental en caldo tioglicolato.
- 1 paquete con hisopos estériles

Medios de cultivo:

- 1 placa de agar sangre
- 1 placa de agar sangre de carnero al 5% con kanamicina, hemina y menadiona.

Pruebas bioquímicas:

- 2 tubos con caldo rojo fenol + lactosa
- 2 tubos con caldo rojo de fenol + manitol
- 2 tubos con caldo rojo de fenol + sacarosa
- 1 tubo con gelatina nutritiva
- 1 tubo con caldo nitrato

Reactivos:

- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Ácido sulfanílico



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	69 / 155

Solución alfa-naftilamina

Colorantes:

1 equipo de Gram

Portaobjetos

Cámara de anaerobiosis

SERVICIOS: Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

Esta práctica se realizará en 2 sesiones

PRIMERA SESIÓN

1. Tomar con un hisopo estéril muestra de caldo tioglicolato con muestra de cálculo dental, y sembrar en estría cruzada la caja de agar sangre e incubar en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 a 48 hrs. y refrigerar.
2. Tomar con un hisopo estéril muestra de caldo tioglicolato con muestra de cálculo dental, y sembrar en estría cruzada la caja de agar sangre con kanamicina, hemina y menadiona, incubar en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 a 48 horas y refrigerar.

SEGUNDA SESIÓN

1. Seleccionar colonias aisladas de las 2 placas sembradas y anotar su morfología colonial.
2. De las colonias seleccionadas hacer un frotis de cada una de las cajas y teñirlos por la técnica de Gram, anotar los resultados y ver la tabla 2.
3. Elegir colonias con morfología típica y tipo de Gram correspondiente a las descritas en la tabla 2 para inocular las pruebas bioquímicas de la siguiente manera:
 - A partir de la caja agar sangre con kanamicina, hemina y menadiona, inocular colonias aisladas en lactosa, manitol, sacarosa y gelatina.
 - A partir de la caja de agar sangre inocular colonias aisladas en manitol, sacarosa, lactosa y nitratos.
4. Realizar prueba de catalasa de cada una de las cajas en un portaobjetos colocar una gota de peróxido de hidrógeno agregar una azada de la colonia a probar.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	70 / 155

PROCEDIMIENTO

Previo a la sesión práctica.

Tomar muestra de cálculo subgingival e inocular en el medio.

propagación

caldo tioglicolato enriquecido



24h / 37°C

Primera sesión.

agar sangre de carnero (ASC)

ASC + kanamicina + hemina + menadiona

aislamiento



24h / 37°C

24h / 37°C anaerobiosis

Segunda sesión.

Observar y describir la morfología colonial característica.

catalasa y tinción de Gram



pruebas bioquímicas



caldo rojo de fenol + manitol
 caldo rojo de fenol + sacarosa
 caldo nitrato

caldo rojo de fenol + manitol
 caldo rojo de fenol + sacarosa
 gelatina nutritiva

Caldo rojo de fenol + lactosa 24h / 37°C Caldo rojo de fenol + lactosa

Observar producción de ácido a partir de los carbohidratos.

Agregar los reactivos para determinar la reducción de nitrato.

Refrigerar por 20 minutos la gelatina nutritiva para determinar la producción de gelatinasa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	71 / 155

Tabla 2

Medio de cultivo	Forma / Tipo de Gram	Género probable
Agar sangre con kanamicina, hemina y menadiona	Bacilos Gram negativos	<i>Porphyromona melaninogenica</i>
Agar sangre	Bacilos Gram positivos	<i>Actinomyces</i> <i>Rothia</i> <i>Arachnia</i>

Tabla 3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Actinomyces*, *Arachnia* y *Rothia*

	1	2	3	4	5	6	7	8
Crecimiento anaerobiosis	+	+	+	+	+	+	+	-
Catalasa	-	-	-	-	+	-	-	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltosa	+	+	+	+	+	-	+	+
Manitol	w	+	-	-	-	d	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de NO ₃	+	d	-	+	+	+	-	+
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-	-	-	-	+

1. *Arachnia propionica*
2. *Actinomyces israelii*
3. *Actinomyces bovis*
4. *Actinomyces naeslundii*
5. *Actinomyces viscosus*
6. *Actinomyces odontolyticus*
7. *Actinomyces eriksonii*
8. *Rothia dentocerosa*

Tabla 4. PARA IDENTIFICACIÓN DE Bacteroides *Porphyromona*, *Prevotella*, *Eikenella* y *Veillonella*

	1	2	3	4
Crecimiento en anaerobiosis	+	-	+	-
Catalasa	+	-	-	d
Oxidasa	+	-	+	d
Lactosa	d	+	-	-
Manitol	+	+	-	-
Sacarosa	-	+	-	-
Hemolisis	-	+	-	-
Pigmento negro	-	+	-	-

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
2. *Porphyromona melaninogenica*
3. *Eikenella corrodens*
4. *Veillonella sp.*
5. (d- diferentes reacciones)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	72 / 155

RESULTADOS

- Prueba de catalasa: si hay presencia de burbujas la prueba es positiva.
- Fermentación de carbohidratos: esta se observa por el cambio de color del indicador rojo fenol o amarillo indicando producción de ácido.
- Reducción de nitratos a nitritos: añadir al tubo que contiene caldo nitrato 2 gotas de ácido sulfanílico y 2 gotas de α -naftilamina, el desarrollo de un color rosa indica que la prueba es positiva.
- Interpretar los resultados según las tablas de identificación correspondientes- y reportar género y especie probablemente aislados. Tabla 3 y 4.

Cuestionario

- Diga ¿qué factores de patogenicidad posee *Porphyromona melalinogénica* y como intervienen en la patogénesis de la enfermedad periodontal?
- Explique la destrucción tisular de la enfermedad periodontal causada por reacciones de hipersensibilidad.
- Describa los procesos agudos y crónicos de la gingivitis.
- Haga un esquema en el que se representen todos los factores que intervienen en la etiología de la enfermedad periodontal.
- Defina enfermedad periodontal según sus propias palabras.
- Explique ¿para que se utilizan las pruebas bioquímicas?

BIBLIOGRAFÍA

- Amerian Academy of Periodontology. Consensus Report: Chronic Periodontitis. Annals. 1999;4(1):pp 38.
- Armitage G. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. Periodontology 2000. 2010;53:70–88.
- Armitage G. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Annals of Periodontology. 1999;4:1-6.
- Donald P, Moromi H, Martínez E, Mendoza A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Patógeno importante en la periodontitis. Odontología Sanmarquina. 2010; 13(2): 42-45.
- Fine D, Markowitz K, Furgang D and Velliyagounder K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an Early Colonizer of Oral Tissues: Epithelium as a Reservoir? Journal of Clinical Microbiology. 2010;48(12):4464–4473.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	73 / 155

6. Glossary of Periodontal Terms. The American Academy of Periodontology. 4th ed. 2001; pag 22.
7. Haffajee A, Socransky S. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology* 2000. 2005;38:9–12.
8. Henderson B, Nair S, Ward J, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annual Reviews of Microbiology*. 2003;57:29–55
9. Henderson B, Ward J, Ready J. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontology* 2000. 2010; 54:78–105.
10. Henderson B, Wilson M, Sharp L and Warda J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal Medical Microbiology*. Society for General Microbiology. 2002; 51: 1013–1020.
11. Mombelli A., Casagni F., Madianos P.N. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *Journal Clinical Periodontology*. 2002; 29(Suppl. 3): 10–21.
12. Newman M, Takei H, Carranza F. Carranza's Clinical Periodontology. 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.
13. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus Haraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006; 56: 2135-2146.
14. Parameter on Aggressive Periodontitis. Parameters of Care Supplement. *Journal of Periodontology* 2000;71:867-869.
15. Periasamy S, Kolenbrander PE, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Builds mutualistic Biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infection and Immunity*. 2009;77(9):3542- 51.
16. Ruiz M, Burguera L, Rodríguez A. Periodontitis agresiva causada por *Porphyromonas gingivalis*. Reporte de un caso. *MedULA Revista de la Facultad de Medicina*. Venezuela. 2003;12 (1-4).
17. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *Journal Clinical Periodontology*. 2008; 35 (Suppl. 8): 346–361.
18. Socransky S, Haffajee A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005;38:135–187.
19. Stanley C, Holt & Jeffrey I, Eversole. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the red complex, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2005;38:72–122.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	74 / 155

Práctica No. 9

IDENTIFICACIÓN DE CANDIDA EN CAVIDAD ORAL

OBJETIVO

Que el alumno conozca las características morfológicas y fisiológicas del agente causal de la candidiasis bucal.

Para realizarla, deberá revisar previamente los siguientes temas:

1. Morfología de *Candida albicans*.
2. Patologías de cavidad oral involucradas con este género.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida* en especial *Candida albicans*, presenta una variedad de cuadros clínicos, afecta en particular las mucosas (boca, vagina, etc), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones e intestino. Es conocida con otros nombres moniliasis, muguet, algodoncillo ó blastomicosis. Diversas especies de *Candida* son parte de la flora normal, se presenta desde los primeros días del nacimiento y tienen una gran predilección por las mucosas.

Se encuentran en el tracto gastrointestinal habitando boca, laringe, faringe, intestino delgado y grueso. Su número en estos sitios se puede incrementar por múltiples factores como inmunodepresión, uso prolongado de antibióticos, cambios hormonales, uso de prótesis, enfermedades metabólicas, etc.

Considerada como clásica enfermedad por un hongo oportunista, requiere por fuerza de factores predisponentes como el desequilibrio de la flora normal o bien por enfermedades o procesos que influyen en la respuesta inmune.

Las diversas especies de *Candida*, se desarrollan en el medio de Sabouraud y agar papa dextrosa entre 48 y 72 horas a 25 ° C. Sus colonias son cremosas, opacas, lisas (por lo general), en algunas especies es posible ver formación de seudomicelio o micelio. Todas las especies se



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO

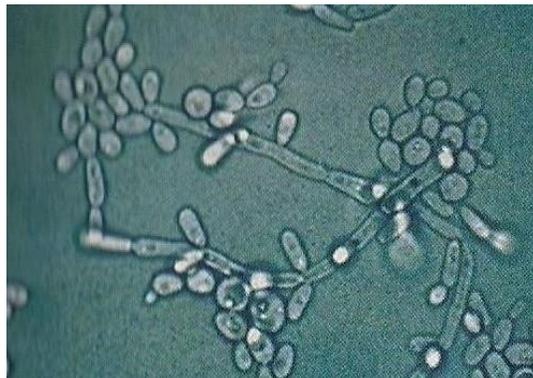


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	75 / 155

reproducen por blastoconidios o gemación. Se tiñen muy bien con azul de algodón, PAS y Wright.

Para la observación de tubo germinativo la prueba se realiza en suero, esta prueba es presuntiva de *C. albicans* y de *C. dubliniensis*, es importante remarcar que después del periodo de incubación que es de 3 a 3 ½ horas, todas las especies de *Candida* pueden formar tubos germinativos, excepto *C. glabrata*.

La producción de pseudomicelio y clamidoconidios, se lleva a cabo en medios simples como agar harina de maíz, agar papa zanahoria a los que se les agrega 1% de tween 80.



Regezi J., Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology



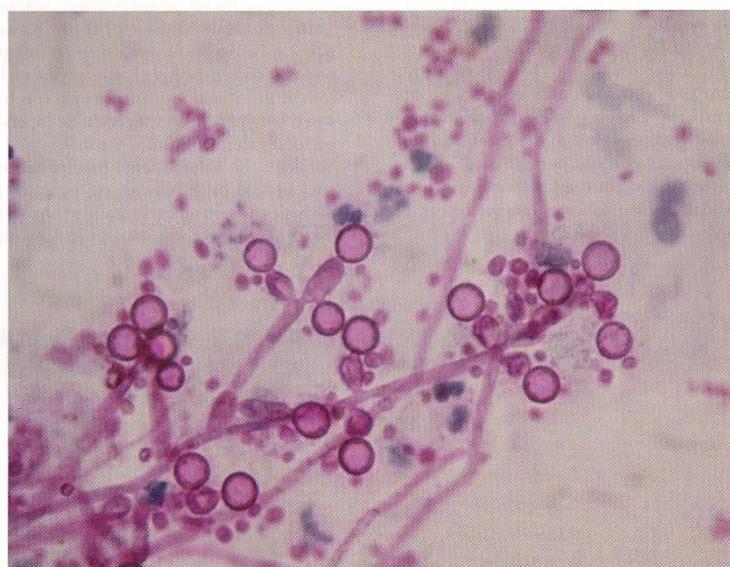
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	76 / 155

Tabla. Infecciones por Candida y sus factores predisponentes¹¹

Tipo de candidosis	Factor predisponente y/o factor de riesgo
<i>Orofaringea</i>	Edad avanzada, uso de prótesis dentales, diabetes mellitus, antibióticos radioterapia (cáncer de cabeza y cuello), corticosteroides inhalados y sistémicos quimioterapia citotóxica, infección por VIH, enfermedades hematológicas trasplante de órganos sólidos o de células madre.
<i>Esofágica</i>	Corticoesteroides sistémicos, SIDA, cáncer, trasplantes de órganos sólidos o de células madre.
<i>Gastrointestinal</i>	Cáncer, cirugías.
<i>Vulvovaginal</i>	Anticonceptivos orales, embarazo, diabetes mellitus, corticoesteroides sistémicos uso de antibióticos.
<i>Cutánea onicomycosis</i>	Humedad local y oclusión, diabetes, inmersión de las manos en agua, enfermedad vascular periférica.
<i>Cutánea congénita</i>	Cuerpo extraño intrauterino
<i>Mucocutánea Crónica</i>	Defectos en linfocitos T y procesos endocrinológicos
<i>Tracto urinario</i>	Catéter urinario infestado contaminado, obstrucción urinaria, procedimientos de tracto urinario, diabetes mellitus
<i>Neumonía</i>	Aspiración, inmunosupresión, trasplantes.
<i>Endocarditis</i>	Cirugía mayor, endocarditis bacteriana o enfermedad cardiaca valvular, abuso de drogas intravenosas, catéter venoso central.
<i>Pericarditis</i>	Cirugía torácica, inmunosupresión.
<i>Sistema nervioso central</i>	Cirugía del SNC, desviación ventriculoperitoneal, cirugía ocular.
<i>Ocular</i>	Trauma, esteroides tópicos, cirugías.
<i>Abdominal</i>	Perforación recurrente, cirugía abdominal repetitiva, pancreatitis, diálisis peritonea ambulatoria continua.
<i>Hematógena</i>	Trasplante de órganos sólidos, colonización, uso prolongado de antibióticos cirugía abdominal, cuidados intensivos, nutrición parenteral total, hemodiálisis inmunosupresión, trasplante de hígado o de células madre.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	77 / 155



Clamidoconideos en Agar Harina de Maíz, Regezi J., Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology

Para confirmar a que especie pertenece *Candida* hay que realizar pruebas bioquímicas como son la fermentación (zimograma) y la asimilación (auxonograma) de carbohidratos.

Tabla. Fermentación y asimilación de carbohidratos del género *Candida*

Especie	Zimograma						Auxonograma					
	Glucosa	Galactosa	Manosa	Sacarosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Galactosa	Manosa	Sacarosa	Lactosa	Rafinosa
<i>albicans</i>	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>dubliniensis</i>	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>famata</i>	V	-	-	-	-	V	+	+	+	+	V	+
<i>glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>guilliermondii</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>krusei</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>parapsilosis</i>	+	V	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>tropicalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	78 / 155

Es viable valorar otras características que nos ayudan en la tipificación, como son resistencia a la cicloheximida (actidione), reducción de sales de tetrazolio, utilización de nitratos y presencia de ureasa. La resistencia al actidione puede medirse con el crecimiento en medio de Sabouraud más antibiótico, la prueba de tetrazolio es importante para completar la identificación. La presencia de ureasa y la utilización de nitratos dan oportunidad para distinguirla de otros géneros de levaduras como *Cryptococcus*.

En 1995 Sullivan y Col. Identificaron una especie nueva o emergente a la que denominaron *C. dubliniensis*, en pacientes con VIH-SIDA la mayoría resistentes al fluconazol; actualmente esta especie se ha aislado también en diabéticos y otros grupos.

Esta especie es muy similar a *C. albicans* (casi gemela) y sólo se distinguía por secuencialización genética, hoy en día existen pruebas fenotípicas para diferenciarlas.

MATERIAL Y REACTIVOS

CEPAS: *Candida albicans*

- 1 caja agar dextrosa Sabouraud.
- 1 caja agar harina de maíz sembrada con *Candida albicans*
- 1 caja agar base levadura – nitrógeno + púrpura de bromocresol
- 1 tubo Durham con caldo levadura y dextrosa + púrpura de bromocresol
- 1 tubo Durham con caldo levadura y maltosa + púrpura de bromocresol
- 1 tubo Durham con caldo levadura y sacarosa + púrpura de bromocresol
- 1 tubo Durham con caldo levadura y lactosa + púrpura de bromocresol
- 1 tubo Durham con caldo levadura y galactosa + púrpura de bromocresol
- 1 tubo Durham con caldo levadura y trehalosa + púrpura de bromocresol
- 1 tubo Durham con caldo levadura y manitol + púrpura de bromocresol
- 1 tubo con 10 discos estériles de papel filtro
- 1 tubo 0.5 ml. de suero humano
- 1 tubo con solución al 20% de dextrosa estéril
- 1 tubo con solución al 20% de maltosa estéril
- 1 tubo con solución al 20% de sacarosa estéril
- 1 tubo con solución al 20% de lactosa estéril
- 1 tubo con solución al 20% de galactosa estéril
- 1 tubo con solución al 20% trehalosa estéril
- 1 tubo con solución al 20% manitol estéril
- 1 Preparación fija de *Candida albicans* en tinción de Gram
- 1 pinza
- 1 microscopio



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	79 / 155

Incubadora

SERVICIOS: Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

I. PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE TUBOS GERMINATIVOS

1. A partir de una colonia aislada en medio Sabouraud o del tubo inclinado, tomar un pequeño inóculo y suspenderlo en un tubo que contiene 0.5 ml de suero humano.
2. Incubar a 37°C por más de tres horas.

II. PRODUCCIÓN DE CLAMIDOSPORAS EN AGAR HARINA DE MAÍZ

1. Abrir la caja de Petri con agar harina de maíz sembrada con *Candida albicans* y colocar un cubreobjetos.
2. Observar la presencia de clamidosporas con el objetivo de 10x y 40x, teniendo cuidado de no introducir el objetivo en el agar.

III. PRUEBA DE ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS.

1. En una placa de agar base levadura – nitrógeno + púrpura de bromocresol, sembrar por estría masiva con *C. albicans*.
2. Colocar discos de papel filtro impregnados con las soluciones de carbohidratos a probar, distribuirlos lo más separado posible en la placa.
3. Incubar por 24 horas a 37°C.

IV. PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS.

1. A cada tubo Durham con caldo levadura – nitrógeno + púrpura de bromocresol + carbohidrato, inocular por agitación con *C. albicans* utilizada para la prueba de asimilación.
2. Incubar de 24 a 48 horas a 37°C.

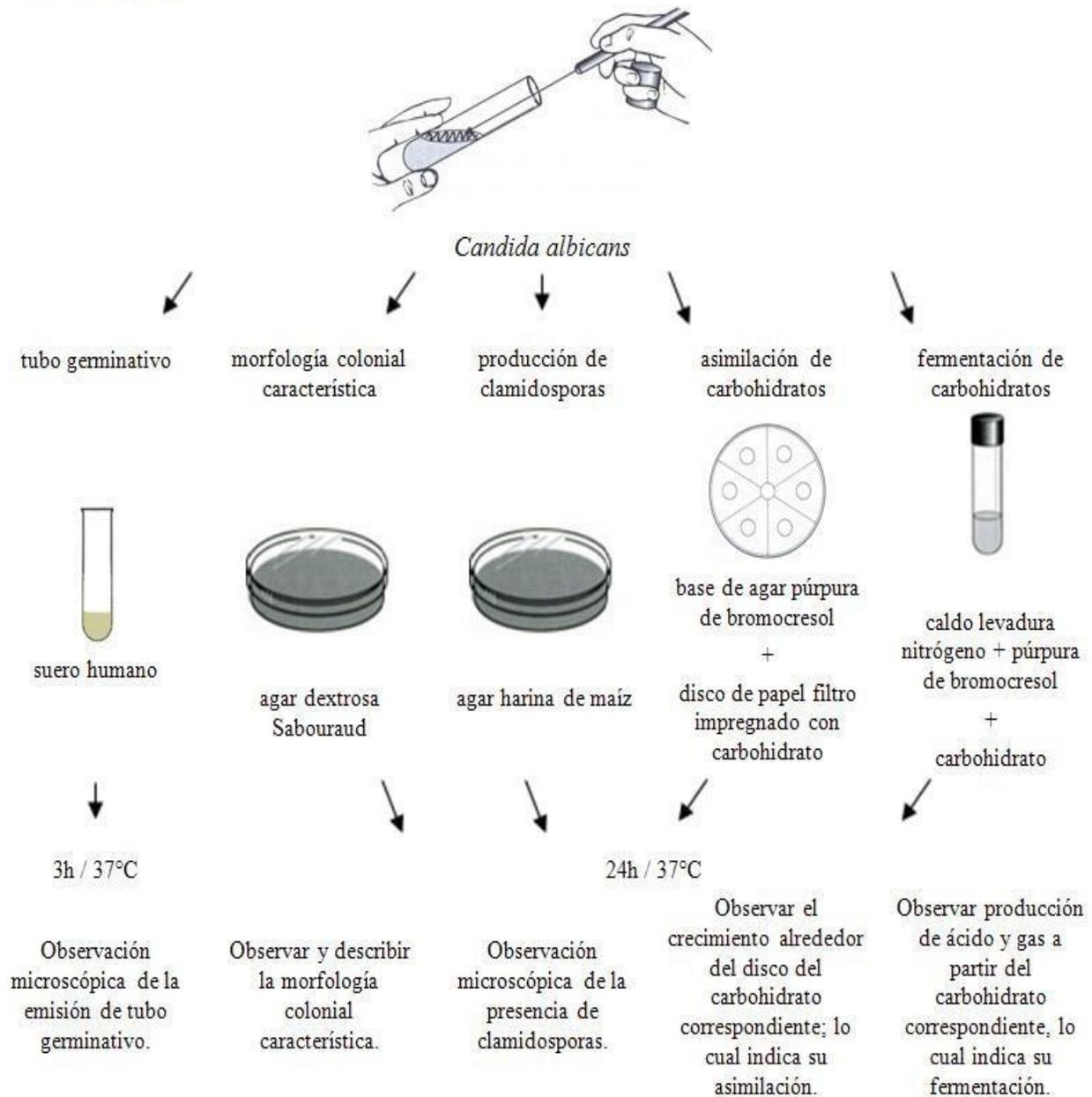
V. TINCION DE GRAM

1. Observar al microscopio en 100X la preparación fija de *Candida albicans*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	80 / 155

PROCEDIMIENTO





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	81 / 155

RESULTADOS

I TUBO GERMINATIVO.

Colocar en un portaobjeto una gota de suero incubado, colocando encima un cubreobjeto y examinar a seco débil para la presencia de tubo germinativo, observándose un apéndice largo del tamaño de 2 a 3 veces la célula levaduriforme.

II. AGAR HARINA DE MAÍZ.

Observar la formación de clamidosporas de pared gruesa al final de las pseudohifas.

III AGAR BASE LEVADURA – NITROGENO + PURPURA DE BROMOCRESOL.

El cambio de color del medio y/o la presencia de crecimiento alrededor del disco indica la asimilación del carbohidrato contenido en el disco.

IV. TUBO DURHAM CON CALDO LEVADURA – NITROGENO + PURPURA DE BROMOCRESOL.

Después de incubación, observar los tubos formando una burbuja para producción de gas (fermentación, zinograma) la cual es el único criterio de fermentación de carbohidratos, ya que el vire del indicador puede ser solo asimilación del carbohidrato (auxonograma).

V. TINCIÓN DE GRAM

Observar la morfología microscópica de *Candida albicans*.

Cuestionario

1. Explique el fundamento de las pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos por *Cándida*.
2. Explique el cuadro clínico de la candidiasis eritematosa oral y mencione la edad en la que se presenta con más frecuencia.
3. Investigue la epidemiología en México de la candidiasis oral.
4. Explique el término oportunista y cuáles son los factores predisponentes de las candidiasis.
5. Investigue el tratamiento de la candidiasis local y sistémica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	82 / 155

BIBLIOGRAFIA

1. Bagán SJV. Medicina bucal. 2a. ed. España: Medicina oral S.L.; 2010
2. Castellanos SJL, Díaz GLM, Gay ZO. Medicina en odontología: manejo dental de pacientes con enfermedades sistémicas. 2a. ed. México: El Manual Moderno; 2015.
3. Engleberg NK, Di Rita VJ, Dermody TS. Mecanismos de las enfermedades microbianas. 5a. ed. Filadelfia: 2013.
4. González FRM, Molina LJ. Microbiología bucal. 4a. ed. México: Méndez editores; 2009.
5. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
6. Lira LA, Rondanelli BM. Atlas de patología de los maxilares. España: Ripano; 2011.
7. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca; 2011.
8. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2018.
9. Neville B. Oral and Maxillofacial Pathology. 4a ed. USA: Saunders Company; 2015.
10. Nolte, WA.: Microbiología Odontológica. 3a. ed. México: Interamericana; 1986.
11. Regezi J., Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology: Clinical pathologic correlations. 7a. ed. México: Interamericana; 2017.
12. Sapp, J. Philip. Patología oral y maxilofacial contemporánea. 2a. ed. Madrid:Elsevier Harcourt; 2005.
13. Scully C, Paes AO, Bagán J, Diz DP, Mosqueda TA. Oral medicine and pathology at a glance. USA: Wiley-Blackwell; 2017.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	83 / 155

Práctica No. 10

ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE ALGUNAS SOLUCIONES DE USO COMÚN EN LA PRÁCTICA ODONTOLÓGICA

OBJETIVO

Que el alumno conozca la acción antimicrobiana de algunas soluciones de uso común en el consultorio dental.

Para realizarla, el alumno deberá contar con los siguientes conocimientos previos:

- 1.- Conocimientos básicos de Microbiología.
- 2.- Conocer la solución empleada en la práctica y su uso terapéutico.
- 3.- Conocer sus indicaciones y contraindicaciones.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En la profesión odontológica, existen soluciones de uso cotidiano tanto con fines terapéuticos como antisépticos los cuáles actúan inhibiendo el crecimiento o la multiplicación bacteriana, de tal manera que es importante conocer la concentración y dosis adecuada para cada caso en particular.

Dentro de las soluciones odontológicas utilizadas con mayor frecuencia mencionaremos las siguientes:

Eugenol

El eugenol es un derivado del fenol, sedativo y antiséptico que puede emplearse en operatoria dental y en conductoterapia, especialmente recomendado en dientes con reacción periapical dolorosa, también es conocido como tóxico y es capaz de producir trombosis de los vasos sanguíneos al ser aplicado directamente sobre el tejido pulpar. Tiene propiedades anestésicas por lo que es usado para aliviar los síntomas de pulpitis dolorosas, esta propiedad surge de su capacidad para bloquear la transmisión de los potenciales de acción en las fibras nerviosas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	84 / 155

Es un líquido incoloro a amarillo claro, que oscurece con el tiempo, constituye el principal componente del aceite de clavo, es poco soluble en agua, pero es soluble en alcohol, glicerina y disolventes orgánicos.

Es quizás el medicamento más difundido y versátil de la terapéutica odontológica, se utiliza asociado con polvos como óxido de zinc para materiales de restauración temporal, cementos quirúrgicos, pastas de impresión, etc.

Peróxido de hidrógeno

La solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 2.5% o agua oxigenada común, es un buen germicida, es sumamente inestable por lo que no se usa puro sino en solución acuosa a distintas concentraciones. El peróxido de hidrógeno al descomponerse libera oxígeno formando burbujas, lo cual le da una acción antibacteriana muy útil en la irrigación de conductos radiculares, alternado con hipoclorito de sodio al 2% es una combinación recomendada por Auerbach y Stewart. Es importante mencionar que el oxígeno liberado por el peróxido en el interior del conducto podría ser causa de molestias periapicales.

La forma más comúnmente usada es la solución al 3%, se presenta como un líquido transparente, incoloro con un leve olor a ozono y sabor ligeramente acre. Su reacción es débilmente ácida se descompone formando agua y oxígeno formando burbujas, en presencia de reductores o enzimas peroxidasas. Es un antibacteriano relativamente débil y de corta acción, debido a la rápida liberación de oxígeno en presencia de materia orgánica. Su eficacia es mayor sobre microorganismos anaerobios, se utiliza para desinfectar heridas y para irrigar conductos pulpares infectados aunque se ha visto que descalcifica los tejidos dentarios.

Hipoclorito de sodio

Es muy soluble en agua y relativamente inestable. En endodoncia se utilizan soluciones del 2% para la irrigación de conductos y a su gran actividad antiséptica se añade la liberación de oxígeno producida cuando se alterna con el peróxido de hidrógeno durante la irrigación.

Al igual que con otros fármacos, el hipoclorito se recomienda usarlo a menores concentraciones que las que se empleaban antes y la más recomendable es la solución



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	85 / 155

acuosa al 1% por ser menos tóxica y mejor tolerada, ya que se ha demostrado que in vitro el hipoclorito de sodio al 5% es más destructivo para los tejidos vitales que para los microbios, mientras que el hipoclorito de sodio al 0.5% a 1% disuelve el tejido necrótico pero no el tejido vital.

En otro estudio se encontró que el hipoclorito de sodio al 3% resultaba óptimo para disolver tejidos fijados con paramonoclorofenol o formaldehído.

También se utiliza para inactivar los virus de la hepatitis B y el del VIH.

Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio es el medicamento por excelencia para el tratamiento de la pulpa dentaria a la que protege. Se le emplea en la pulpotomía, tiene su acción en la resorción interna, en la rizogénesis y otros tratamientos. El hidróxido de calcio es un polvo fino, blanco, empleado especialmente en operatoria dental y endodoncia. Fue Herman que en el año 1920 lo introdujo como pasta, desde entonces hasta ahora sus usos son múltiples.

En operatoria se emplea en la protección pulpar indirecta y directa. El hidróxido de calcio actúa sobre los microorganismos que quedaron en la dentina después de la preparación cavitaria, destruyéndolos y promoviendo que la pulpa elabore dentina secundaria como defensa. Posee un pH fuertemente alcalino, esto explica por que es tan bactericida y que en su presencia mueran hasta las esporas.

El hidróxido de calcio es también muy útil en la protección pulpar directa o herida pulpar, cuando el profesional en su intento de eliminar la última capa de dentina realiza una exposición accidental de la pulpa; al poner en contacto la pulpa expuesta con el hidróxido de calcio se forma una capa de necrosis superficial que aísla la pulpa y la induce a formar una barrera cálcica protectora que a las cuatro o seis semanas se hace evidente en la radiografía.

El hidróxido de calcio es el medicamento de elección como tratamiento temporal, empleándolo con agua destilada ó líquido anestésico. El vehículo preferido es agua destilada sin olvidar que existen también otras soluciones, lo importante es que el hidróxido de calcio actúa siempre en un medio acuoso debido a que en seco no hidroliza.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	86 / 155

En 1917 Tronstad y Col. Comprobaron que la colocación del hidróxido de calcio en el conducto tiene una influencia activa en la transformación del pH ácido de los tejidos en alcalino. Un estudio comparativo de Byston y Col. Demostró que el uso de Hidróxido de calcio elimina eficazmente todos los microorganismos de los conductos radiculares infectados cuando la cura temporaria permanece de 3 a 5 días.

Formocresol.

Es un medicamento bactericida inespecífico muy efectivo contra microorganismos aeróbicos y anaeróbicos de los conductos radiculares.

Es un aldehído que está constituido por formaldehído (19%) un clásico fijador de tejidos y potente agente antimicrobiano, el cual es mutagénico y carcinogénico a grandes dosis, cresol que es antimicrobiano (35%), glicerina (15%) y agua destilada. Es un líquido oleoso que tiene un olor picante, por la presencia de formalina (la formalina es un desinfectante poderoso que se combina con albúmina para formar una substancia insoluble y sin descomposición). Se trata de un antiséptico muy empleado en endodoncia, especialmente en las pulpotomías de dientes primarios, a pesar de la controversia acerca de su potencial carcinogénico y mutagénico.

Paramonoclorofenol alcanforado.

El paramonoclorofenol (PMNF) es un compuesto fenólico extensamente usado como medicación intracanal, tiene fuerte efecto antibacteriano in vitro pero in vivo no ha mostrado ser efectivo.

Presenta una doble función antiséptica, basada en la función fenólica y en la presencia del ion cloro, liberado con lentitud durante el uso. El alcanfor, con el que se asocia, además de servir como vehículo, disminuye la acción irritante del derivado fenólico.

El PMNF es volátil, su acción es a distancia y cuando aplicado en bolita de algodón en la cámara pulpar es rápidamente perdido especialmente cuando entra en contacto con los fluidos de los tejidos. Si el PMNF no es efectivo en este período, las bacterias sobreviven y pueden, multiplicarse dentro de los sistemas de canales radiculares.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	87 / 155

Clorhexidina

La Clorhexidina: Es un antiséptico de indicación profesional en la práctica odontológica, está indicada como antiséptico de uso tópico para las lesiones leves de la mucosa bucal, también es usado en el tratamiento de la gingivitis y periodontitis y la prevención de infecciones locales y sistémicas en intervenciones como operatoria o cirugía bucal.

Las presentaciones más comunes de la clorhexidina para su uso en odontología son colutorios en varias concentraciones (por ejemplo al 0.2%, 0.12% y 0.10 %), así como también en forma de geles, spray y pastas dentales.

La clorhexidina posee carga positiva, así que tiene afinidad por estructuras que se encuentran cargadas negativamente. Los tejidos dentarios y componentes peri-dentarios (mucosa bucal, película dental, mucina salival) se encuentran con carga negativa, es así como la clorhexidina se une a estas estructuras, y se libera al medio bucal por 6 a 8 horas posterior a su aplicación, lo que se llama sustantividad.

Las bacterias también tienen carga negativa, de tal modo que la clorhexidina también se une a ellas en la pared bacteriana, que es una estructura vital para la vida de los microorganismos. En primera instancia este antiséptico es bactericida (produce la muerte de las bacterias). En segunda instancia, a una concentración más baja (debido a la sustantividad, la concentración va bajando paulatinamente) es bacteriostático, es decir no produce la muerte a las bacterias, pero impide su reproducción; las bacterias envejecen y mueren sin dejar descendencia.

Vera, Benavides, Moreno y Romero (2012), mencionan que una desventaja de este irrigante, es la formación de un **precipitado de color café-anaranjado altamente tóxico conocido como para-cloro-anilina** cuando se combina con hipoclorito de sodio (carcinogénico) o cuando permanece en el conducto radicular por periodos de 14 días o mas a 37° C.

Su uso debe ser por periodos cortos para evitar la pigmentación de los dientes.

Solución electrolizada de superoxidación con ph neutro al 0.0015%.

OXORAL® ANTISÉPTICO BUCAL. **Información proporcionada por el fabricante.**

Es una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro a 0.0015% (15 ppm) de Cl activo, con un amplio espectro antimicrobiano que incluye bacterias grampositivas y



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	88 / 155

gramnegativas, virus y hongos, eliminándolos en 30 segundos con rapidez y eficacia. Útil en la prevención y tratamiento de los procesos infecciosos de la cavidad bucal, y en las intervenciones quirúrgicas odontológicas. Indicaciones terapéuticas: oxoral® antiséptico bucal es un coadyuvante necesario en tratamientos odontológicos como gingivitis, periodontitis, úlceras, estomatitis, candidiasis, queilitis, sialadenitis.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Cepas: *Staphylococcus aureus*
Streptococcus mutans
Escherichia coli
- Medios de cultivo: 3 cajas con agar Mueller Hinton o Soya Trypticaseina
- Material: 1 asa bacteriológica
1 tubo con discos de papel filtro estéril
Mechero de bunsen
- Soluciones: Eugenol
Clorhexidina en solución al 0.12% o en gel al 0.2%
Hipoclorito de sodio al 1%
Hipoclorito de sodio al 2% (ViarZoni-T)
Peróxido de hidrógeno comercial (11 vol.)
Hidróxido de calcio + agua destilada
Solución de superoxidación con pH neutro (Oxoral)
Suero fisiológico
Paramonoclorofenol Alcanforado
Formocresol
- Incubadora

SERVICIOS: Agua, luz, gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	89 / 155

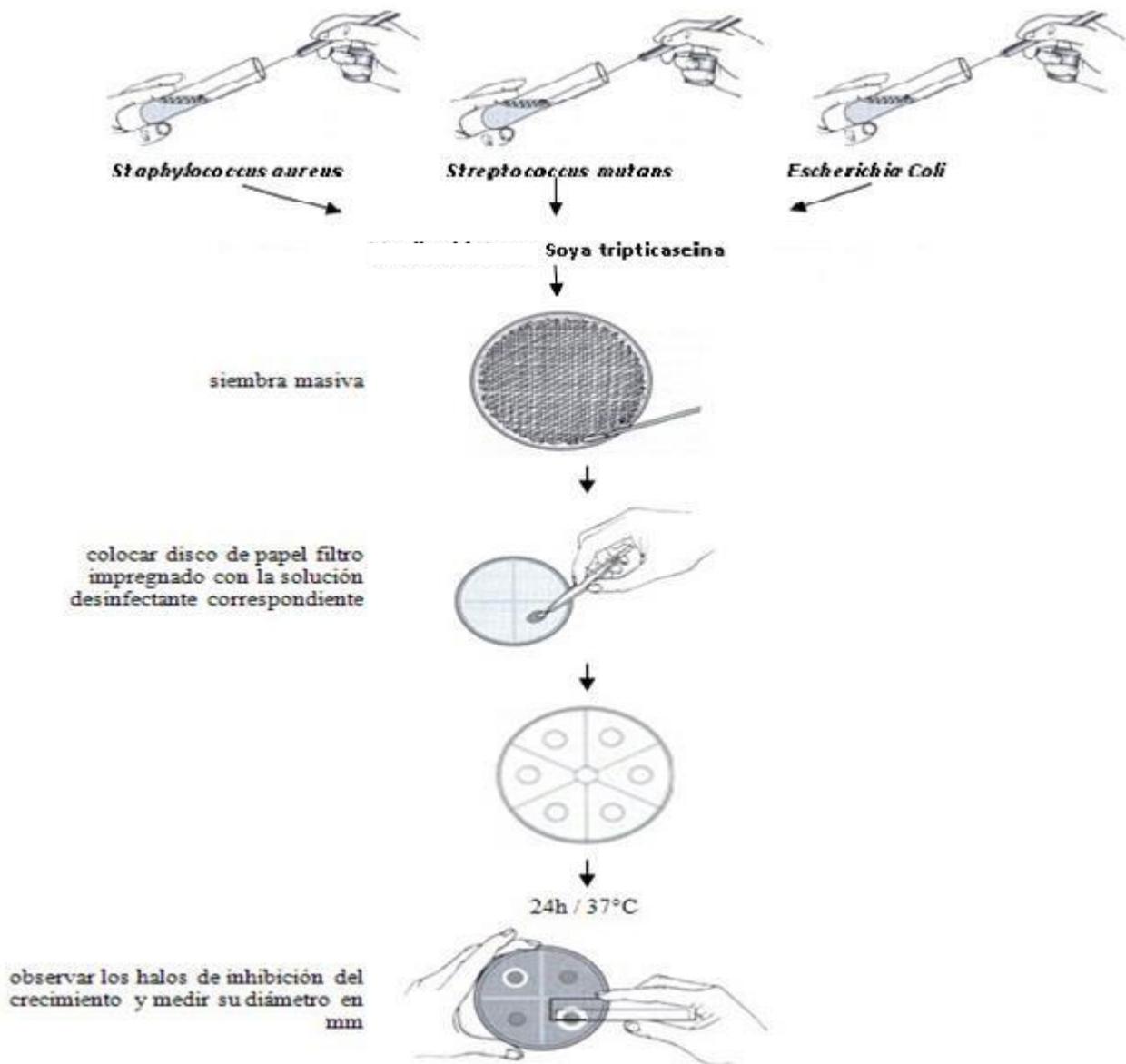
PROCEDIMIENTO

- 1.- En una caja de agar Soya Trypticaseina sembrar masivamente con el asa bacteriológica la cepa *Staphylococcus aureus*.
- 2.- Colocar discos de papel filtro humedecidos con cada una de las soluciones proporcionadas en la superficie del agar repartiendo los discos; etiquetar en la base de la caja con el nombre de la solución a la que corresponde cada uno.
- 3.- Realizar el mismo procedimiento con otra caja agar Soya Trypticaseina sembrando masivamente con el asa bacteriológica la cepa *Streptococcus mutans*.
- 4.- Realizar el mismo procedimiento con otra caja agar Soya Trypticaseina sembrando masivamente con el asa bacteriológica la cepa *Escherichia coli*.
- 5.- Incubar las tres cajas durante 24 horas a 37° C.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	90 / 155

PROCEDIMIENTO





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	91 / 155

RESULTADOS

- Observar si hubo inhibición de crecimiento bacteriano reportando la medida del diámetro del halo de inhibición en mm como se muestra en la imagen.



- Hacer la comparación entre las soluciones que inhibieron a los diferentes microorganismos en cada una de las cajas.

Cuestionario

- 1.- Defina solución desinfectante.
- 2.- ¿Que características ideales tiene el eugenol al mezclarse con el oxido de zinc para las bases cavitarias o curaciones temporales?
- 3.- En base a sus resultados que solución o soluciones utilizaría para desinfectar conductos radiculares y por qué?

BIBLIOGRAFÍA

1. Bergenholtz G, Horsted-BP, Reit C. Endodoncia. 2ª. ed. México: El Manual Moderno;2011.
2. Burgos Zamorano, Francisca. Medicación intraconducto en Endodoncia. Postgrado en Endodoncia, Universidad de Valparaiso. Agosto. 2013.
3. Canalda SC. Endodoncia: técnicas clínicas y bases científicas. 3ª. ed. España: Elsevier;2014.
4. Cohen S, Hargreaves KM, Berman LH. Las vías de la pulpa. 10a ed. Estados Unidos: Elsevier; 2011.
5. González FRM, Molina LJ. Microbiología bucal. 4a. ed. México: Méndez editores; 2009.
6. Hargreaves, K.M; Louis, H. Las vías de la pulpa. 11a ed. Estados Unidos: Elsevier :2016.
7. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
8. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca; 2011.
9. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2018.
10. Soares IJ, Goldberg F. Endodoncia, técnica y fundamentos. 2ª. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana;2002.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	92 / 155

Práctica No. 11

ANTIBIOGRAMA

OBJETIVO

Proporcionar al alumno el conocimiento de las indicaciones, características y usos del antibiograma, y el efecto de los antibióticos sobre los microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

El cambio constante de las patologías bucales aunadas a la resistencia bacteriana ocasionada por el mal uso de los antibióticos, hace en muchos momentos indispensable utilizar auxiliares de laboratorio como el antibiograma, siendo esta prueba una guía para el odontólogo sobre el antibiótico ideal para el tratamiento antibacteriano que cada paciente requiere. Para realizar esta práctica, el estudiante deberá revisar previamente lo siguiente:

- 1.- ¿Qué es un antibiótico?
- 2.- Defina inhibición bacteriana.
- 3.- Diferencie antiséptico de antimicrobiano.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias son naturalmente sensibles a algunos antimicrobianos y resistentes a otros (resistencia natural); sin embargo entre los microorganismos sensibles han aparecido cepas resistentes a antibióticos que eran activos (resistencia adquirida) por lo que al aislar a un microorganismo, no puede saberse si es sensible a un determinado antibiótico o si ha adquirido resistencia frente a él. Un antibiótico se considera activo frente a una bacteria cuando inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa in Vitro determinando la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Los fenómenos de transferencia genética y la aparición de mutantes en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, han dado lugar a la aparición de cepas resistentes a uno o varios antimicrobianos tanto en la población general como en el ambiente hospitalario se ha incrementado tal fenómeno. Esto lleva a la necesidad de conocer el patrón de susceptibilidad de las cepas aisladas en los casos clínicos frente a los antimicrobianos disponibles, teniendo en consideración que tal patrón varía ampliamente, dependiendo del género, la especie y aún del sitio donde se aísla el microorganismo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	93 / 155

Los antibiogramas son estudios que se realizan in vitro y que permiten determinar la resistencia o el grado de sensibilidad de los microorganismos frente a los diferentes antimicrobianos.

Las indicaciones para realizar un antibiograma son las siguientes:

- Cuando no se puede predecir la sensibilidad de un microorganismo.
- Como vigilancia epidemiológica para informar sobre la evolución de resistencias.
- En infecciones microbianas graves que comprometen seriamente la salud del paciente.
- Cuando se desconoce la susceptibilidad del microorganismo aislado a los antimicrobianos de uso frecuente o común.
- Cuando el cuadro clínico no responde al tratamiento antimicrobiano clásico para esa enfermedad.
- Cuando aparecen problemas de resistencia a los antimicrobianos.

Un antibiograma indica únicamente resistencia o susceptibilidad de un microorganismo a los agentes antimicrobianos, en ningún momento será la base para indicar un medicamento, pues se deben tener en cuenta otros elementos antes de prescribir un producto, como:

- Reacciones adversas o de hipersensibilidad al producto.
- Vía de administración del medicamento, tomando en cuenta la edad del paciente y la gravedad del padecimiento.
- Costo del medicamento.
- Frecuencia de la ingesta del medicamento de acuerdo a la ocupación del paciente.
- También es importante conocer las reacciones adversas o secundarias del medicamento e indicárselas al paciente.

Cuando se indica un antibiograma, el laboratorio de análisis clínicos enviará los resultados con las siglas (R) resistente y (S) sensible, el antibiótico de elección será siempre el que tenga la sigla **S**, tomando en cuenta los criterios anteriormente mencionados y sobre todo el sentido común. Las técnicas que utiliza el laboratorio clínico para conocer la sensibilidad a los antibióticos son muy variadas, pero la más utilizada es la técnica de los multidiscos. Se venden preparados para microorganismos Gram positivos, Gram negativos y mixtos, con la cantidad exacta de los medicamentos a



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	94 / 155

prueba para cada tipo de microorganismo, son de sencillo manejo y lectura fácil de realizar, solo se miden los milímetros de inhibición.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Dos cajas con Agar Mueller Hinton
- Multidisco Gram positivo
- Multidisco Gram negativo
- Una cepa de *Staphylococcus aureus*
- Una cepa de *Klebsiella pneumoniae*
- Regla en milímetros
- Pinzas de curación y mechero

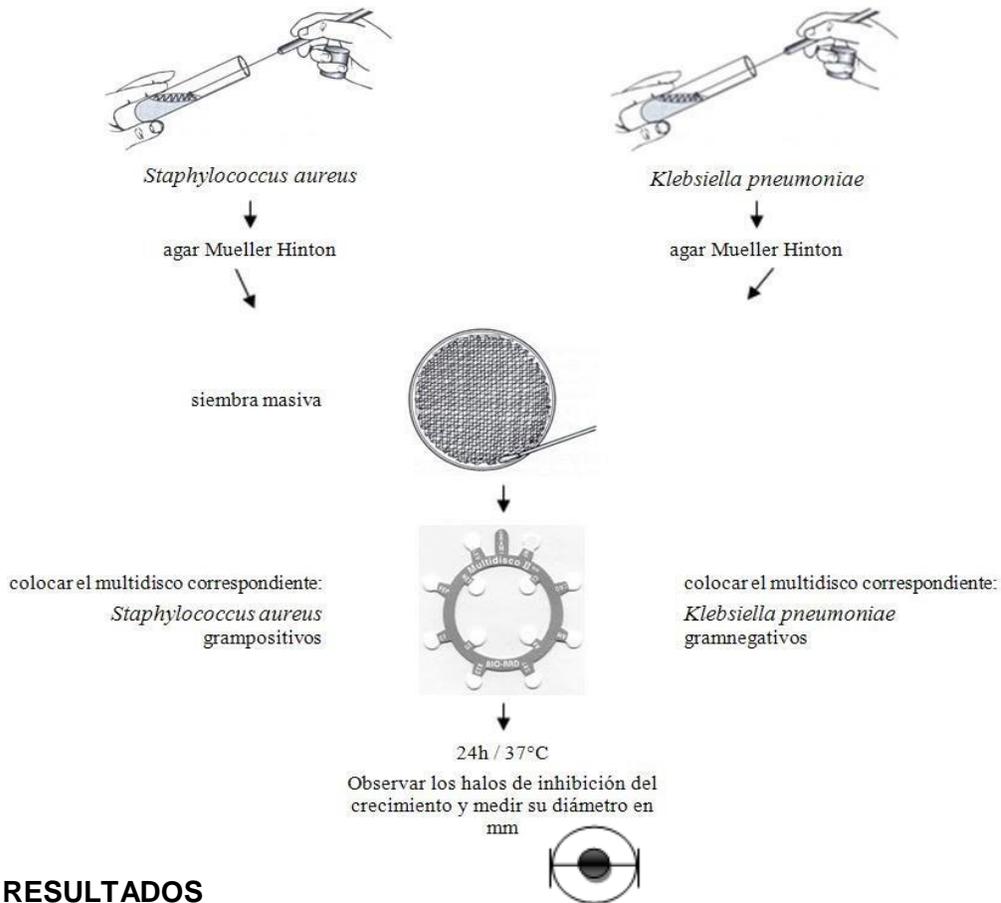
SERVICIOS: Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

- Sembrar masivamente una caja de Agar Mueller Hinton con *Staphylococcus aureus*.
- Colocar con las pinzas flameadas un multidisco Gram positivo, cuidando que quede perfectamente adherido al medio.
- Sembrar masivamente la otra caja de Agar Mueller Hinton con *Klebsiella pneumoniae*.
- Colocar con las pinzas flameadas un multidisco Gram negativo, cuidando que quede perfectamente adherido al medio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	95 / 155



RESULTADOS

- Medir los halos de inhibición en milímetros de cada antibiótico de cada caja de Gram positivos y de Gram negativos, identificar los antibióticos con mayor efecto inhibitor, menor efecto inhibitor y efecto medio inhibitor tomando en cuenta la información del fabricante.
- De los antibióticos de mediano efecto (que serían los de primera elección), buscar la información de cada uno de ellos (Nombres comerciales, presentaciones, vías de administración, indicaciones, contraindicaciones, reacciones adversas, etc.).

Esta prueba se fundamenta en que al colocar el disco impregnado con determinada cantidad de antimicrobiano sobre un medio sólido inoculado con bacterias, el antimicrobiano difundirá formándose un gradiente de concentración, el cual inhibirá o permitirá el crecimiento de la bacteria. Una vez que se coloca el disco de papel filtro en contacto con el medio de cultivo, el antibiótico difundirá hacia el interior.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	96 / 155

Contenido de los multidiscos:

Multidiscos* Gram Positivos CAT.

Cada multidisco contiene aproximadamente:

Ampicilina	AM	10µg
Cefalotina	CF	30µg
Cefotaxima	CTX	30µg
Ceftazidima	CAZ	30µg
Cefuroxima	CXM	30µg
Dicloxacilina	DC	1µg
Eritromicina	E	15µg
Gentamicina	GE	10µg
Pefloxacina	PEF	5µg
Penicilina	PE	10U
Tetraciclina	TE	30µg
Trimetoprim- Sulfametoxasol	SXT	25µg

Multidiscos* Gram Negativos CAT.

Cada multidisco contiene aproximadamente:

Amikacina	AK	30µg
Ampicilina	AM	10µg
Carbenicilina	CB	100µg
Cefalotina	CF	30µg
Cefotaxima	CTX	30µg
Ceftriaxona	CRO	30µg
Cloranfenicol	CL	30µg
Gentamicina	GE	10µg
Netilmicina	NET	30µg
Nitrofurantoína	NF	300µg
Pefloxacina	PEF	5µg
Trimetoprim-Sulfametoxasol	SXT	25µg



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	97 / 155

Cuestionario

1. Mencione la diferencia entre antibiótico de amplio, mediano y reducido espectro.
2. Mencione 5 antibióticos (bases farmacológicas) para microorganismos Gram positivos.
3. Mencione 5 antibióticos (bases farmacológicas) para microorganismos Gram negativos.
4. Mencione los riesgos del uso indiscriminado de antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
2. Carrol ,K.C ; Morse S.A; Mietzner, T,A; Miller, S. Microbiología médica : 27a ed. México Mc Graw Hill; 2016.
3. Espinosa MMT. Farmacología y terapéutica en odontología. México: Medica panamericana;2012
4. González FRM, Molina LJ. Microbiología bucal. 4a. ed. México: Méndez editores; 2009.
5. Liébana UJ. Microbiología oral. 2a. ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2002.
6. Marsh PD, Martin MV. Microbiología oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca; 2011.
7. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2018.
8. Nolte WA. Microbiología odontológica. México: Interamericana;1986.
9. Ruiz G, Fernández A. Fundamentos de farmacología básica y clínica. 2ª. ed. Médica panamericana;2013.
10. Slots J, Taubman MA, Yankell S. Contemporary oral microbiology and immunology. 3ª ed. Saint Louis: Mosby; 1992.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	98 / 155

UNIDAD II: INMUNOLOGÍA

PRÁCTICA No. 1: Mecanismos de defensa inespecíficos en cavidad bucal.....	99
PRÁCTICA No. 2: Reacciones de precipitación en capilar.....	106
PRÁCTICA No. 3: Reacción de Precipitación en gel.....	113
PRÁCTICA No. 4: Reacciones de aglutinación	119
PRÁCTICA No. 5: Fijación de complemento.....	125
PRÁCTICA No. 6: Choque anafiláctico.....	131
PRÁCTICA No. 7: Antiestreptolisinas.....	138
PRÁCTICA No. 8 Determinación de Anticuerpos heterófilos como diagnóstico de la mononucleosis infecciosa.....	144
PRÁCTICA No. 9: Determinación del título de anticuerpos en saliva y suero contra cepas cariogénicas y su relación con el índice C.P.O.....	148



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	99 / 155

Práctica No. 1

MECANISMOS DE DEFENSA INESPECÍFICOS DE CAVIDAD ORAL

OBJETIVO

Que el alumno comprenda los diferentes mecanismos de defensa inespecíficos del organismo, e identifique los relacionados con la cavidad oral como la fagocitosis y lisozima.

Para realizar la práctica, el estudiante deberá revisar previamente la siguiente información:

- 1.- Definición de Inmunidad.
- 2.- Tipos de Inmunidad.
- 3.- Factores que modifican la inmunidad.
- 4.- Definición de respuesta inmune específica e inespecífica.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los seres humanos están defendiendo su integridad biológica frente a las agresiones, esencialmente externas, de no ser así, podrían morir como consecuencia de infecciones por bacterias, virus, hongos, etc. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, el organismo dispone de un conjunto de elementos especiales conocido como respuesta inmune. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura en los primeros años de vida.

En esta práctica, el estudiante comprenderá los diferentes mecanismos de defensa inespecíficos del organismo, e identifique los relacionados con la cavidad oral como la fagocitosis y lisozima.

Los mecanismos de defensa son diferentes en las diversas partes del organismo, y se dividen en dos grupos:

1. Mecanismos inespecíficos se denominan así porque actúan contra cualquier agente extraño sin distinguir su tipo, es la primera barrera de defensa y su función es impedir la penetración de los agentes patógenos al interior del cuerpo. Estos se



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	100 / 155

encuentran en la piel, conjuntivas oculares y mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario.

2. Mecanismos específicos constituyen la segunda línea de defensa y esta actúa una vez que los microorganismos han logrado penetrar a la intimidad de los tejidos, su función será eliminar a los agentes patógenos y bloquear los efectos de las sustancias tóxicas que producen.

De los diferentes factores que están asociados con los mecanismos de defensa inespecíficos de cavidad oral, dos aspectos resultan básicos:

- a) Barreras anatómicas y fisiológicas, tales como la mucosa oral, la integridad del epitelio, el flujo salival, la composición anatómica y química de los dientes, sustancias antagonistas de origen microbiano, lisozima y otros.
- b) La fagocitosis, donde las células involucradas son principalmente neutrófilos y polimorfonucleares.

Los mecanismos de defensa inespecíficos en cavidad oral se clasifican en:

A. FÍSICOS O MECÁNICOS

Barrera física de la mucosa
Mecanismos de limpieza de la saliva (autoclisis)
Movimientos de lengua y carrillos
Descamación y generación epitelial
Flujo salival
Esmalte

B. BIOQUÍMICOS

Lisozima o muramidasa
Peroxidasa
Lactoferrina
Fibronectina
pH salival



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	101 / 155

C. BIOLÓGICOS

Fagocitosis
Complemento

D. BACTERIANOS

Flora bacteriana oral
Bacteriocinas

A. FÍSICOS

Barrera física de la mucosa

El epitelio de la encía y el paladar está constituido por epitelio escamoso estratificado el cual impide la penetración bacteriana debido a la queratinización que tiene, a diferencia del que se encuentra en carrillos y paladar blando en donde su queratinización es menor.

Autoclisis

La saliva junto con el movimiento de lengua y carrillos nos proporciona este mecanismo, el cual ayuda a limpiar la cavidad bucal impidiendo la proliferación bacteriana.

Descamación y regeneración epitelial

La bolsa gingival y la unión dentogingival son las zonas que se reparan más rápido renovándose aproximadamente cada 4 ó 6 días.

Flujo Gingival

Es un mecanismo de protección ya que evita la entrada de los microorganismos a los conductos salivares. La disminución del flujo gingival produce una mayor incidencia de caries dental e infecciones de las glándulas salivales.

Esmalte

Sustancia más dura de todo el organismo; del 96 al 98% de su masa es hidroxapatita cálcica. Es un tejido mineralizado acelular que cubre la corona del diente y que una vez formado ya no se puede reemplazar. Se trata de un tejido singular por que a diferencia del hueso, que se forma partir de un tejido conjuntivo, consiste en un material mineralizado que deriva de un epitelio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	102 / 155

B. BIOQUÍMICOS

Lisozima o muramidasa

Se encuentra en todas las secreciones de nuestro cuerpo como son saliva, lágrima, sudor, secreción nasal, intestinal, bronquial, etc. En cavidad bucal es secretada por las glándulas párotida, submandibular y sublingual así como por monocitos, esta enzima actúa a nivel de la pared celular en los enlaces glucosídicos beta 1-4 que une el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina del mucopéptido bacteriano de casi todas las bacterias Gram positivas. La lisozima debilita la pared celular y deja vulnerables a las bacterias para su muerte por lisis osmótica. En estudios se ha observado que en la gingivitis y la enfermedad periodontal los niveles de lisozima se encuentran elevados

Lactoperoxidasa

Se encuentra presente en saliva y leche, su mecanismo es similar al de la peroxidasa presente en los neutrófilos esto es que en presencia de peróxido tiene acción antimicrobiana.

Lactoferrina

Enzima secuestradora del hierro, se encontró en la leche de vaca, en la materna y en cavidad bucal; su función es atrapar iones hierro lo cual ocasiona que no haya crecimiento bacteriano, ya que la bacteria necesita el hierro como cofactor de sus propias enzimas.

Fibronectina

Es una proteína que se encuentra en las superficies de las células epiteliales de la orofaringe y su función es la de cubrir los receptores epiteliales y así impedir la adherencia bacteriana.

pH salival

Es un limitante del crecimiento bacteriano, ya que los microorganismos se desarrollan a diferentes pH.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	103 / 155

C. BIOLÓGICOS

Fagocitosis

Es el proceso mediante el cual los leucocitos entran en contacto, engloban, ingieren, destruyen microorganismos y otras partículas extrañas. Se ha observado que la fagocitosis en cavidad oral se lleva a cabo en el surco gingival por polimorfonucleares, neutrófilos y macrófagos que se encuentran en gran cantidad en el fluido gingival.

Complemento

El complemento está formado por una serie de proteínas plasmáticas el cual es un amplificador de la respuesta inmune y su reacción es en forma de cascada terminando en lisis de una célula o una bacteria.

Estas proteínas proporcionan mecanismos de defensa como son favorecer la fagocitosis, activar la respuesta inflamatoria y unirse a la célula invasora y provocar su lisis.

La activación del complemento se lleva a cabo por tres vías, la vía clásica que es activada por una reacción antígeno-anticuerpo, la cual es un mecanismo de defensa específico, la vía alternativa o de la properdina la cual es activada por sustancias como lipopolisacáridos de Gram negativos, polisacáridos de Gram positivos, paredes de levaduras (zymosan), sustancias producidas por la placa bacteriana etc. y es un mecanismo de defensa inespecífico y por último la vía de la lectina.

D. BACTERIANOS

Flora bacteriana

Existen relaciones ecológicas como el antagonismo donde un microorganismo produce sustancias que inhiben al otro, así como la competencia la cual se da por nutrientes y espacio; éstas son importantes para el huésped porque regulan la población microbiana.

Bacteriocinas

Las bacterias de la flora comensal producen algunas sustancias llamadas bacteriocinas que inhiben o destruyen a otras bacterias.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	104 / 155

MATERIAL Y REACTIVOS

CEPAS:

Micrococcus lysodeikticus

Medio de cultivo:

1 caja de Petri con agar soya tripticasa

Material y equipo:

Mechero

1 tubo con 8 discos de papel filtro estéril

1 tubo con solución salina estéril

Pinzas de curación

Asa bacteriológica

Preparación fija de fagocitosis

SERVICIOS: Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

A. FAGOCITOSIS

Observar al microscopio preparación fija de fagocitosis en el objetivo de inmersión.

B. LISOZIMA

1.- Sembrar masivamente la caja de agar soya tripticasa con *Micrococcus lysodeikticus*.

2.- Colocar sobre la caja sembrada los discos de papel filtro impregnados con las siguientes secreciones y solución.

- Lágrima
- Saliva
- Sudor
- Secreción nasal
- Solución salina

3.- Incubar a 37° C durante 24 horas.

4.- Observar y medir los halos de inhibición producidos por la presencia de lisis cuando está presente la lisozima.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	105 / 155

RESULTADOS

- Identificar en el microscopio las diferentes etapas de la fagocitosis, y el tipo de leucocito que la está llevando a cabo.
- Medir los halos de inhibición de cada una de las secreciones y solución utilizadas y realizar una tabla de comparación para determinar en cual secreción hay mayor concentración de lisozima.

Cuestionario

- 1.- Mencione que otros factores inespecíficos de defensa pueden encontrarse en saliva.
- 2.- ¿Que probabilidades de desarrollar caries dental presenta un individuo cuya capacidad buffer salival sea alta y por qué?
- 3.- Explique la importancia de la fagocitosis.
- 4.- Explique cada uno de los pasos de la fagocitosis.
- 5.- Explique la importancia de los mecanismos de defensa inespecíficos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Inmunología: fundamentos. 12a. ed. Médica Panamericana;2014.
2. Fainboin L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana, 6a. ed. Médica panamericana 2011.
3. Goldsby R. A. Kindt Thomas J. Osborne B. Kuby J. Inmunología, 6a. ed. Mc Graw Hill 2007.
4. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10ª ed. México: Manual Moderno; 2002.
5. Regueiro GJR, Lopez LC. Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario. 4a. ed. Médica Panamericana S.A.; 2010.
6. Rojas EO. Inmunología (de memoria), 3a. ed. México: Médica Panamericana; 2006.
7. Rojas O, Arce-Paredes P. Fagocitosis mecanismos y consecuencias, primera parte. Medigraphic. 2003;28: pp20-24



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	106 / 155

Práctica No. 2

REACCIONES DE PRECIPITACIÓN EN CAPILAR

OBJETIVO

Que el alumno conozca una de las pruebas de laboratorio utilizadas para evidenciar las reacciones antígeno – anticuerpo y sea capaz de relacionar este evento con las diferentes formas que tiene el cuerpo humano y la cavidad bucal para defenderse.

Para realizarla, el estudiante revisará previamente la siguiente información:

1. ¿Cuáles son los mecanismos de defensa inespecíficos?
2. Defina antígeno y anticuerpo
3. Defina reacción de precipitación

FUNDAMENTO TEÓRICO

Desde el momento del nacimiento, el hombre está expuesto a un sin número de contactos o ataques de bacterias, hongos, virus y/o parásitos, de los cuales debe defenderse, ya sea mediante mecanismos de defensa no específicos que son eficaces contra una gran variedad de microorganismos y/o por mecanismos de defensa específicos los cuales son efectivos contra determinados agentes agresores. Para todo aquel que se dedica a la salud, es de suma importancia conocer cómo nuestro cuerpo reaccionará ante cualquier tipo de agresión ya sea mecánica, física, química o microbiana intentando protegerlo.

Como ya se ha visto en las unidades didácticas anteriores, un microorganismo necesita casi en todos los casos entrar en los tejidos del huésped para ser patógeno, el cuerpo humano tiene un gran número de barreras que lo protegen contra la entrada de este tipo de agresores de forma general o inespecífica.

Las mucosas, la piel, la conjuntiva y en la circulación sanguínea la fagocitosis, son algunas de estas barreras de defensa inespecíficas o no específicas.

Los mecanismos de defensa específicos dependerán estrechamente de la herencia, edad, sexo, raza, nutrición, hormonas, etc. protegiendo a nuestro cuerpo contra infecciones determinadas como resultado de su capacidad de defenderse contra un agente causal, ya sea de forma activa o pasiva.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	107 / 155

Dentro de esta capacidad de defender al cuerpo tenemos a la inmunidad activa, que es permanente o de larga duración y ocurre de manera natural cuando se padece la enfermedad o infección creando en nuestro cuerpo una memoria que se conserva y actuará cuando exista un nuevo contacto con el mismo microorganismo que ocasionó la primera infección. Dentro de este tipo de inmunidad activa, también se encuentra la artificial, para la cual sin padecer la enfermedad, se prepara al cuerpo para reconocer al agente agresor y atacarlo mediante el uso de vacunas.

Ambos tipos de inmunidad activa (natural o artificial) tienen en común la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas, que son aquellas sustancias que produce el organismo como respuesta a un antígeno y que solamente pueden reconocer, atacar y destruir al antígeno (bacteria, hongo, parásito, virus, agente extraño, toxina, entre otros) para el cual fue creado, por eso son específicos.

La inmunidad pasiva, también se divide en natural y artificial, esta es temporal y se obtiene dando o proporcionando los anticuerpos ya formados en otro organismo, por ejemplo, de la natural se encuentra el calostro (leche materna) y de la artificial tenemos como principal ejemplo, los antiseros contra venenos, entre otros.

Cuando un antígeno y un anticuerpo se encuentran, reaccionan de diferente manera y dependiendo del estado y características de cada uno de ellos pueden ocasionar reacciones de:

- a) Precipitación
- b) Aglutinación
- c) Floculación
- d) Neutralización

Las reacciones de precipitación se presentan cuando el antígeno (Ag) es multivalente y el anticuerpo (Ac) bivalente y específico para el antígeno contra el cual actuará; ambos deben ser solubles y dan como resultado la formación de un complejo insoluble.

Esta reacción se utiliza en el laboratorio para demostrar y cuantificar antígenos y/o anticuerpos y se puede hacer en medio líquido o semisólido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	108 / 155

La precipitación en capilar se realiza en un medio líquido y en tubos capilares, mezclando antígenos multivalentes con anticuerpos bivalentes, ambos en solución, donde pueden combinarse formando redes tridimensionales que se agregan y precipitan, esta es una prueba semicuantitativa o cuantitativa, ya sea midiendo los precipitados resultantes o analizando los sobrenadantes resultantes de la reacción en la búsqueda de antígenos o anticuerpos libres.

Cuando la cantidad de anticuerpo se encuentra en forma constante y el antígeno se va diluyendo, el precipitado que resultará de la reacción se mide en milímetros; cuando se grafican estos resultados, se puede observar una curva, a la que se le llama curva de precipitación en la cual se pueden diferenciar tres zonas (gráfica 1):

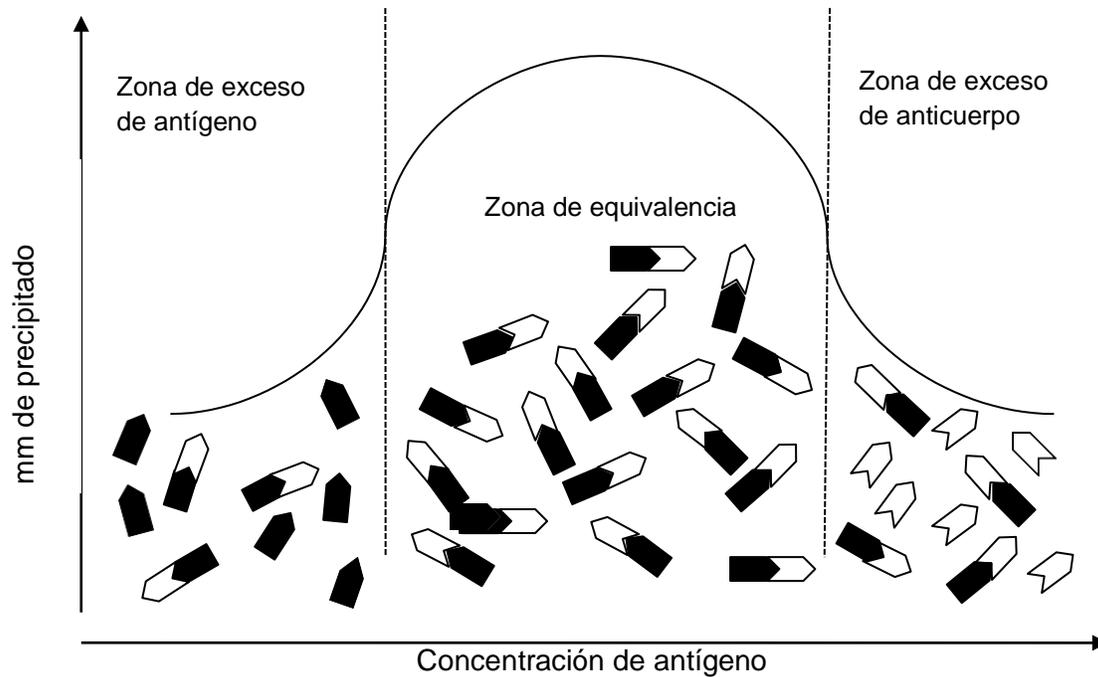
Exceso de antígeno: Llamado también prozona, todos los anticuerpos están combinados, pero la precipitación es baja debido a que gran parte de los complejos antígeno- anticuerpo son pequeños y solubles, tienden a disolverse, la cantidad de precipitado es también menor a la de equivalencia, en el sobrenadante se encuentran antígenos libres.

Equivalencia: se encuentran en proporciones iguales las cantidades de antígeno y anticuerpo por lo que se observa un máximo precipitado, el sobrenadante no contiene ni antígenos ni anticuerpos libres.

Exceso de anticuerpo: Hay demasiados anticuerpos para una formación eficiente de precipitado, los complejos formados son insolubles y permiten una estimación de la valencia del antígeno, la precipitación es inferior a la de equivalencia, en el sobrenadante se encuentran anticuerpos libres.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	109 / 155



GRÁFICA 1. CURVA DE PRECIPITACIÓN EN CAPILAR

MATERIAL Y REACTIVOS

- 11 Tubos capilares
- 11 tubos de ensaye de 13 x 100 en gradilla
- 3 pipetas de 1ml graduadas en décimas
- 1 barra de plastilina
- 1 tubo de ensaye con Suero Bovino Total (SBT) (Antígeno)
- 1 tubo de ensaye con Antisuero Bovino Total (ASBT) (Anticuerpo)
- 5 ml de solución salina
- Papel absorbente
- 1 mechero

SERVICIOS: Luz, agua.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	110 / 155

PROCEDIMIENTO

1. Tomar once tubos capilares y dividirlos en cuatro partes iguales por medio de una regla y un marcador.
2. En 9 tubos de ensaye 13 x 100 previamente etiquetados, colocar 0.5 ml de solución salina.
3. Agregar 0.5 de suero humano total al tubo número 1 mezclándolo perfectamente.
4. Tomar 0.5 ml del tubo número 1 y colocarlos en el número 2.
5. Tomar 0.5 ml del tubo 2 y transferirlos al tubo 3, mezclar y repetir del 3 al 4 y así hasta el tubo número 9.
6. Absorber con un tubo capilar por capilaridad antisuero humano total (ASHT) hasta la primera marca que realizó.
7. Girar el tubo capilar a 180° y dejar que el (ASHT) baje o descienda hasta el borde contrario de donde absorbió.
8. Tapar con el dedo el extremo superior del capilar (como si fuese una pipeta) introducir el capilar en el tubo de ensaye número 1, retirar el dedo y permitir que suba por capilaridad el suero hasta la segunda marca del capilar.
9. Colocar el tubo en forma horizontal y realizar movimientos giratorios para mezclar el suero y el antisuero del capilar.
10. Colocar el líquido en el centro del capilar
11. Acercar a la flama del mechero uno de los extremos del capilar y girándolo sellar el vidrio.
12. Etiquetar el tubo con el número 1 y clavarlo en la barra de plastilina.
13. Realizar el mismo procedimiento con cada uno de los tubos capilares, cambiando de dilución.
14. Llenar el tubo capilar 10 hasta la segunda marca con antisuero (testigo).
15. Llenar el tubo 11 hasta la segunda marca con suero (testigo).
16. Dejar la barra de plastilina a temperatura ambiente por unos minutos y después en refrigeración 24 a 48 horas.
17. Centrifugar los tubos capilares a 1000 rpm durante 1 minuto.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	111 / 155

RESULTADOS

- Realizar una tabla como la siguiente:

Tubo capilar No.	Dilución	mm. de precipitado
1	1:2	
2	1:4	
3	1:8	
4	1:16	
5	1:32	
6	1:64	
7	1:128	
8	1:256	
9	1:512	
10	Testigo	
11	Testigo	

- Medir con regla el precipitado de cada tubo capilar anotando el resultado en el cuadro superior.
- Graficar en papel milimétrico los resultados, teniendo en cuenta que para fines didácticos, en esta ocasión el suero humano funcionará como Antígeno y el antisuero será el anticuerpo, coloque en el eje de las abscisas de su gráfica la dilución de suero 1:2, 1:4, 1:8 etc., y en el eje de las ordenadas la cantidad de precipitado en milímetros.
- Los tubos capilares testigos 10 y 11 se graficarán en cada uno de los extremos, tomándolos como cero mm de precipitado.
- Identifique cada una de las zonas de su curva de precipitación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	112 / 155

Cuestionario

1. Explique las características que debe tener el antígeno y el anticuerpo para que se dé una reacción de precipitación.
2. Explique qué es una reacción antígeno anticuerpo.
3. Mencione a qué tipo de mecanismo de defensa pertenecen las reacciones antígeno anticuerpo
4. ¿Qué células son las encargadas de formar los anticuerpos?
5. ¿Qué importancia tiene este mecanismo de defensa en cavidad bucal?

BIBLIOGRAFÍA

1. Duerden BI, Reid TMS, Jewsbury JM y Turk DC. Microbiología de enfermedades infecciosas. México: Limusa; 1993.
2. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Inmunología. 7a. ed. España: Elsevier; 2007.
3. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10ª Ed. México: Manual Moderno; 2002.
4. Spicer WJ. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas: texto y atlas en color. 1a. ed. España: Elsevier; 2009.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	113 / 155

Práctica No. 3

REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN EN GEL (Ouchterlony)

OBJETIVO

El alumno demostrará y analizará la reacción antígeno-anticuerpo, y su utilidad como mecanismo de defensa en la reacción de precipitación, utilizando una prueba cualitativa inmunológica de laboratorio.

Para realizar esta práctica, el estudiante revisará previamente la siguiente información:

1. Definición de antígeno y anticuerpo.
2. Características de un antígeno y un anticuerpo para que se lleve a cabo una reacción de precipitación.
3. Clasificación de inmunoglobulinas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Uno de los mayores retos para la medicina moderna es el traslado de los avances básicos en la inmunoquímica e inmunobiología hacia procedimientos diagnósticos y terapéuticos útiles en práctica de la medicina clínica. En el laboratorio de inmunología clínica las pruebas que utilizan gran parte de los principios de la inmunología básica, se pueden llevar a cabo en una amplia variedad de muestras tomadas en pacientes. Los resultados de estos procedimientos de laboratorio son utilizados para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los trastornos clínicos.

Más aún, el análisis cualitativo y cuantitativo de las respuestas inmunitarias ha llevado a una mejor comprensión de la patogenia de muchos trastornos clínicos.

Esta técnica simple y de gran utilidad llamada también de Ouchterlony se basa en el principio de que cuando el antígeno y el anticuerpo se difunden en un medio semisólido (por ejemplo, el agar), forman complejos inmunitarios estables que se pueden analizar visualmente

La doble difusión comúnmente se lleva a cabo al verter agar disuelto en placas de vidrio o en cajas de petri y permitir que se endurezca. Se perforan pequeños pozos en el agar,



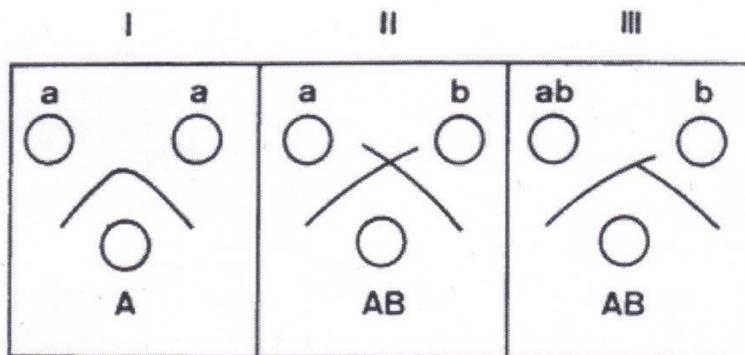
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	114 / 155

separado algunos milímetros. La doble difusión se lleva a cabo al colocar los pozos de antígeno y anticuerpo en diversos ángulos para análisis comparativos, los cuales difunden a través de él y corren radialmente llegando a encontrarse y formar un precipitado el cual se observa como una línea opaca en la región donde se encuentran en proporciones equivalentes.

Si una preparación contiene varios antígenos se dará lugar a líneas múltiples, debido a que no todas las moléculas ya sean de antígeno o de anticuerpo difunden con la misma velocidad.

Las 3 modalidades características básicas de estas reacciones se mencionan a continuación:

La relación inmunológica entre dos antígenos puede probarse preparando reacciones de precipitación en pozos adyacentes, las líneas formadas por cada antígeno pueden ser completamente confluentes, indicando identidad inmunológica o bien pueden mostrar una espícula como en el caso de antígenos parcialmente relacionados. También puede haber completo cruzamiento indicando que se trata de antígenos no relacionados.



Esquemas de reacciones de Ouchterlony. a y b, antígenos. A y B, anticuerpos. I, reacción de identidad. II, reacción de no identidad. III, reacción de identidad parcial.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	115 / 155

I. *Reacción de identidad*: se observa una línea de confluencia entre dos antígenos que son iguales en términos del antisuero utilizado.

II. *Reacción de no identidad*: se observan líneas de cruzamiento formadas por antígenos no relacionados.

III. *Reacción de identidad parcial*: se observa la formación de una espícula por antígenos parcialmente relacionados que tienen un determinante común.

El método de precipitación en gel puede hacerse más sensitivo incorporando el antisuero en el agar y permitiendo que el antígeno difunda sobre él. Este método de inmunodifusión radial se usa para un análisis cualitativo y cuantitativo de antígenos y anticuerpos en el suero y otros líquidos corporales.

Aunque la formación de complejos antígeno – anticuerpo en un medio semisólido como el agar depende de los electrolitos del amortiguador, el pH y la temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo.

La doble difusión en agar se puede utilizar para análisis semicuantitativo en sistemas serológicos humanos, donde la especificidad de las líneas de precipitación ya ha sido determinada. Frecuentemente se usa la inmunodifusión doble para la detección de anticuerpos o antígenos nucleares extraíbles en pacientes con varias enfermedades del tejido conjuntivo. Este método ha comprobado ser una técnica confiable para su detección.

TEORÍA DE LA FORMACIÓN DE REDES.

Se ha considerado una teoría para la reacción de precipitación que es la formación de redes entre antígenos y anticuerpos. Para que se lleve a cabo una reacción de precipitación el antígeno debe de ser multivalente, para el crecimiento de los agregados antígeno-anticuerpo de tal manera que cada molécula de antígeno se una a más de un anticuerpo y que cada molécula de anticuerpo se una a más de una molécula de antígeno.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	116 / 155

Al estudiar las inmunoglobulinas del suero humano por el método de electroforesis, se vio que existían diferentes clases de inmunoglobulinas, porque tenían diferente movilidad en el campo electroforético. Estas diferentes movilidades de deben a la carga neta de las diferentes inmunoglobulinas, lo cual es indicativo de variación en la estructura de los aminoácidos que las constituyen. Así las inmunoglobulinas se pueden dividir en diferentes isotipos IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

MATERIAL Y REACTIVOS

1 portaobjetos con ion agar (oxid)

1 caja de petri

1 aplicador de madera

1 pipeta Pasteur

Papel filtro

Solución de antígenos:

Suero bovino total

albúmina bovina,

gamaglobulina bovina

Ovoalbúmina.

Solución de anticuerpos:

antisuero bovino total

antialbúmina bovina + antiovoalbúmina.

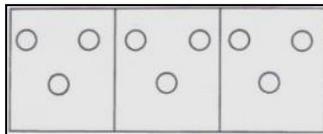
SERVICIOS: agua, luz.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	117 / 155

PROCEDIMIENTO

1. Realizar tres series de tres perforaciones en el agar, de forma que quede un pozo en cada vértice de un triángulo equilátero formado. (Como lo muestra el esquema.):



2. Estos pozos se llenan con el antígeno y el anticuerpo con la ayuda de un tubo capilar como le indique su profesor y de acuerdo con el esquema que el profesor indique en la explicación.

3. Se improvisa una cámara húmeda con una caja de petri a la cual se le pone papel húmedo en la base y la tapa

4. Se colocan los portaobjetos preparados en la caja sostenidos por aplicadores de madera.

5. Se incuba a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas y se buscan bandas de precipitación.

RESULTADOS

Tomar cuidadosamente el portaobjetos y observar hacia la luz cada sistema de pozos, identificando las bandas de precipitación.

Hacer un esquema del portaobjetos con los pozos señalando donde se colocó el antígeno y el anticuerpo de acuerdo a las instrucciones de su profesor y dibujar las bandas de precipitación que se observen, identificar el tipo de reacción que se observó (identidad, no identidad ó identidad parcial).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	118 / 155

CUESTIONARIO

1. Mencione que ventajas observó que tiene el método de precipitación en el gel sobre la precipitación en capilar.
2. Explique qué aplicaciones tiene el método de precipitación en gel.
3. Diga que características debe tener un antígeno y un anticuerpo para que se lleve a cabo una reacción de precipitación.
4. Explique que es un monómero y un pentámero
5. Diga cuales son las inmunoglobulinas de importancia en cavidad bucal y porque.

BIBLIOGRAFÍA

1. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Inmunología: fundamentos. 12a. ed. Médica Panamericana;2014.
2. Fainboin L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana, 6a. ed. Médica Panamericana 2011.
3. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Inmunología de Kuby. 6a ed. España: Mc Graw Hill; 2007.
4. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10a. ed. México: Manual Moderno; 2002.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	119 / 155

Práctica No. 4

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

OBJETIVO

Que el alumno conozca e identifique las reacciones de aglutinación tomando como ejemplo la determinación de grupo sanguíneo y el fundamento de éstas.

Para realizar la práctica, el estudiante deberá revisar previamente los siguientes temas y definiciones:

- Definición de antígeno y anticuerpo
- Definición de aglutinación
- Diferentes tipos de aglutinación

FUNDAMENTO TEORICO

Los eritrocitos, las bacterias, los hongos y toda una diversidad de especies microbianas pueden ser aglutinados directamente por los anticuerpos séricos, como un mecanismo de defensa específico del organismo.

Las reacciones de aglutinación son la base de la mayor parte de las técnicas comúnmente empleadas en el laboratorio de inmunología. Las técnicas de aglutinación son sólo semicuantitativas, la aglutinación de los antígenos nativos insolubles o de las partículas recubiertas por el antígeno puede evaluarse a simple vista con o sin la ayuda del microscopio. Ventajas importantes de las reacciones de aglutinación son su alto grado de sensibilidad y enorme variedad de sustancias identificables a través del uso de partículas que están recubiertas por antígeno o por anticuerpo.

Según Coombs, los tres requerimientos principales en las pruebas de aglutinación son la disponibilidad de una suspensión estable de células o de partículas, la presencia de uno o más antígenos cercanos a la superficie y el conocimiento de que los anticuerpos "incompletos" o no aglutinables no son localizables sin modificación; por ejemplo, las reacciones antiglobulina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	120 / 155

Las reacciones de aglutinación son utilizadas en varias pruebas de laboratorio algunas de ellas son:

- Determinación de grupo sanguíneo
- Prueba de embarazo
- Reacciones febriles
- Factor reumatoide

Las reacciones de aglutinación pueden clasificarse en directa, indirecta y reversa o inversa. En la técnica directa simple, un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por el anticuerpo. Un ejemplo es la aglutinación de los eritrocitos del grupo A por antisueros anti-A.

La aglutinación pasiva se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígeno o las partículas inertes que son portadoras pasivas de antígenos solubles. Se tienen ejemplos de lo anterior en la fijación del látex para descubrir el factor reumatoide y la aglutinación de eritrocitos recubierto de DNA, para la identificación de los anticuerpos anti-DNA. De manera alterna, el antígeno puede ser localizado recubriendo partículas de látex o eritrocitos con anticuerpo purificado y practicando la llamada aglutinación revertida.

Otra categoría de aglutinación involucra la aglutinación espontánea de los eritrocitos por ciertos virus. Esta reacción de hemaglutinación puede inhibirse de manera específica en presencia de anticuerpos antivirales. Por lo tanto la hemaglutinación viral puede emplearse para medir la cantidad de virus o para determinar, por inhibición homóloga, el título de los anticuerpos dirigidos en contra de los virus hemaglutinantes.

Los conocimientos sobre inmunología de Karl Landsteiner, le permitieron comprender el proceso de aglutinación observado por él en los hematíes humanos, y con ello creó una nueva rama de la biología.

La determinación de grupos sanguíneos puede clasificarse como una técnica directa simple. Por lo que podemos afirmar que el fenómeno de la aglutinación es la base la división de la sangre en cuatro grupos llamados O, A, B y AB y sus subgrupos.

Las características de ambos (antígeno/anticuerpo) son indispensables para que se dé la aglutinación, que se lleva a cabo por una reacción antígeno-anticuerpo en la cual el antígeno sólido o en partículas forma un cristal con un anticuerpo soluble.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	121 / 155

El factor Rh (así llamado porque también se encuentra en los eritrocitos del mono Rhesus), presente en alrededor del 85% de la población, es un antígeno eritrocítico sin relación con los antígenos A, B y O.

A diferencia de lo que ocurre para el sistema ABO, no existen isoanticuerpos contra el antígeno Rh. Sin embargo si una persona Rh negativa recibe eritrocitos Rh positivos, reaccionará y sintetizará anticuerpos contra el factor Rh.

Esto es peligroso cuando una mujer Rh negativa se embaraza y su esposo es Rh positivo, porque si el feto es genéticamente Rh positivo, cualquier sangre del feto que penetre en la circulación de la madre iniciará la formación de anticuerpos contra el factor Rh presente en los eritrocitos fetales. Estos anticuerpos serán del tipo IgG, razón por la cual cruzarán la placenta y reaccionarán con los eritrocitos fetales, y la culminación será una enfermedad hemolítica conocida como eritroblastosis fetal.

La exposición de una mujer Rh negativa a eritrocitos Rh positivos de su bebé no ocurre normalmente en concentraciones suficientes para inducir una reacción primaria sino hasta el momento del parto, por lo cual el primer hijo no sufre peligro alguno. Sin embargo, si en la mujer ocurre una respuesta primaria al antígeno Rh en el momento del parto, puede inducir una respuesta secundaria o anamnésica en fecha ulterior, en presencia de cantidades mucho menores del antígeno Rh. De este modo, el siguiente feto Rh positivo desencadenará los mecanismos de su madre para formar anticuerpos anti Rh que cruzarán la placenta y destruirán los eritrocitos del producto.

Para evitar esta complicación se utiliza el hecho de que un exceso de anticuerpo inyectado contra los eritrocitos Rh positivos reaccionará con ellos y los destruirá, y así evitará que en la madre se produzca una reacción primaria contra el factor Rh. Este procedimiento se realiza sistemáticamente en el momento del parto de mujeres Rh negativas con bebés Rh positivos.

Por fortuna, a pesar de que hay 27 especificidades conocidas de Rh, sólo un antígeno (Rh-D) es lo suficiente potente para estimular la síntesis de anticuerpos hemolíticos destructivos, y por ello en estos casos se utiliza antisuero contra D.

El conocimiento de los grupos sanguíneos es de gran importancia práctica porque facilita la ejecución de transfusiones sanguíneas. Lo conveniente es proporcionar siempre sangre del mismo grupo; sin embargo, en casos de urgencia, cuando no se dispone de ella puede recurrirse a una del grupo O (siempre y cuando no haya incompatibilidad Rh), razón por la



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	122 / 155

cual se denominan a las personas que poseen este tipo de sangre “Donadores universales”. Especialmente a los del grupo O negativo.

Si el individuo recibe sangre de un grupo diferente al suyo ocurre una reacción que puede ser mortal, con fiebre, postración e insuficiencia renal, a consecuencia de la hemólisis de eritrocitos transfundidos por los propios isoanticuerpos y complemento sérico del sujeto.

Es conveniente además y sobre todo en caso de transfusiones repetidas, practicar las pruebas cruzadas de compatibilidad: (eritrocitos del donador con suero del receptor, y suero del donador con eritrocitos del receptor) y así evitar dicho riesgo. Estas pruebas se efectúan antes de la transfusión para asegurarse que los hematíes del donante son compatibles con el receptor.

DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS

Aglutinógenos de los eritrocitos del donador

		Aglutinógenos de los eritrocitos del donador				
		AB	A	B	O	
Aglutininas						
Suero del receptor o suero tipificador	O	-	-	-	-	
	B	+	-	+	-	
	A	+	+	-	-	
	AB	+	+	+	-	



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	123 / 155

MATERIAL Y REACTIVOS POR EQUIPO

- 2 Lanceta estéril
- 2 portaobjetos
- 2 aplicador de madera
- Torundas con alcohol

MATERIAL Y REACTIVOS POR GRUPO

- 1 frasco de suero hemotipificador "A"
- 1 frasco de suero homotipificador "B"
- 1 frasco de suero hemotipificador Rh o D

SERVICIOS: Luz, agua.

PROCEDIMIENTO

Se limpiará el área (dedo) con una torunda, donde se puncionará con una lanceta estéril y se colocarán en un portaobjetos limpio, tres gotas de sangre separadas, en la primera gota de sangre se coloca una gota de suero anti –A, en la segunda gota de sangre, una gota de suero anti –B, y en la última, una gota de suero anti-D.

Posteriormente se mezcla con un aplicador de madera, cuidando que no se mezcle con las otras gotas de sangre.

RESULTADOS

Después de mezclarlos se observará en cual hubo aglutinación, reportándose como grupo sanguíneo "A" si hubo aglutinación en el suero anti-A, o como grupo sanguíneo "B" si hubo aglutinación con el suero anti-B, si aglutinan en ambos será grupo AB, y si no aglutina en ninguno de los dos será "O".

En la tercera gota donde se agrega anti – D, si aglutina, es Rh positivo, si no aglutina, Rh negativo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	124 / 155

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia de conocer nuestro grupo sanguíneo?
2. Enliste 3 grupos sanguíneos diferentes al A, B, O y Rh.
3. ¿Cuándo se requieren y cuál es la función de las pruebas cruzadas?
4. Defina aglutinación, precipitación y neutralización.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E: microbiología médica. 25a. ed. México: McGraw Hill Interamericana editores; 2011.
2. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10a. ed. México: Manual Moderno; 2002.
3. Rojas E. Inmunología (de memoria). 3a. ed. Médica Panamericana, 2006.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	125 / 155

Práctica No. 5

FIJACION DE COMPLEMENTO

OBJETIVO

El alumno demostrará y analizará los efectos de la fijación del complemento y la utilidad de las pruebas de fijación de complemento, en la práctica odontológica.

Para realizarla, el estudiante deberá revisar previamente las siguientes definiciones y temas:

1. Definición de complemento
2. Formas de activación del complemento

FUNDAMENTO TEORICO

El sistema de complemento (C), es uno de los mecanismos efectores más importantes de la respuesta innata.

Está constituido por más de 30 proteínas, muchos componentes del complemento son enzimas proteolíticas o proteasas, que circulan en formas funcionalmente inactivas conocidas como cimógenos. Estas proteínas son sintetizadas principalmente por el hígado, aunque también por otras células como macrófagos, células endoteliales, adipocitos, etc. Su activación puede ser por 3 vías: la vía clásica, la vía alterna y la de la lectina.

Existen activadores inmunológicos y no inmunológicos para activar al complemento.

El sistema de complemento es un conjunto de glucoproteínas, las cuales se encuentran en la circulación de los vertebrados en forma inactiva, constituyendo aproximadamente el 10% al 15% de las proteínas séricas.

Es un mecanismo de defensa específico cuando es activado por anticuerpos y un mecanismo inespecífico cuando es activado por algunos microorganismos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	126 / 155

El número asignado a las proteínas del complemento, refleja la secuencia en la cual se activa, a excepción de C4, el cual entra entre C1 y C2, quedando la secuencia de activación C 142356789.

Para que se lleve a cabo la activación del complemento por la vía clásica, requiere de una molécula de IgM (pentámero) ó 2 moléculas de IgG (monómero).

La molécula C1 consta de un complejo C1q, C1r y C1s.

C1qrs, se mantienen unidos por iones de Ca. Una vez activado actúa como proteasa sobre C4 y C2 que se rompen en dos fragmentos (C4b y C2a), C4 y C2 requieren la participación de magnesio y se transforma en (C4b2a), llamado C3 convertasa que actúa rompiendo a C3 en C3a y C3b. C3b se une a C3 convertasa y generando C5 convertasa (C4b2a3b) que rompe a C5 en C5a y C5b, C5b se une a C6 y C7 y genera el péptido de lisis reactiva que se une a la membrana se pegan C8 y C9 y empieza la lisis celular.

Existe un equilibrio delicado entre los microorganismos de la placa dental y la respuesta del huésped. En los individuos sanos, la respuesta inmunitaria proporciona defensa específica bien regulada contra la infiltración por sustancias de la placa. Los mecanismos destructores del tejido que, se considera, participan en la enfermedad periodontal, son: efectos directos de las bacterias de la placa, daño inducido por polimorfonucleares y daño por neutrófilos.

Las bacterias también pueden activar la vía alterna del complemento. En relación a la gingivitis, está la generación de un exudado sérico conocido como liquido crevicular, que fluye desde alrededor del diente y se pone en contacto con la placa dental. Este exudado, parecido al suero contiene componentes funcionales del complemento, así como concentraciones escasas de anticuerpos específicos contra varios antígenos de placa.

El inicio del flujo del líquido crevicular constituye un estado importante en el proceso de la enfermedad periodontal. El complemento del liquido crevicular se activa con rapidez por una combinación de efectos, como la activación de la vía clásica por anticuerpos IgG e IgM contra antígenos subgingivales de placa, activación de la vía alterna del complemento por endotoxinas y lipopolisacáridos de microorganismos Gram negativos y polisacáridos de Gram positivos, paredes de levaduras (zymosan), respectivamente, y activación de los componentes del complemento por enzimas proteolíticas del huésped y de las bacterias.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	127 / 155

La activación del complemento origina primero la liberación de C3a y C5a, que origina edema adicional e incremento en el flujo del líquido crevicular y por tanto, atracción quimiotáctica de leucocitos polimorfonucleares.

Los microorganismos de la placa producen directamente otros factores quimiotácticos. Se considera la liberación de enzimas proteolíticas con actividades tipo colagenasa y tripsina, por las células del huésped, daña los tejidos y activa componentes adicionales del complemento.

La inflamación de los tejidos de soporte de los dientes ocasiona uno de los tipos más frecuentes de enfermedades humanas. Según su gravedad, el proceso destructor puede abarcar las encías (gingivitis), así como el ligamento periodontal y el hueso alveolar que rodea y apoya el diente (periodontitis). La periodontitis puede incluir tanto efectos directos citotóxicos y proteolíticos de la placa dental, como las consecuencias patológicas indirectas de la respuesta inmunitaria del individuo a la presencia continua de los microorganismos de la placa bacteriana

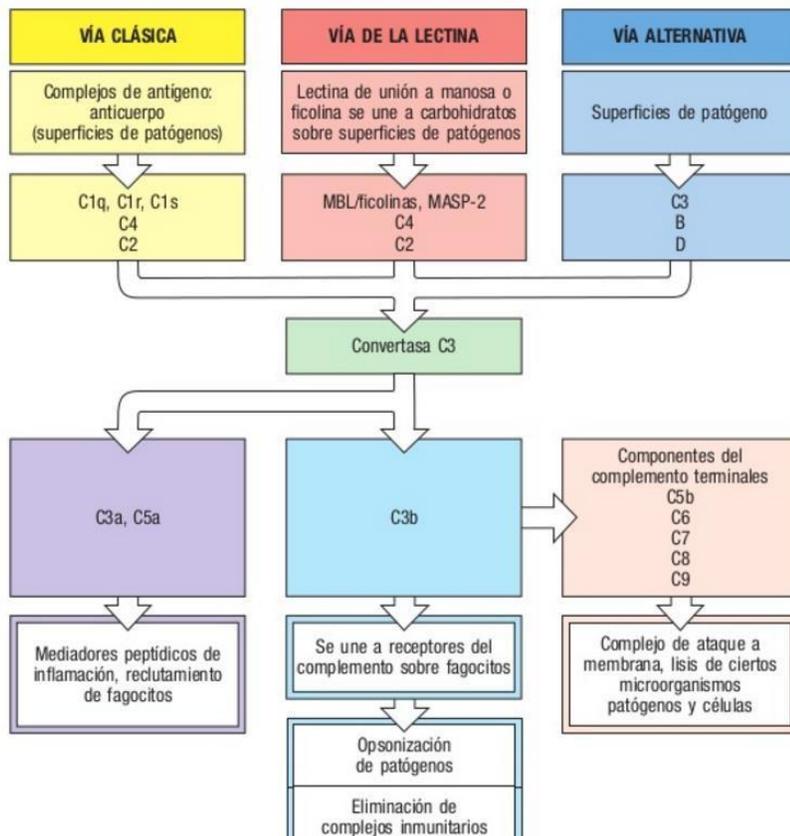


Fig. 2-25. Perspectiva de los componentes principales y de las acciones efectoras del complemento. En etapas tempranas en las tres vías de activación del complemento una serie de reacciones de división culmina en la formación de una enzima activa llamada convertasa de C3, que divide el componente del complemento C3 en C3b y C3a. La producción de la convertasa de C3 es el punto en el cual convergen las tres vías y se generan las principales funciones efectoras del complemento. C3b se une de modo covalente a la membrana de la célula bacteriana y opsoniza a las bacterias, lo que les permite a los fagocitos internalizarlas. C3a es un mediador peptídico de inflamación local. C5a y C5b se generan mediante la división de C5b por una convertasa de C5 formada por C3b unido a la convertasa de C3 (que no se muestra en este diagrama simplificado). C5a también es un potente mediador peptídico de inflamación. C5b desencadena los eventos tardíos en los cuales los componentes terminales del complemento se ensamblan para formar un complejo de ataque de membrana capaz de dañar la membrana de ciertos patógenos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	128 / 155

Actividades biológicas del complemento:

- 1.- Incremento en la permeabilidad vascular.
- 2.- Anafilotoxinas
- 3.- Quimiotaxis
- 4.- Oponización y endocitosis
- 5.- Adherencia inmune
- 6.- Lisis reactiva

En la prueba de fijación de complemento se usan dos sistemas de reactivos además del suero. Al primer sistema le llamamos sistema problema y al segundo sistema indicador, constituido por una suspensión de eritrocitos sensibilizados con hemolisina.

MATERIAL Y REACTIVOS

Hemolisina 2U 100 % hemolíticas
Complemento 2U 100 % hemolíticas
Zymosan 10 mg/ml.
Glóbulos rojos de carnero al 1% en TBS
Solución salina amortiguada de trietanolamina TBS fría.
4 pipetas de 1 ml.
3 tubos de 13x100
1 gradilla
Centrífuga

SERVICIOS: Luz, agua



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	129 / 155

PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar una gradilla 3 tubos de ensaye de 13x100
- 2.- Colocar en cada tubo los siguientes reactivos de acuerdo con la tabla de desarrollo

TUBO	ZYMOSAN ml.	SUERO ml.	I	GRC ml.	HEMOLISINA ml.	II	TBS FRIO ml.
1	0.25	–	Sistema de revelado	0.25	0.25	Detener reacción	1.25
2	0.25	0.25		0.25	0.25		1.0
3	–	0.25		0.25	0.25		1.25

Tabla de desarrollo I y II son incubaciones a 37° C por 15 minutos, centrifugar a 1500 rpm durante 1 minuto después de agregar el TBS.

RESULTADOS

Observar en que tubos hay lisis o no lisis de eritrocitos.

Cuando el sistema de prueba se fija al complemento, el sistema indicador no sufre lisis (la prueba de fijación de complemento es positiva) el líquido del tubo se observa transparente y en la base estarán los eritrocitos sedimentados, en cambio cuando en el sistema de prueba no se fija el complemento, se presenta lisis, el líquido esta rojizo y no hay eritrocitos en la base del tubo, la prueba por tanto es negativa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	130 / 155

Cuestionario

- 1.- ¿Cuáles componentes del complemento están en el flujo gingival?
- 2.- ¿La concentración de estos es suficiente para desencadenar la reacción de fijación del complemento?
- 3.- ¿Qué sustancias presentes en cavidad oral pueden desencadenar la fijación de complemento por la vía alterna?
- 4.- Diga a que se le conoce como lisis reactiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Inmunología: fundamentos. 12a. ed. Médica panamericana;2014.
2. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E: microbiología médica. 25a. ed. México: McGraw Hill Interamericana editores; 2011.
3. Murphy k. Travers P, Walport M. Inmunología de Janeway. 7ª. Ed. México: Mc Graw Hill- Interamericana; 2010.
4. Parham P. El sistema Inmune. 3ª ed. México: Manual Moderno; 2011.
5. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10ª ed. México: Manual Moderno; 2002.
6. Roja E. Inmunologia (de memoria).3a. ed. México: Panamericana; 2006.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	131 / 155

Práctica No. 6

CHOQUE ANAFILACTICO

OBJETIVO

El alumno estudiará y comprenderá las reacciones de hipersensibilidad haciendo énfasis en el choque anafiláctico que puede conducir al paciente hasta la muerte si no se actúa rápida y eficazmente. El conocimiento de los factores que ocasionan esta reacción, los signos y síntomas iniciales harán la diferencia entre la vida y la muerte del paciente.

Para realizar esta práctica, el alumno deberá revisar previamente lo siguiente:

1. Defina hipersensibilidad.
2. Mencione la clasificación de hipersensibilidad.
3. Mencione que inmunoglobulina interviene en la reacción de hipersensibilidad.
4. Que células intervienen en esta reacción.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Existe una pequeña proporción de individuos que desarrollan una respuesta inmune adaptativa exagerada frente a sustancias que son inofensivas para el resto de la población. Este tipo de respuestas inmunes frente a sustancias extrañas no infecciosas puede producir una patología clínica que se conoce como reacción alérgica, reacción de hipersensibilidad o simplemente alergia (que significa respuesta anormal y excesiva).

Existen otros términos utilizados: atópica (fuera de lugar) o intolerancia (para alimentos). A los antígenos extraños inofensivos que desencadenan las reacciones de hipersensibilidad tipo I o anafiláctica se les denomina alérgenos.

Las alergias se caracterizan porque generalmente el primer contacto con el alérgeno no origina ningún tipo de reacción, ya que los alérgenos son catabolizados rápidamente (a diferencia de los patógenos, que se multiplican en el foco infeccioso). Por ello el primer contacto o fase de sensibilización no produce ningún tipo de manifestación clínica, aunque sí se generan células de memoria específicas para ese alérgeno, de tal forma que tras una reexposición al mismo alérgeno se producirá la reacción alérgica con sintomatología clínica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	132 / 155

Las respuestas de hipersensibilidad se pueden definir como una reacción o respuesta exagerada del organismo ante un antígeno previamente conocido o desconocido.

Coombs las ha clasificado en inmediatas, mediatas y tardías.

Clasificación	Hipersensibilidad	Tiempo
Inmediata	Tipo I	Menos de 5 minutos
Mediata	Tipo II y III	De 30 minutos a 1 hora
Tardía	Tipo IV	De 24 a 72 horas Hasta 28 días

Tipo de reacción	Manifestación	Mecanismo
I	Reacciones de hipersensibilidad inmediata (anafilaxia)	IgE, células cebadas y basófilos
II	Anticuerpos citotóxicos	IgM e IgG
III	Complejos antígeno-anticuerpo	IgM, IgG, células fagocíticas, linfocitos NK, y componentes de complemento
IV	Hipersensibilidad tardía mediada por células	Linfocitos T sensibilizados

Como podemos ver en el cuadro anterior el choque anafiláctico pertenece a las reacciones de tipo I y el anticuerpo que interviene es la IgE o reagina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	133 / 155

Existen diversas sustancias que pueden desencadenar esta reacción como son:

- Medicamentos (anestésicos, antibióticos, analgésicos, vitaminas, etc.)
- Alimentos (huevo, leche, marisco, etc.)
- Insectos (picadura de insectos como abejas, arañas, etc.)
- Productos de la naturaleza (polen, polvo, pelos de animales, plumas de aves, etc.)

El término alergia fue introducido en 1906 por Clemens Von Pirquet, definiéndola como una capacidad alterada del cuerpo a reaccionar contra una sustancia extraña. Hoy en día la definición de alergia es mucho más estricta, siendo la enfermedad provocada por la respuesta del sistema inmunitario contra antígenos comúnmente inocuos.

A su vez el término hipersensibilidad fue utilizado por primera vez para describir el estado de un organismo mamífero posterior a la exposición de un agente nocivo. El mamífero se vuelve "hipersensible" contra ese agente y por lo tanto es capaz de responder con mayor fuerza a una segunda exposición.

Gell y Coombs en 1963 desarrollaron una forma de clasificar las reacciones de hipersensibilidad, la cual ha sido ampliamente aceptada hasta la actualidad. Esta clasificación divide a la hipersensibilidad en cuatro tipos principales: tipo I, o hipersensibilidad inmediata (anafiláctica); tipo II, o citotóxica mediada por anticuerpos; tipo III o de complejos inmunes y tipo IV, retardada o mediada por células.

La anafilaxia es una reacción inmunitaria generalizada del organismo, una de las más graves complicaciones y potencialmente mortales, se produce en una variedad de situaciones clínicas y es casi inevitable en la práctica médica. Con mayor frecuencia, es el resultado de reacciones inmunológicas a los alimentos, medicamentos, picaduras de insectos, etc., pero puede ser producida por la exposición a un agente capaz de inducir una degranulación repentina, sistémica de mastocitos o basófilos.

La anafilaxia, es una reacción alérgica sistémica grave causada por la liberación de histamina y otros mediadores químicos (serotonina, factor quimiotáctico de la anafilaxia, sustancias de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A) llamados leucotrienos, factor quimiotáctico de eosinófilos de la anafilaxia (ECF-A), y el factor activador de plaquetas (PAF)), que provocan una variedad de signos y síntomas, de los cuales los más graves son edema laríngeo, obstrucción de vía respiratoria inferior e hipotensión. Las causas comunes de anafilaxia son: la sensibilidad a alimentos mediada por IgE (p. ej., cacahuete,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	134 / 155

nueces, pescados, mariscos y productos lácteos), picadura de abeja y avispa, consumo de medicamentos y contacto con látex. El tratamiento de la anafilaxia involucra la rápida administración de adrenalina (epinefrina), ya que esta inhibe la liberación de las aminas vasoactivas (histamina) en minutos. Este tratamiento puede ser seguido de la administración de antihistamínicos, corticoesteroides y broncodilatadores.

Inmunoglobulina E

De las inmunoglobulinas es la menos abundante, carece de las cualidades de las inmunoglobulinas antes mencionadas, sin embargo, la IgE tiene un interés especial ya que es el anticuerpo responsable de las reacciones de alergia, esto debido a que las células cebadas y basófilos expresan un receptor de alta afinidad al Fc de IgE ocasionando que las células liberen el contenido de sus gránulos y se presenten los síntomas de la reacción alérgica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	135 / 155

TABLA 1

Manifestaciones clínicas de la anafilaxia

Órgano o sistema involucrado	Signos y síntomas dominantes
1. Cardiovascular	Taquicardia, arritmias, hipotensión, colapso vascular, paro (Infarto de miocardio).
2. Respiratorio	Estornudos, rinorrea, ronquera, disfonía, estridor laríngeo, sensación de cerrazón de garganta, edema de vías aéreas superiores (lengua, úvula, paladar blando, faringe, laringe) taquipnea, broncoespasmo, apnea, asfixia.
3. Piel	Prurito palmoplantar inicial y luego generalizado, eritema, urticaria, angioedema.
4. Gastrointestinal	Náusea, vómitos, cólicos, dolor abdominal, desposiciones acuosas o sanguíneas, incontinencia urinaria.
5. Genitourinario	Cólicos uterinos, incontinencia urinaria.
6. Nervioso	Convulsiones sensación de “muerte inminente”, pérdida de la conciencia.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	136 / 155

El tratamiento de choque anafiláctico debe iniciarse rápidamente de la siguiente manera:

1. Aplicar epinefrina acuosa 1: 1000 I.M (repetir la dosis a los 15 o 30 minutos si es necesario).
2. Localizar vena y canalizarla con alguna solución (Hartmann, glucosada al 5%, solución salina, entre otras.)
3. Colocar al paciente en posición de Trendelenburg
4. Si tenemos oxígeno aplicarlo al paciente 3 Lts.
5. Administrar antihistamínico I.V.
6. Administrar corticoesteroides I.V.
7. Solicitar apoyo de una ambulancia
8. Administrar broncodilatadores I.V ó inhalados si hay conciencia.
9. Trasladar al paciente en ambulancia a un centro hospitalario, para su control.

MATERIAL POR GRUPO

Video grabación:

Observar cuidadosamente el video en donde se utiliza como modelo animal al cobayo, ya que reacciona de manera muy similar al humano y el órgano de choque para ambos es el pulmón. Tomar el tiempo que transcurre entre la aplicación del antígeno y la muerte del animal, observar los signos y síntomas.

SERVICIOS: Luz

RESULTADOS

Discutir la importancia del diagnóstico oportuno de choque anafiláctico y las formas de prevenir estos eventos en el consultorio dental con el apoyo de una buena historia clínica y un correcto manejo de la farmacología para casos de emergencia (carro rojo).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	137 / 155

Cuestionario

1. ¿Con que sustancias del consultorio dental se puede desencadenar un choque anafiláctico?
2. ¿Qué mediadores químicos se liberan en esta reacción y que órgano o sistema ataca cada uno de ellos?
3. Que medicamentos deben existir en el carro rojo del consultorio dental (nombre comercial y genérico).
4. ¿Cuál es la dosis de cada medicamento utilizado en caso de choque en niños y en adultos?

BIBLIOGRAFÍA

1. Arce MAY. Inmunología e inmunopatología oral. México: Manual Moderno; 2010.
2. Echeverría ZLA, Del Olmo de la lama MR, Santana RC. Anafilaxia en pediatría. Protoc diagn ter pediatr. 2013;1:63-80.
3. Murphy k, Travers P, Walport M. Inmunología de Janeway. 7a. ed. México: Mc Graw Hill- Interamericana; 2010.
4. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10a. ed. México: Manual Moderno; 2002.
5. Regueiro GJR, Lopez LC. Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario. 4a. ed. Médica Panamericana S.A.; 2010.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	138 / 155

Práctica No. 7

ANTIESTREPTOLISINAS

OBJETIVO

El alumno demostrará y analizará la actividad protectora de los anticuerpos antiestreptolisina O.

Para realizar esta práctica, el estudiante deberá revisar previamente los siguientes temas:

1. Enfermedades sistémicas en las que están involucrados los estreptococos.
2. Toxinas de importancia odontológica que producen los estreptococos.
3. Saber qué son las antiestreptolisinas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los estreptococos producen muchos tipos de enzimas extracelulares y toxinas, algunas de las cuales están involucradas en la patogénesis de muchas clases de enfermedades, dentro de estas sustancias están: estreptoquinasa, estreptodornasa, estreptolisinas S y O, toxina eritrogénica, proteinasas, hialuronidasa, difosfopiridín nucleotidasa, amilasa y esterases.

Los estreptococos son cocos Grampositivos, encontrándose algunos patógenos para el hombre. Dentro de las enfermedades más importantes en las que están involucrados los estreptococos, tenemos las siguientes: fiebre reumática, faringitis, impétigo, meningitis, glomerulonefritis, fiebre puerperal, septicemia, endocarditis subaguda y caries.

La fiebre reumática (FR) es una enfermedad inflamatoria sistémica, caracterizada por la existencia de lesiones que afectan al corazón, articulaciones, sistema nervioso central, piel y tejido celular subcutáneo, como secuela de una infección faríngea por estreptococo beta hemolítico del grupo A. Ciertas cepas de estreptococos del grupo A contienen antígenos en la membrana celular que dan reacción cruzada con los antígenos del tejido cardiaco humano, iniciándose el daño con afectación de las válvulas de dicho órgano.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	139 / 155

El inicio de la fiebre reumática va precedido a menudo por infección estreptocócica del grupo A, de una a cuatro semanas antes, aunque esta infección puede ser muy benigna y pasar inadvertida. Esta enfermedad presenta una marcada tendencia a ser reactivada por infecciones estreptocócicas recurrentes.

Los sueros de pacientes con fiebre reumática, contienen anticuerpos contra estos antígenos.

Principales características inmunológicas:

- Ocurre después de la infección por el estreptococo β hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*).
- Presencia de anticuerpos circulantes dirigidos a los tejidos cardiacos por una reacción cruzada inducidos por la presencia del *Streptococcus pyogenes*.
- Depósito de inmunoglobulinas y de complemento en los tejidos valvulares y el miocardio.

La enfermedad habitualmente ocurre en niños entre 5 y 15 años de edad. Sólo se presenta después de infecciones bucofaríngeas estreptocócicas repetidas y por lo general, no está asociada con las infecciones estreptocócicas de la piel.

El odontólogo puede encontrar restos o secuelas de la fiebre reumática entre sus pacientes. Cuando existe daño de las válvulas cardiacas o el paciente es portador de prótesis valvulares, se requiere profilaxis antibiótica para tratamientos invasivos como protección contra una posible endocarditis bacteriana subaguda que puede ser resultado de una bacteriemia.

Para realizar el diagnóstico, no sólo se debe apoyar en la sintomatología; existen pruebas auxiliares de laboratorio, como es la prueba de cuantificación de antiestreptolisinas, exudado faríngeo, proteína C reactiva, VSG (velocidad de sedimentación globular) y factor reumatoide.

Los criterios de Jones para el diagnóstico de la fiebre reumática, son útiles. La presencia de dos criterios mayores o de un criterio mayor y de dos criterios menores, junto con la evidencia sintomática y de laboratorio de infección reciente por estreptococos, es altamente sugestiva de fiebre reumática. La corea de Sydenham es diagnóstico de fiebre reumática en ausencia de cualquiera de otros criterios mayores o menores. (Cuadro 1)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	140 / 155

Criterios mayores	Criterios menores
Aritritis	Artralgia
Carditis	Fiebre
Corea de Sydenham	Fatiga
Nódulos subcutáneos	Malestar general
Eritema marginado	Fiebre reumática previa
	Cualquiera de éstos:
	Intervalo P-R prolongado en el ECG
	Aumento de la velocidad de sedimentación globular.
	Aumento en el nivel de proteína C reactiva.
	Leucocitosis
	Determinación de antiestreptolisinas

Cuadro 1: Criterios de Jones para el diagnóstico de fiebre reumática.

No hay prueba de laboratorio específica para el diagnóstico de la fiebre reumática. La evidencia de infección estreptocócica previa puede ser obtenida mediante pruebas serológicas. Virtualmente todos los enfermos con fiebre reumática tienen anticuerpos para los antígenos estreptocócicos, aunque la elevación del título de anticuerpos no tiene relación con la gravedad de la enfermedad. La mayoría de los individuos normales tienen bajos títulos de anticuerpos antiestreptocócicos. Por lo tanto la evidencia de infección reciente descansa en que se pueda demostrar la elevación en los títulos de los anticuerpos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	141 / 155

Una sola determinación de anticuerpos antiestreptolisina O (ASO) es de poco valor diagnóstico. Las titulaciones practicadas con intervalos de dos semanas, durante cuatro a seis semanas posteriores a la infección estreptocócica, proporcionan una mejor información. Una sola titulación de ASO con título de 125 unidades Todd no proporciona por si sola gran información; sin embargo, si este representa una elevación a partir de un título de 50 unidades, éste se indicará una infección estreptocócica, o que hubo infección recientemente. Una caída de un título de 250 unidades a 125 indicará curación o remisión de la infección.

Niños de 0-2 años de edad	Menor a 50 U Todd
Niños entre 2-5 años	Menor a 100 U Todd
Niños de 5-19 años de edad	Menor de 166 U Todd.
Adultos	Menos de 125 U Todd.

Fuente: Angel MG, Angel RM. Interpretación clínica del laboratorio. 6ª. ed. Colombia: Medica panamericana; 2000.

Título alto no es específico para determinada enfermedad, sólo indica infección recurrente por estreptococos. Los títulos se modifican en la convalecencia siendo inferiores cuando el tratamiento es acertado. Los niveles altos de beta-lipoproteína dan falsos resultados elevados y los antibióticos y corticoesteroides disminuidos. En amigdalitis, sepsis puerperal, erisipela por estreptococos los títulos están elevados.

MATERIAL Y REACTIVOS

6 tubos de 13 x 100

1 jeringa estéril de 10 ml

1 frasco de estreptolisina O

4 pipetas de 1 ml

Solución salina amortiguada pH 7.4

Suspensión de eritrocitos humanos al 5% en solución salina amortiguada

Incubadora a 37°C

Centrifuga

SERVICIOS: Luz, agua.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	142 / 155

PROCEDIMIENTO

- Obtener 5 ml. de sangre por punción venosa, deja coagular y obtener el suero.
- Usar 2 tubos para hacer dilución del suero: dilución 1:10 (0.5 ml de suero más 4.5 ml de solución salina amortiguada) y dilución 1: 500 (0.1 ml de la dilución 1:10 más 4.9 de solución salina amortiguada).

Preparar los tubos de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubo	Suero (mL)	SSA (mL)	Estreptolisina (mL)		Suspensión de eritrocitos (mL)	
1	1 (1:10)		0.5	I	0.5	II
2	1 (1:500)		0.5		0.5	
3		1	0.5		0.5	
4		1			0.5	

I y II son incubaciones a 37°C por 15 minutos.

El título de ASO se expresa en unidades Todd. Estas unidades son la recíproca de la dilución más alta del suero que neutraliza completamente la estreptolisina O.

RESULTADOS

Debe observarse si hay hemólisis o no. Si el suero neutraliza completamente la estreptolisina O, la hemólisis no se presenta. La hemólisis se observa cuando el líquido del tubo tiene coloración rojiza y en la no hemólisis el líquido es transparente y en la base del tubo hay un botón de eritrocitos rojos y brillantes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	143 / 155

Cuestionario

1. ¿Qué actividad presenta la estreptodornasa?
2. ¿Por qué en el diagnóstico de fiebre reumática es valioso el dato del título de antiestreptolisinas O (ASO)?
3. ¿Qué papel juega la proteína M del *Streptococcus pyogenes*?
4. Enumere los criterios mayores y menores para el dx de fiebre reumática.
5. ¿Qué inmunoglobulinas intervienen en fiebre reumática?

BIBLIOGRAFÍA

1. Davidsohn I, Henry JB. Todd- Sanford - Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a. ed. Barcelona: Salvat; 1982. IMSS. Laboratorio clínico. Procedimientos. México. 1978.
2. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E: microbiología médica. 25a. ed. México: McGraw Hill Interamericana editores; 2011.
3. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10a. ed. México: Manual Moderno; 2002.
4. Rojas EO. Inmunología (de memoria), 3ª. ed. México: Médica Panamericana, 2006.
5. Ros J. Fiebre reumática y artritis post estreptocócica. Protoc Diagn Ter Pediatr. 2014;1:165-75



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	144 / 155

Práctica No. 8

Determinación de anticuerpos heterófilos como diagnóstico de la mononucleosis infecciosa.

Objetivo.

Identificar en suero o saliva la presencia de anticuerpos heterófilos, como indicador de mononucleosis infecciosa, mediante aglutinación activa o directa.

Para realizar esta práctica, el estudiante deberá revisar previamente los siguientes temas:

- 1.- Enfermedades que producen el virus Epstein Barr.
- 2.- Requisitos que deben cubrir los donadores de órganos.
- 3.- Fundamento de la presencia de anticuerpos de reacción cruzada.

Fundamento Teórico.

Los antígenos de reacción cruzada son antígenos que tienen diferentes fuentes y una semejanza estructural entre ellos. En la fiebre reumática y en la glomerulonefritis-enfermedades no supurativas post estreptocócicas- los anticuerpos que se generan contra el *Streptococcus pyogenes* reaccionan contra estructuras de válvulas cardíacas en fiebre reumática y contra estructuras de glomérulos en glomerulonefritis, a estas estructuras se les conoce como antígenos de reacción cruzada y la capacidad para la elaboración de estos anticuerpos se presenta solo en algunos individuos. Otros ejemplos de este tipo de antígenos, son los carbohidratos del grupo sanguíneo A, que dan reacción cruzada con el polisacárido capsular neumocócico tipo XIV, y los del grupo sanguíneo B, con antígenos de *Escherichia coli*. También se encuentran en los llamados anticuerpos heterófilos -que aparecen durante la mononucleosis infecciosa- su presencia es un indicador útil para establecer el diagnóstico de esta infección, a través de una técnica de aglutinación directa o activa poniendo a reaccionar el suero o saliva de éstos pacientes con eritrocitos de caballo que poseen la estructura similar al virus que produce la infección generando una reacción cruzada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	145 / 155

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad de distribución mundial, causada por el virus de Epstein-Barr (VEB), es un herpesvirus (ADN virus), el cual infecta linfocitos B humanos. Esta enfermedad se presenta como un trastorno linfoproliferativo agudo por lo general, autolimitado y benigno. En individuos con inmunodeficiencias se convierte en una enfermedad grave, esta se manifiesta clínicamente con fiebre, linfadenopatía, adenomegalia, esplenomegalia y linfocitosis. El título de anticuerpos heterófilos en la mononucleosis infecciosa se eleva en la primera semana de la enfermedad, alcanza un máximo a las dos semanas y permanece alto hasta por aproximadamente 6 semanas. La presencia de éstos anticuerpos pueden aparecer tardíamente en la enfermedad y el retraso en la aparición de estos se asocia con convalecencias prolongadas que una vez resuelto el cuadro clínico, los títulos de anticuerpos pueden permanecer durante meses o incluso años.

Los anticuerpos heterófilos se encuentran en 80-90% de los pacientes que padecen mononucleosis infecciosa, también los encontramos en ciertos tipos de leucemias, linfoma de Burkitt y enfermedad de Hodgkin (linfomas que está fuertemente asociado a la infección por VEB), hepatitis viral, lupus eritematoso sistémico y en enfermedad del suero originada por faboterapia, esto debido a que en México la mayor parte de los sueros usados en esta seroterapia provienen de caballos inmunizados deliberadamente con toxoides y venenos.

La detección de anticuerpos heterófilos, se realiza en aquellos individuos que van a donar órganos, para evitar que éstos sean portadores del virus de la mononucleosis infecciosa.

Material y reactivos.

Guantes

Recipiente para la eliminación del material biológico.

Muestra (Saliva, suero o plasma) 1 mL.

Suspensión de glóbulos rojos de caballo al 1% en PBS, 100 mL.

Solución salina amortiguadora de fosfato (PBS), 250 mL.

10 mL del testigo positivo del ensayo (Anticuerpos de conejo anti- glóbulos rojos de caballo).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	146 / 155

Placa de micro hemaglutinación de 96 pozos con fondo en V.

Micropipetas tipo manual de 50 a 100 μ L ó bien micro dilutores de 50 μ L.

Puntas para micropipeta.

Procedimiento.

1. Se colocan en la fila A del pozo 1 al 12, 50 μ L de PBS.
2. En el pozo 1 colocar 50 μ L de la muestra y realizar diluciones al doble usando volúmenes de 50 μ L, mezclando bien en cada paso, hasta el pozo número 11, desechar los últimos 50 μ L para que cada pozo tenga el mismo volumen. El pozo 12 lleva solo PBS (testigo negativo).
3. Para la fila B repetir el mismo procedimiento usando el suero de conejo anti-glóbulos rojos de caballo (testigo positivo del ensayo).
4. Adicionar 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos de caballo a todos los pozos, se mueve la placa en forma horizontal para mezclar.
5. Incubar 30 minutos a 37°C.
6. Leer la aglutinación y reportar el título que es la inversa de la dilución hasta donde hay aglutinación. Por ejemplo, positivo hasta el pozo número 4, como las diluciones son al doble el título será 16.

Ejemplo:

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												

En este ejemplo en la fila A el pozo No. 6 es el primero que se parece al pozo No.12 (testigo), por lo tanto, el título de anticuerpos será el encontrado en el pozo No. 5, tomando en cuenta la dilución que hay en ese pozo No. 5.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	147 / 155

Resultados.

Se observará un título muy alto en el carril donde se colocó el testigo positivo del ensayo, lo que permitirá al alumno identificar las características que presenta una reacción de hemaglutinación.

Los títulos en saliva serán más bajos que los encontrados en plasma o suero, en aquellos individuos infectados con la enfermedad activa o portadores de la mononucleosis infecciosa.

Los individuos que recibieron faboterapia darán falsos positivos.

Cuestionario.

1. ¿Cuál es la diferencia entre una precipitación y una aglutinación?
2. ¿Cuántos tipos de aglutinación existen?
3. ¿Qué manifestaciones en boca se presentan durante la mononucleosis infecciosa?
4. ¿Por qué es importante que los donadores de órganos estén libres del virus Epstein-Barr?

Bibliografía.

1. Brooks, G.F., Carrol K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A. (2010). Herpesvirus. (Ed.25), *Jawetz, Mielnick y Adelberg Microbiología Médica* (capítulo 33). México: Mc Graw Hill Interamericana.
2. Drew L.W. (2007). Virus del herpes. (Ed.4), *Ryan K.J., Ray C.G. Microbiología Médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas* (capítulo 38). México: Mc Graw Hill Interamericana.
3. Sumaya, C.V., Jenson, H.B. (2002) Epstein-Barr virus. (Ed.), Rose, N.R., Friedman, H., Fahey J.L., *Manual of Clinical Laboratory Immunology..* Washington D.C. : American Society for Microbiology.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	148 / 155

Práctica No. 9

DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS EN SALIVA Y SUERO CONTRA CEPAS POTENCIALMENTE CARIOGÉNICAS Y SU RELACIÓN CON EL ÍNDICE C.P.O.

OBJETIVO

Al finalizar la práctica, el estudiante establecerá la relación que existe entre la presencia de microorganismos cariogénicos, la presencia de anticuerpos en saliva y suero contra estos microorganismos y el índice de caries.

Para realizar la práctica, el alumno deberá revisar previamente los siguientes temas:

1. Microorganismos que son cariogénicos
2. Definición de caries dental integrando el área biológica, clínica y social
3. Factores que intervienen en el proceso de caries dental

FUNDAMENTO TEÓRICO

Al ser la última práctica inmunológica, el alumno conoce ya los mecanismos de defensa de nuestro organismo en general y en cavidad bucal de manera más específica, por lo que podría relacionar estos mecanismos de defensa con el proceso de caries, mediante una microtécnica inmunológica.

Existen varios estudios sobre la producción de anticuerpos y la actividad de estos en los procesos de caries mediante el levantamiento del índice CPO.

En 1980. Challacombe y Kennedy informaron que los sujetos libres de caries tuvieron una concentración elevada de anticuerpos en suero pero no en saliva hacia el antígeno de la pared celular de estreptococos cariogénicos.

Por otro lado, Meneses y col. realizaron un estudio en donde encontraron en un total de 139 adolescentes entre 12 y 15 años de edad, que las mujeres presentaron un mayor número de dientes cariados, así como mayor grado de infección por *Streptococcus*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	149 / 155

mutans y más alto título de anticuerpos de tipo IgA salival contra antígenos I/II de este microorganismo, así como en toda la población que a mayor número de dientes cariados, un mayor título de anticuerpos IgA salivales para antígenos I/II de *Streptococcus mutans*.

Otro estudio realizado por González y col. en niños de 0 a 180 días de edad donde identifican anticuerpos salivales de tipo IgA e IgG contra *Streptococcus mutans* en saliva, reporta que los niveles de estos anticuerpos disminuyen gradualmente en los niños al aumentar la edad, también que los niveles de IgA en saliva en los niños estudiados, son mayores comparados con los de IgG en todos los grupos de edad y que los niveles de ambos anticuerpos contra *S. mutans*, son mayores en el género masculino comparados con el género femenino.

La inquietud de elaborar una vacuna para impedir el desarrollo de caries dental, surge en Inglaterra, en la década de los 70's en el Guy's Hospital por Lehner y Challacombe, quienes elaboran una vacuna que aplicaron a monos Rhesus, y este trabajo se continuó por Julian Ma y su equipo de trabajo, quienes elaboraron una vacuna para caries dental a partir de IgA anti antígeno I/II de plantas de tabaco.

La técnica que se utilizará en esta práctica para conocer el título de anticuerpos, es la de microtitulación, la reacción antígeno/anticuerpo que observaremos será la de aglutinación pasiva.

Se llama aglutinación pasiva a la reacción antígeno/anticuerpo donde se requiere de un acarreador o soporte para hacer visible la reacción, en este caso el acarreador o soporte son glóbulos rojos de carnero a los cuales se les unió el antígeno. En este caso los antígenos serán los carbohidratos de las paredes celulares de las bacterias cariogénicas que utilizaremos.

El anticuerpo a identificar en saliva, será de tipo IgA, la cual tiene dentro de sus funciones antibacterianas:

a.- Reducir la hidrofobicidad del *Streptococcus mutans* evitando su adherencia a la película salival (la hidrofobicidad, es una fuerza que permite la interacción entre grupos hidrofóbicos y eso permite que las bacterias se unan entre sí y eso les ayude a colonizar, la reduce uniéndose a cualquier antígeno de superficie de estas bacteria impidiéndoles adherirse).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	150 / 155

b.- Bloquear la unión que les permite unirse a los colonizadores tempranos por la interacción adhesina- receptor ante Ag I/II.

c.- Interferir en la acumulación de placa dependiente de sacarosa inhibiendo la producción de glucanos, mediante el bloqueo a la enzima GTF y la adherencia.

d.- Inhibe la producción de ácidos y otras actividades metabólicas, como la adquisición de Hierro, que es nutriente esencial para las bacterias.

Del mismo modo en suero de encontrarán anticuerpos de tipo IgG los cuales cumplen las siguientes funciones:

a.- Bloquear los determinantes de adherencia

b.- Aglutinar bacterias

c.- Inhibir enzimas bacterianas

d.- Destruir bacterias (bacteriolisis)

e.- Quimiotáxis y opsonización de bacterias

f.- Inducir la inflamación de los tejidos gingivales, con el incremento de la permeabilidad vascular.

MATERIAL Y REACTIVOS POR GRUPO

- Placa de microtitulación
- Micropipetas de 50 μ L
- 2 Tubos de ensaye
- Saliva y suero de un mismo donador (de preferencia con caries activa)
- Baño maría
- PBS (solución amortiguadora de fosfatos)
- Jeringas de 5 ml
- Antígeno Carbohidrato de *S. mutans*
- Antígeno Carbohidrato de *S. sanguis*
- Microdilutores
- Mechero
- Centrifuga
- Alcohol

} Pegados a glóbulos rojos de carnero



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	151 / 155

SERVICIOS: Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

1. Extraer 5 ml de sangre de un compañero y separar el suero.
2. Pedir al mismo donador 3 ml de saliva, filtrarla
3. Incubar ambas muestras en baño María a 62° C por 3 minutos para inactivar el complemento.
4. Colocar con otra micropipeta una gota (50µl) de PBS en cada uno de los pozos (1 a 12) de la placa de microtitulación en las hileras A,B.
5. Colocar con otra micropipeta una gota (50µl) suero en el pozo No. 1 hilera A.
6. Introducir un microdilutor flameado y frío en el pozo No. 1 hilera A y girarlo sin tocar el fondo ni las paredes del pozo 15 veces (como si fuese un molinillo).
7. Pasarlo cuidadosamente e introducirlo en el pozo No. 2 de la misma hilera, girándolo 15 veces aproximadamente.
8. Realizar el mismo procedimiento para los siguientes pozos hasta el No. 11.
9. No hacer nada en el pozo No. 12, ya que será el testigo negativo.
10. Flamear el microdilutor.
11. En la hilera B pozo No. 1 agregar una gota (50µl) de saliva y repetir los pasos 6 a 9. En caso de tener dos donadores (Antígenos) a probar tomar dos hileras más por ejemplo C y D y realizar los pasos 1 a 11.
12. Colocar con otra micropipeta en los pozos del 1 al 12 una gota (50µl) de glóbulos rojos con el antígeno pegado en ambas hileras A y B (si estamos utilizando las hileras C y D hacer el mismo procedimiento).
13. Incubar a 37° C por 2 ó 3 horas y leer los resultados.

Realizar la lectura tomando como referencia lo que se observa en el pozo 12 de cada hilera ya que este es un testigo negativo, de acuerdo a su lectura observe los pozos del 1 en adelante hasta que encuentre una reacción igual a la del pozo 12, el resultado será el pozo anterior al que encuentre con esa característica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	152 / 155

EJEMPLO:

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												

En este ejemplo en la fila A el pozo No. 6 es el primero que se parece al pozo No.12 (testigo), por lo tanto, el título de anticuerpos será el encontrado en el pozo No. 5, tomando en cuenta la dilución que hay en ese pozo No. 5. Las diluciones van de la siguiente manera pozo No. 1 dilución 1:2, pozo No. 2 dilución 1:4, hasta llegar al pozo número 11 con la dilución 1:2056.

RESULTADOS

- Observar y analizar los títulos de anticuerpos encontrados en la muestra de saliva y en la de suero, comparar estos resultados y relacionarlos con el índice CPO y con el número de caries activas que presenta el donador.

Cuestionario

1. Mencione porque no se había podido producir una vacuna contra caries dental producida por *Streptococcus mutans*.
2. Mencione las características antigénicas de *Streptococcus mutans*.
3. ¿Por qué es necesario inactivar el complemento en esta práctica?
4. Mencione por lo menos dos funciones antibacterianas de IgA.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	153 / 155

BIBLIOGRAFÍA

1. Regueiro GJR, Lopez LC. Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario. 4ª. ed. Médica Panamericana S.A.; 2010.
2. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10a. ed. México: Manual Moderno; 2002.
3. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Inmunología: fundamentos. 12a. ed. Médica Panamericana; 2014.
4. Duerden BI, Reid TMS, Jewsbury JM y Turk DC. Microbiología de enfermedades infecciosas. México: Limusa; 1993.
5. Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. Inmunología básica y clínica. 10a. ed. México: Manual Moderno; 2002.
6. Lehner T, Challacombe SJ, Caldwell. Oral immunization with *Streptococcus mutans* in rhesus monkeys and the development of immune response and dental caries. *Immunology*. 1980 41(4): 857–864.
7. Lehner T, Challacombe SJ, Wilton JM, Caldwell J. Cellular and humoral immune responses in vaccination against dental caries in monkeys. *Nature*. 1976; 264(5581):69–72.
8. Lehner T, Russell MW, Caldwell J. Immunisation with a purified protein from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Lancet*. 1980;1(8176):995–996.
9. Lehner T, Russell MW, Challacombe SJ, Scully CM, Hawkes JE. Passive immunisation with serum and immunoglobulins against dental caries in rhesus monkeys. *Lancet*. 1978;1(8066):693–695
10. www.encolombia.com/odontologia/investigaciones/memorias-IV_encuentro-respuesta>respuesta inmune humoral mediada por IgA e IgG contra S. mutans de niños en etapa predental.
11. Meneses HP, Sanchez FAS, Zaragoza MT de J, Galaviz EE, Flores CY, Flores PM, Martínez RCF, Marroquin-Segura R. Índice CPOD, capacidad amortiguadora salival, niveles salivales de *Streptococcus mutans* y anticuerpos IgA en escolares de la Ciudad de México. *ADM*, 2006;LXIII N° 6: 215-219. servicios.universia.edu.ve/redisenio/contenidos/eureka/v2/detalle.Php?id_contents=32>
12. www.odontologia.com.mx/noticias/viii_encuentro/p02.htm>determinación de anticuerpos de tipo IgA contra antígenos I/II de *Streptococcus mutans*, su relación con el índice CPO, el grado de infección por S.mutans y la capacidad amortiguadora en saliva de adolescentes.
13. Nava J. Estrategias actuales y nuevas direcciones hacia el año 2000 en la prevención de la caries; biología molecular e ingeniería genética. <http://www.dentalesaccocr.com/es/revistas/2001/art009/hoja001.html>



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	154 / 155

14. www.odontología.uchile.cl/alumnos/segundo/clase9.htm Inmunidad contra la caries dental, obtenible en Universidad de Chile.
15. Chamorro JAL, Ospina CA, Arango RJC, Martínez DCM. Acción de la inmunoglobulina A secretora en el proceso de adherencia del Streptococcus mutans al diente humano. CES Odonto.2013; 26(2).
16. Aguilera GLA. Sánchez RCG, Neri RCA, Aceves MM, Padilla BM. Streptococcus mutans en saliva y su relación con caries dental. ADM. Zacatecas México.2009; 65(6).
17. Nolte WA. Microbiología Odontológica. 3a. ed. México: Interamericana, 1986.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MECANISMOS INFECCIOSOS Y RESPUESTA
INMUNE DEL SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML06	29/01/2019	1	155 / 155

IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS

Página	Cambios
6	Los requisitos previos se reubicaron después del objetivo, en todas las prácticas
8	Aclarar que la Estreptolisina S es inmunogénica y no antigénica
9	Describir la participación de el factor CAMP
10	Se quita lo correspondiente a Coagulasa
13	Se enriquece la información y se corrige la redacción
17	Se corrige el procedimiento del inciso B) Producción de Hemolisinas
19	Se modifica el cuestionario
27	Se agrega una siembra de mitis salivarius
29	Se corrige la información del contenido
39	Se corrige la información del contenido
47	Se corrige el procedimiento
63	Se eliminó el cuadro de "Otras características del Género Candida"
65 y 68	Se agrego el apartado V Tinción de Gramm
73	Se agregó la información del Formocresol, Paramonoclorofenol alcanforado
74	En material y reactivos se agregó el hipoclorito de sodio al 2% y se eliminó el del 3%
94	En material y reactivos se sustituye el Suero Humano Total y el Antisuero Humano Total por Suero Bovino Total y Antisuero Bovino Total. El procedimiento también se modificó
101	Se quitó el párrafo que se encuentra arriba de la figura
102	Se quitó el párrafo inicial de la hoja
103	Se aumentó la redacción de los resultados
111	Se modificó la redacción del párrafo 4
117	Se agregó un cuadro de respuesta de la hipersensibilidad
128	Se integra esta nueva práctica al manual
133	Se pasa al inicio del manual
135	Se pasa al inicio del manual
137	Se pasa al inicio del manual
138	Se incluyó en la práctica No. 3