



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 Comité de Mejora Continua: 9 agosto 2024.

Vigencia: 9 agosto 2027.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	2 /166

**Revisión y Actualización 2024 del Manual de Laboratorio del módulo "MIRISE":
"Plan de Estudios 2018"**

Dra. María Teresa de Jesús Zaragoza Meneses

C.D. Niria Rebeca Castro Rico

C.D. Esp. Diego Ulises Arellano García

QFB. María Elena Tejeda Rosales

C.D. Alejandro Muzquiz Shamosh

C.D. Esp. Gabriela Alejandra Albiter Farfán

Dra. Marta Elena Castro Manreza

Esp. Lizete Martínez Boyer

C.D. Nadia Yamilet Aguirre Sigala

C.D. Erick Ricardo Ordaz Robles

C.D. Diana María Buendía Martínez

Manual de Laboratorio del módulo "MIRISE": "Plan de Estudios 2018"

Dra. María Teresa de Jesús Zaragoza Meneses

C.D. Niria Rebeca Castro Rico

C.D. Esp. Diego Ulises Arellano García

QFB. María Elena Tejeda Rosales

C.D. Alejandro Muzquiz Shamosh

QBP. María Emelina Amil Estrada

C.D. Esp. Gabriela Alejandra Albiter Farfán

Dra. Marta Elena Castro Manreza

Esp. Lizete Martínez Boyer

C.D. Nadia Yamilet Aguirre Sigala

C.D. Erick Ricardo Ordaz Robles



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	3 /166

INDICE

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	5
CRITERIOS DE EVALUACIÓN DEL LABORATORIO	6
REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA	8
MANEJO DE RPBI	10
Práctica No. 1	11
FACTORES DE PATOGENICIDAD DE MICROORGANISMOS DE CAVIDAD BUCAL	
Práctica No. 2	19
IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus</i>	
Práctica No. 3	28
MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN CARIES DENTAL	
Práctica No. 4	38
PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CARIES DENTAL	
Práctica No. 5	44
MORFOLOGÍA MICROSCOPICA DE <i>Mycobacterium</i> (BAAR+)	
Práctica No. 6	51
MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN PATOLOGÍA PULPAR Y ABSCESO DENTAL	
Práctica No. 7	60
MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN ENFERMEDAD PERIODONTAL	
Práctica No. 8	72
IDENTIFICACIÓN DE CANDIDA EN CAVIDAD ORAL	
Práctica No. 9	82
ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE ALGUNAS SOLUCIONES DE USO COMÚN EN LA PRÁCTICA ODONTOLÓGICA	
Práctica No. 10	92
ANTIBIOGRAMA	



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	4 /166

Práctica No. 11	101
ACCIÓN DE LA LISOZIMA COMO MECANISMO DE DEFENSA INNATA EN CAVIDAD BUCAL	
Práctica No. 12	106
LA FAGOCITOSIS COMO MECANISMO DE DEFENSA INESPECÍFICO	
Práctica No. 13	111
REACCIONES DE PRECIPITACIÓN EN CAPILAR	
Práctica No. 14	117
REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN EN GEL (Ouchterlony)	
Práctica No. 15	123
REACCIONES DE AGLUTINACIÓN	
Práctica No. 16	130
FIJACIÓN DE COMPLEMENTO	
Práctica No. 17	138
CHOQUE ANAFILÁCTICO	
Práctica No. 18	144
PRESENCIA DE EOSINÓFILOS EN PROCESOS ALÉRGICOS	
Práctica No. 19	148
USO Y MANEJO DE MICROPIPETAS	
Práctica No. 20	154
DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS HETERÓFILOS COMO DIAGNÓSTICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA	
Práctica No. 21	158
DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS EN SALIVA Y SUERO CONTRA CEPAS POTENCIALMENTE CARIOGÉNICAS Y SU REALCIÓN CON EL ÍNDICE C.P.O.	
ANEXOS	164
TINCIÓN DE GRAM	
CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO	



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	5 /166

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. Siempre bajo las siguientes premisas:

- 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.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	6 /166

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. Diagrama de Flujo y Conocimientos previos
 2. Trabajo desarrollado durante la práctica.
 3. Reporte de la práctica, así como su contenido.
 4. 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:** Interpretación que se hace de los resultados obtenidos en la parte experimental, relacionando éstos con los conceptos teóricos.
 - f) **CUESTIONARIO:** Responder las preguntas del protocolo de prácticas.
 - g) **BIBLIOGRAFÍA:** Anotar los libros o artículos consultados según los criterios de Vancouver o APA.

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



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	7 /166

- Exámenes parciales: se realizarán cuatro evaluaciones parciales de laboratorio, de acuerdo con el 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 mayores de 6.0.

- La calificación total de laboratorio se determina con base al siguiente porcentaje:
 - a) Promedio de exámenes 50%
 - b) Promedio de reportes 40%
 - c) Promedio Diagramas de flujo y conocimientos previos 10%
- La calificación aprobatoria de laboratorio es indispensable para tener derecho a la calificación final del Módulo.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	8 /166

CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA

REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

- 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 suministre 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 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.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	9 /166

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, 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.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	10 /166

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	
Objetos Punzocortantes *	Sólido	Recipientes rígidos de polipropileno	Rojo	
No anatómicos	Sólido	Bolsas de polietileno	Rojo	
		Recipientes herméticos	Rojo	

*** Excepto material de vidrio de laboratorio roto, el cual se colocará en bolsas de papel gruesas etiquetadas con la siguiente leyenda “CUIDADO, VIDRIO 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 aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	11 /166

Práctica No. 1

FACTORES DE PATOGENICIDAD DE MICROORGANISMOS DE CAVIDAD BUCAL

OBJETIVO

Identificar los factores de patogenicidad mediante los cuales las bacterias pueden producir daño en el organismo.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

Definir los siguientes conceptos:

- ✓ Patogenicidad y virulencia
- ✓ Microbiota
- ✓ Organismo oportunista

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de los factores de patogenicidad empleados por los microorganismos para provocar daño a las células, tejidos y órganos de nuestro cuerpo es relevante; ya que nos permite tomar medidas de prevención, así como diseñar estrategias de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. La patogenicidad de los microorganismos se refiere a su capacidad para producir enfermedad en hospederos susceptibles, y con base en esta propiedad las bacterias se dividen en dos grupos: patógenas y no patógenas.

La capacidad patogénica de las bacterias se debe a características intrínsecas de cada especie. Algunas poseen determinados factores de patogenicidad, los cuales favorecen su capacidad para ingresar al organismo; adherirse, colonizar e invadir los tejidos, así como evadir la respuesta inmunitaria del hospedero, procesos que en conjunto podrían resultar en el desarrollo de una enfermedad.

La capacidad de los agentes patógenos de provocar una enfermedad, no solo depende de los factores de patogenicidad que posean. Es muy importante, considerar los mecanismos de defensa del hospedero. Generalmente, el despliegue de una respuesta inmunitaria eficiente evitará el desarrollo de una patología. De manera contraria, si los mecanismos de defensa de un individuo no son eficientes, es muy probable que el agente patógeno logre producir una enfermedad.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	12 /166

El cuerpo humano, posee una microbiota, formada por un conjunto de microorganismos que viven en equilibrio en diferentes sitios anatómicos. Esta flora está conformada principalmente por bacterias no patógenas y patógenos oportunistas.

Generalmente los microorganismos de la microbiota no provocan enfermedades, incluso muchos de ellos son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo, por ejemplo, los lactobacilos se encuentran en gran cantidad en el intestino y ayudan a la digestión. Por otra parte, los microorganismos oportunistas, son aquellos capaces de provocar enfermedades, cuando hay deficiencia de los mecanismos de defensa o alteraciones en el microambiente que favorecen su crecimiento y proliferación.

Como ya se mencionó los factores de patogenicidad le confieren a la bacteria la capacidad de adherirse, colonizar e invadir los tejidos, así como evitar los mecanismos de defensa del cuerpo humano. Para ello, además de poseer ciertas características en su envoltura bacteriana, también pueden producir toxinas y enzimas. En el siguiente apartado se explican brevemente algunos ejemplos:

Factores de patogenicidad que favorecen la adherencia e invasión de los tejidos

- ✓ **Fimbrias:** Son filamentos especializados que contienen adhesinas en uno de sus extremos, que permiten a la bacteria adherirse a los epitelios o mucosas.
- ✓ **Proteasa anti IgA:** La cual degrada IgA permitiendo al microorganismo adherirse a las mucosas, es principalmente producida por *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*.
- ✓ **Hialuronidasa y colagenasa:** Exotoxinas que degradan sus respectivos sustratos intercelulares (ácido hialurónico y colágeno), que permiten la diseminación de la bacteria a través del tejido. Las producen principalmente *Streptococcus pyogenes* y *Prevotella melaninogenica*, entre otras.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	13 /166

Factores de patogenicidad que favorecen la evasión de los mecanismos de defensa

- ✓ **Cápsula:** Es una capa externa a la pared celular constituida de polisacáridos y glicoproteínas, su función principal es proteger de la fagocitosis a las bacterias y evita la fijación del complemento. Su presencia está altamente relacionada con la virulencia de un microorganismo.
- ✓ **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.
- ✓ **Leucocidinas:** Destruyen leucocitos, neutrófilos y macrófagos facilitando el desplazamiento bacteriano.

Otros factores de patogenicidad y virulencia muy importantes son la producción de toxinas, las cuales se clasifican en endotoxinas y exotoxinas:

- ✓ **Endotoxinas:** Son lipopolisacáridos (LPS) que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Desencadenan la respuesta inmunitaria, causando fiebre, hipotensión, vasodilatación e inflamación.
- ✓ **Exotoxinas:** Son proteínas sintetizadas y secretadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La toxicidad de estas sustancias es muy elevada y generalmente causa más daño al organismo que la propia bacteria. Son producidas por varios microorganismos entre ellos: *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, etc. Algunas de las enfermedades causadas por exotoxinas son la difteria, tétanos, gangrena gaseosa, botulismo, ántrax, choque tóxico, fiebre escarlatina, diarrea, cólera, tosferina, etc.

Algunos ejemplos de exotoxinas son:

- ✓ **Hemolisinas:** Son exotoxinas que causan hemólisis (lisis o ruptura de eritrocitos) es producida principalmente por el género *Streptococcus* y *Staphylococcus* coagulasa positivos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	14 /166

- ✓ **Lecitinasa o fosfolipasa C:** Enzima extracelular producida por ciertas bacterias como *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* entre otros, su función es hidrolizar los fosfolípidos, principales componentes de la membrana celular.
- ✓ **Catalasa:** Enzima que rompe la molécula de peróxido de hidrógeno convirtiéndola en agua y oxígeno libre.
- ✓ **Bacteriocinas:** Son proteínas sintetizadas por una bacteria con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas. Son producidas por bacterias no patógenas de la flora normal, lo que contribuye al equilibrio de este ecosistema, evitando la aparición de patógenos oportunistas.

En ocasiones la interacción de las exotoxinas producidas por dos especies de bacterias incrementa su capacidad de producir daño en el organismo. Por ejemplo, *Streptococcus agalactiae* al interactuar con *Staphylococcus aureus* (productor de β -toxina) en agar sangre provoca un efecto conocido como CAMP positivo (del inglés Christie, de Atkins y de Munich-Peterson); en el cual se potencializa la hemólisis. Lo anterior debido a que *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) secretan el factor CAMP, una proteína termoestable, que difunde e interactúa con la β -hemolisina (también conocida como esfingomielinasa C) secretada por *Staphylococcus aureus*. Dicha interacción provoca un sinergismo de la hemólisis (punta de flecha).

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepas bacterianas:

Staphylococcus aureus productor de β -toxina.

Streptococcus pyogenes

Streptococcus agalactiae

Medios de cultivo:

2 cajas con agar sangre de carnero al 5%

1 caja con agar yema de huevo



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	15 /166

Material:

Mechero e incubadora

SERVICIOS

Agua, luz y gas.

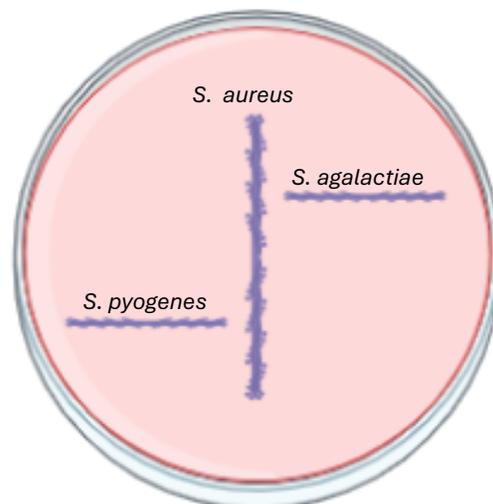
PROCEDIMIENTO

A) Hemolisinas

Firmar Carta de Consentimiento informado y con un hisopo estéril, tomar una muestra de exudado faríngeo de un compañero y descargar en un extremo de una caja con agar sangre, posteriormente realizar estría cruzada con el asa estéril e incubar por 24 horas a 37°C. Culminado el tiempo de incubación, observar los tipos de hemólisis que se presentan y hacer lectura de la morfología de las colonias aisladas.

B) Prueba de CAMP

En el centro de la caja con agar sangre, realizar una estría recta simple de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, en un extremo de la estría anterior, colocar lo más cerca posible, una estría recta perpendicular con *Streptococcus pyogenes*; y otra al otro extremo con *Streptococcus agalactiae*. Es importante que ninguna estría haga contacto. Incubar a 37°C por 24 horas. Posteriormente, observar la presencia de una zona de hemólisis con forma de punta de flecha, en la unión entre los *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Propia



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	16 /166

C) Catalasa

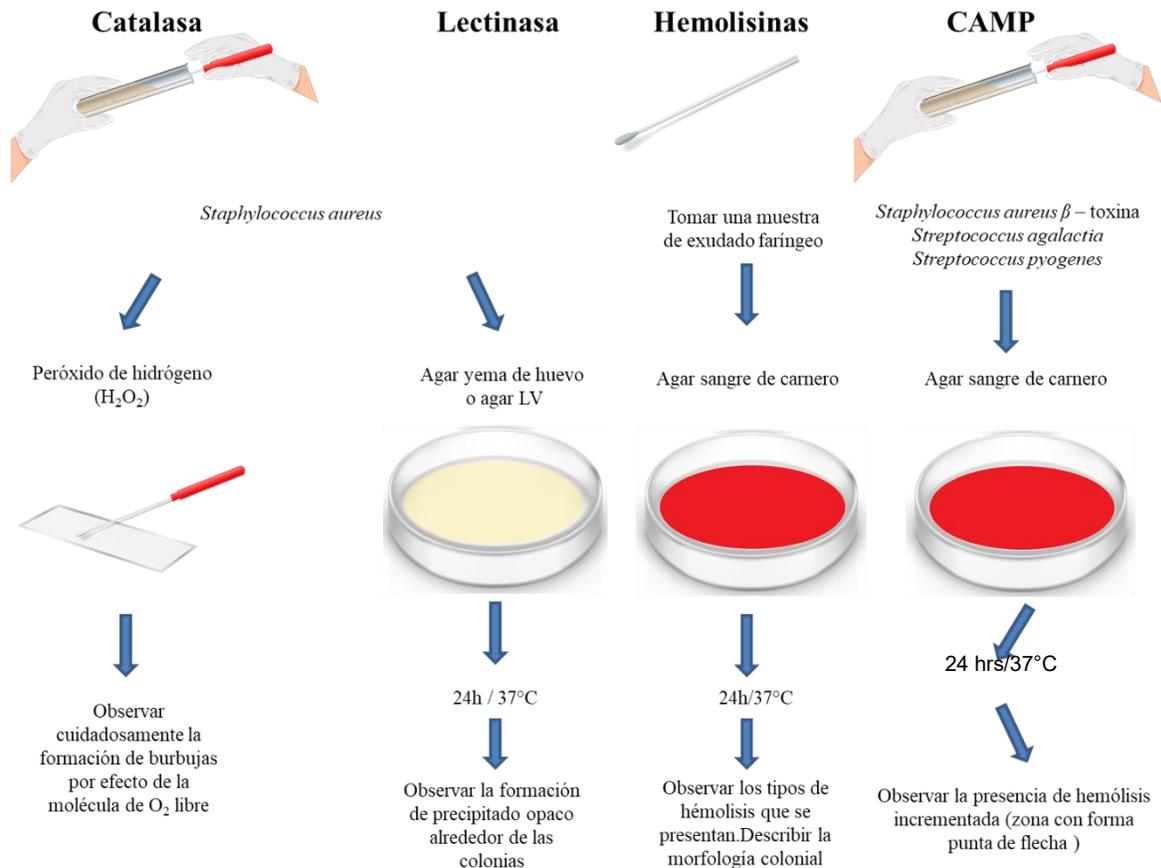
Colocar una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) sobre un portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado. Tomar una muestra de *Staphylococcus aureus* y homogenizar con la gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), observar cuidadosamente la presencia o ausencia de burbujas, las cuales serán formadas si hay producción de oxígeno libre.

D) Lecitinas

Inocular por estría cruzada, una muestra de *Staphylococcus aureus* en la caja con agar yema de huevo, incubar a 37°C por 24 horas. Observar la formación de un precipitado opaco alrededor de las colonias.

PROCEDIMIENTO

Práctica 1 Mecanismos de Patogenicidad





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	17 /166

RESULTADOS

Leer la morfología colonial, tipo de hemólisis, presencia o ausencia de cada una de las enzimas y/o toxinas mencionadas anteriormente en las 3 cajas.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuáles son las principales diferencias entre exotoxinas y endotoxinas?
- 2.- Diferencie los conceptos de patogenicidad y virulencia.
- 3.- Mencione en qué tipo de infecciones de cavidad bucal intervienen los mecanismos de patogenicidad demostrados en esta práctica.
- 4.- Mencione que factores de patogenicidad posee *Staphylococcus aureus*.
- 5.- ¿Qué tipo de hemólisis se observó en la prueba de CAMP?

BIBLIOGRAFÍA

- Arce, M. (2009). *Inmunología e inmunopatología oral*. El Manual Moderno.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. y Mietzner, T. A. (2011). *Microbiología médica*. (25.^a ed.). McGraw Hill.
- Carroll, K. C., Tenenbaum, A. M. y Mietzner, T. A. (2016). *Microbiología médica*. (27.^a ed.). McGraw Hill-Interamericana.
- Engleberg, N. K., Di Rita, V. J. y Dermody, T. S. (2013). *Mecanismos de las enfermedades microbianas*. (5.^a ed.). Filadelfia.
- González, F. R. M. y Molina, L. J. (2009). *Microbiología bucal*. (4.^a ed.) Méndez Editores.
- Liébana, U. J. (2002). *Microbiología oral*. (2.^a ed.). McGraw Hill-Interamericana.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B. y Roitt, I. (2014). *Inmunología*. (8.^a ed.). Elsevier.
- Marsh, P. D. y Martin M. V. (2011). *Microbiología oral*. (5.^a ed.). Amolca.
- Negróni, M. (2018). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. (3.^a ed.). Médica Panamericana.
- Ryan, J. K. y Ray, C. G. (2017). *Microbiología médica de Sherris*. (6.^a ed.). McGraw Hill-Interamericana.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	18 /166

Spicer, W. J. (2009). *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas: texto y atlas en color*. Elsevier.

Struthers, J. K. y Westran, R. P. (2005). *Bacteriología clínica*. Masson.

Tay, Z. J. (2011). *Microbiología y parasitología clínica*. (4.^a ed.). Méndez Editores.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	19 /166

Práctica No. 2 IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS

OBJETIVO

El alumno diferenciará especies patógenas y no patógenas del género *Staphylococcus*.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

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

1. Morfología de las bacterias del género *Staphylococcus*.
2. Elaborar una tabla comparativa con los factores de patogenicidad presentes en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus*, son cocos Gram+ y se pueden encontrar aislados, en pares o formando racimos irregulares, son inmóviles, no esporulados y pueden producir cápsula bajo ciertos estímulos ambientales. Los estafilococos se encuentran en las mucosas y piel de los seres humanos, las dos especies que se asocian al desarrollo de enfermedades son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Ambos son aerobios y anaerobios facultativos, relativamente resistentes al calor y desinfectantes. El *S. aureus* se considera el miembro más virulento del género.

Es el colonizador más frecuente en la población humana y se considera el principal patógeno oportunista causante de la mayor morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Se ha visto que la colonización por la bacteria es un factor de riesgo para posteriormente tener una infección, cuya intensidad va desde infecciones menores de la piel y mucosas, a infecciones invasivas y graves de órganos y tejidos que ponen en peligro la vida. En la siguiente tabla se mencionan algunas de estas enfermedades:



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	20 /166

Infecciones de la piel y mucosas	Infecciones invasivas y graves
Foliculitis	Bacteriemias
Forunculosis	Endocarditis
Celulitis	Meningitis
Impétigo	Osteomielitis
Conjuntivitis	Neumonía
Síndrome de piel escaldada	Mastitis
	Artritis séptica
	Enterocolitis
	Abscesos profundos

El desarrollo de las enfermedades no solo se debe a la presencia física de *S. aureus*, sino también a las toxinas que producen (Toxicosis), ejemplo de lo anterior son las intoxicaciones con alimentos y el Síndrome de choque tóxico.

Se considera que los estafilococos son causa de ciertas infecciones de la cavidad

bucal y de los dientes, donde compiten con los estreptococos. Se ha demostrado que en la mayoría de las infecciones supurativas de cavidad oral, se encuentra involucrado este género; y mediante el uso de cultivos se ha identificado a *Staphylococcus aureus* en muestras de conductos radiculares infectados y abscesos dentales.

S. aureus posee diferentes factores de patogenicidad que le permiten evadir el sistema inmunológico y afectar el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa, debido a lo anterior la infección con esta bacteria no induce una inmunidad protectora, por lo que las infecciones pueden ser recurrentes. A continuación, se explican algunos de ellos:

Factores de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*

- ✓ **Catalasa:** Esta bacteria expresa la enzima catalasa, la cual hidroliza al peróxido de hidrógeno, produciendo agua y oxígeno, mecanismo que le permite evadir algunos mecanismos de la respuesta inmunológica innata. Mientras que, en las pruebas de laboratorio, ayuda a diferenciar a los *Staphylococcus* de los *Streptococcus*, ya que los últimos no expresan dicha enzima.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	21 /166

- ✓ **Hemolisinas:** Esta bacteria produce diferentes tipos de hemolisinas, las cuales son capaces de lisar a los eritrocitos, este evento se denomina hemólisis. Los tipos de hemólisis pueden ser alfa (hemólisis parcial, se observa un halo verdoso), beta (hemólisis total, se observa un halo transparente) y gama (sin hemólisis). El tipo de hemólisis también permite diferenciar a las especies patógenas de las no patógenas, ya que *Staphylococcus epidermidis* no es capaz de producir hemólisis.
- ✓ **Coagulasa:** La coagulasa es una proteína que induce la conversión de fibrinógeno en fibrina, lo que resulta en la formación de un coagulo. Así, cuando *Staphylococcus aureus* está en contacto con la sangre, se recubre de una capa de fibrina que le protege de la fagocitosis. En el laboratorio la prueba de coagulasa también permite diferenciar a las especies patógenas y no patógenas de este género.
- ✓ **β -Lactamasas:** Es una enzima que hidroliza el anillo beta-lactámico de algunos antibióticos (penicilina, cefalosporinas, etc). *Staphylococcus aureus* expresa esta enzima, lo que le confiere resistencia contra estos antibióticos. Lo anterior favorece que esta bacteria, actualmente sea una de las causas de infecciones nosocomiales.
- ✓ **DNAsas:** *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* producen estas enzimas, las cuales son capaces de romper los enlaces fosfodiéster del DNA. Este factor de patogenicidad permite que estas bacterias puedan evadir el ataque de los neutrófilos.
- ✓ **Toxina exfoliativa:** Esta toxina de *Staphylococcus aureus* está constituida por lo menos por dos proteínas que producen la descamación de los queratinocitos en el síndrome estafilocócico de piel escaldada.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	22 /166

- ✓ **Hialuronidasa:** Degrada el ácido hialurónico de la matriz extracelular del tejido conjuntivo facilitando la diseminación de la infección.

Estrategias para diferenciar las especies patógenas y no patógenas de *Staphylococcus*

Mediante cultivos y pruebas bioquímicas es posible diferenciar a las especies de bacterias patógenas y no patógenas. Por ejemplo, el agar Vogel Johnson inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias debido a la presencia de telurito. Sin embargo, los *Staphylococcus* patógenos, son capaces de reducir el telurito a telurio metálico, produciendo colonias de color negro.

Staphylococcus aureus es halófila y puede crecer en presencia de cloruro de sodio al 10%, estas condiciones de cultivo se obtienen al emplear el agar selectivo S110. Mientras que el agar sal y manitol, permite observar la fermentación del manitol, ya que la generación de desechos ácidos, induce disminución del pH y viraje del rojo de fenol a amarillo.

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	+	-

Fuente: Propia



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	23 /166

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepas: *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus epidermidis

MEDIOS DE CULTIVO: 1 caja con agar sal y manitol

1 caja con agar S-110

1 caja con agar sangre de carnero

1 caja con Vogel Johnson

TUBOS: 2 tubos con caldo glucosa con rojo de fenol

2 tubos con caldo manitol con rojo de fenol

1 tubo con plasma citratado

MATERIAL Y EQUIPO: Hisopo

Portaobjetos

Mechero

Incubadora

Centrifuga

REACTIVOS: Peróxido de Hidrógeno

SERVICIOS: Agua, luz y gas.

PROCEDIMIENTO

A) FERMENTACIÓN DE MANITOL: Sembrar, por estría cruzada, una caja con agar sal y manitol, la mitad de la caja con *Staphylococcus aureus* y la otra mitad con *Staphylococcus epidermidis*. Incubar a 37°C de 24-48 horas.

B) PRODUCCIÓN DE HEMOLISINAS: Sembrar por estría cruzada, una caja con agar sangre, la mitad con *Staphylococcus aureus* y la otra mitad con *Staphylococcus epidermidis*. Incubar a 37°C de 24-48 horas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	24 /166

C) PRODUCCIÓN DE COAGULASA: Firmar la carta de consentimiento informado y extraer 5 ml de sangre de un compañero del grupo y colocarla en dos tubos con EDTA, agitar suavemente y centrifugar a 1,000 rpm durante 3 minutos. Extraer el plasma con una pipeta Pasteur y distribuirlo en tubos de ensaye pequeños.

En un tubo con plasma citratado, inocular una asada de *Staphylococcus aureus*. Incubar de 1 a 3 horas a 37° C.

D) PRODUCCIÓN DE CATALASA: Sobre un portaobjetos, colocar dos gotas de peróxido de hidrógeno (sin que se toquen), posteriormente tomar una asada *Staphylococcus aureus* y suspenderla en una de las gotas de peróxido, repetir el procedimiento en la otra gota, con una asada de *Staphylococcus epidermidis*.

E) MEDIOS DE CULTIVO DIFERENCIAL Y SELECTIVO:

Agar Vogel Johnson: Sembrar por estría cruzada, la mitad de la caja con *Staphylococcus aureus* y la otra mitad con *Staphylococcus epidermidis*. Incubar a 37°C de 24-48 horas.

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

F) PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

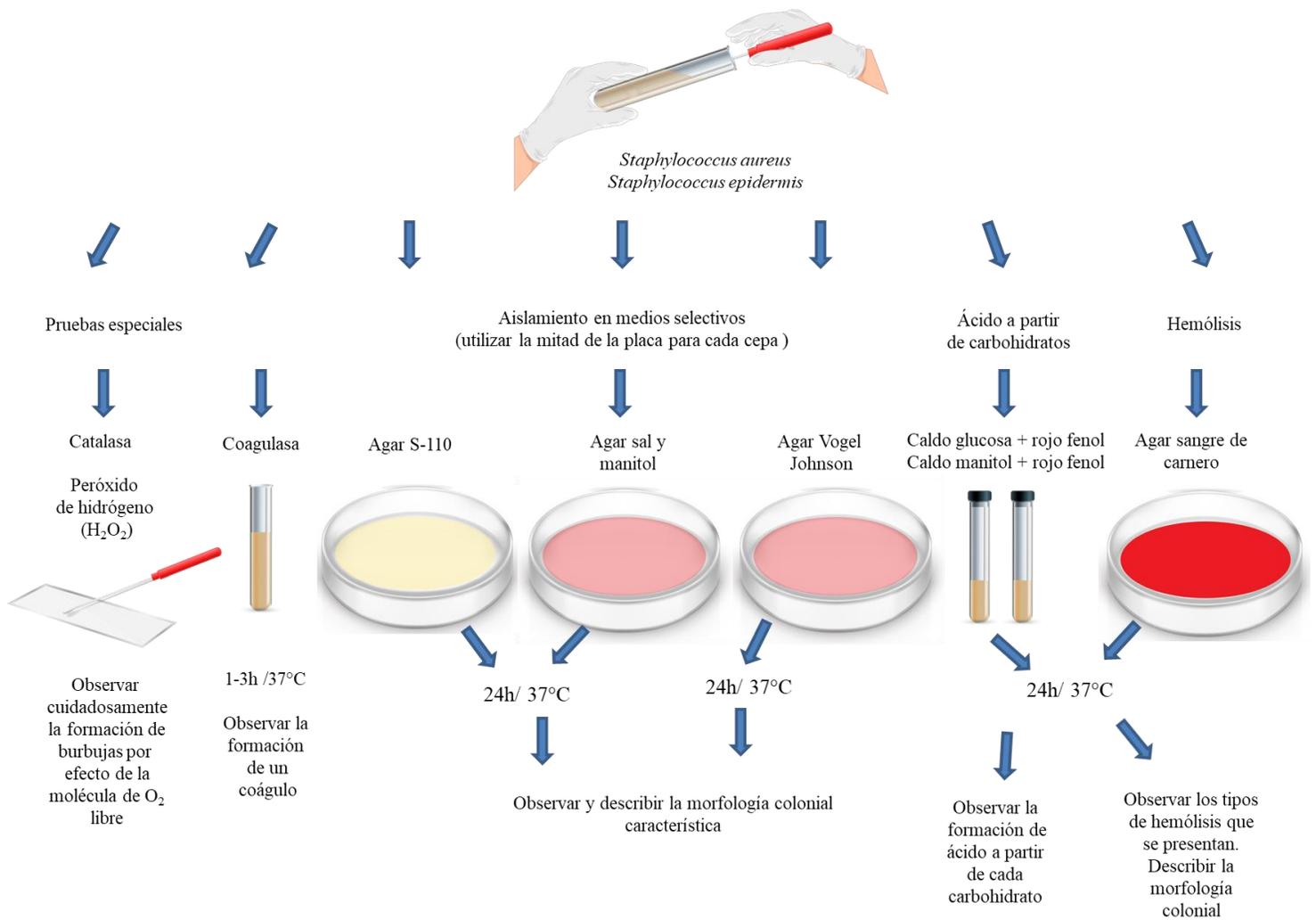
Tubos de glucosa con rojo de fenol: inocular una asada por agitación con *Staphylococcus aureus* y otro tubo con *Staphylococcus epidermidis*.

Tubos de manitol con rojo de fenol: inocular una asada por agitación con *Staphylococcus aureus* y otro tubo con *Staphylococcus epidermidis*.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	25 /166

Práctica 2 Identificación de *Staphylococcus*





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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	26 /166

RESULTADOS

1. De cada una de las cajas de agar sembradas reportar morfología colonial.
2. En la caja de agar sal y manitol observar cambio de coloración del medio por efecto de la fermentación del manitol.
3. En la caja agar Vogel Johnson, *Staphylococcus aureus* producen colonias pequeñas, negras y halo amarillo. Mientras que *Staphylococcus epidermidis* genera colonias pequeñas, negro-grisáceas y sin halo.
4. En la caja de agar S 110, las colonias de *Staphylococcus aureus* son lisas, redonda de bordes enteros, cremosas de color amarillo. Mientras que *Staphylococcus epidermidis* genera colonias lisas, de forma circular con bordes enteros ligeramente irregulares de color blanco.
5. En la caja de agar sangre, debe identificar los tipos de hemólisis.
6. En la prueba de coagulasa se debe observar la ausencia o presencia de un coágulo blanco.
7. En la prueba de catalasa, se debe observar de manera inmediata la formación de burbujas, en cuyo caso la prueba se reporta como (+), si no hay burbujeo se reporta (-).
8. En las pruebas bioquímicas reportar cambio de coloración de rojo a amarillo como (+), si no hay cambio de color se reporta como (-).

CUESTIONARIO

1. Esquematice, como actúa la coagulasa producida por *Staphylococcus aureus* sobre el peróxido de hidrogeno y su importancia en la patogenia.
2. Mencione los factores de patogenicidad que produce *Staphylococcus aureus* en un absceso periapical.
3. Describa la conducta a seguir en un paciente que presente un absceso periapical



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	09/08/2024	1	27 /166

BIBLIOGRAFÍA

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA y Mietzner TA. (2011). Microbiología Médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill.

Engleberg NK, Di Rita VJ y Dermody TS. (2013). Mecanismos de las enfermedades microbianas. 5a. ed. Filadelfia. thePoint.

Jawetz E, Melnick J y Adelberg E. (2011). Microbiología Médica. 25a. ed. México: McGraw Hill interamericana.

Marsh PD y Martin MV. (2011). Microbiología oral. 5a. ed. Gran Bretaña: Amolca.
Prats G. (2017). Microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana.

Ryan JK y Ray CG. (2017). Microbiología Médica de Sherris. 6a. ed. México: Mc Graw Hill- Interamericana editores.

Struthers JK y Westran RP. (2005) Bacteriología clínica. Bcelona España: Masson.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	28 /166

Práctica No. 3

MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN CARIES DENTAL

OBJETIVO

Identificar las características metabólicas, fisiológicas y morfológicas de algunos microorganismos involucrados en el desarrollo de caries dental.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

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

FUNDAMENTO TEÓRICO

La caries dental es una enfermedad multifactorial en la cual intervienen factores intrínsecos y extrínsecos para su desarrollo; el aspecto microbiológico como factor extrínseco, es uno de los principales productores de caries.

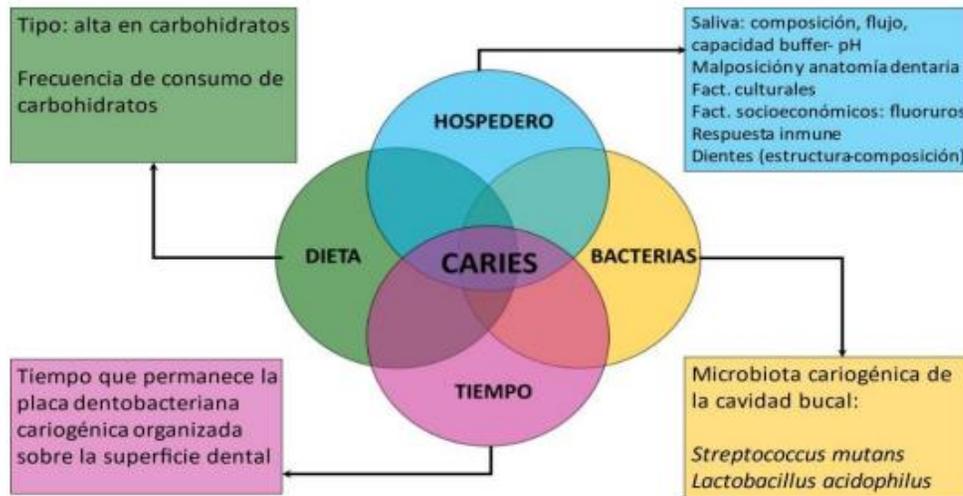
El conocimiento profundo de los microorganismos involucrados en el desarrollo de caries dental es de suma importancia para el Cirujano Dentista, ya que se enfrentará diariamente a esta patología durante su práctica profesional. Teniendo como base dicho conocimiento, podrá aplicar medidas preventivas contra esta enfermedad bacteriana, considerada actualmente por la Organización Mundial de Salud (OMS) como la enfermedad de mayor prevalencia.

La cariología moderna considera que en el desarrollo de caries dental intervienen elementos adicionales relativos al hospedero, entre los que están:

1. Factores socioeconómicos	2. Hábitos higiénico-dietéticos	3. Anatomía dental
4. Factores culturales	5. Saliva	6. Tiempo
7. Respuesta inmune	8. Microorganismos cariogénicos	

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	29 /166

Figura1: Factores asociados al desarrollo de caries dental



Todos los factores interactúan durante el desarrollo de la caries dental. Imagen tomada y modificada de: Esquema Tetrafactorial de Newbrun, 1978.

Como sabemos, después del cepillado dental en un lapso no mayor a 2 horas se forma la película adquirida, la cual se encuentra libre de bacterias de forma inicial; posteriormente se lleva a cabo la colonización bacteriana de las superficies dentales en dos momentos:

1. Colonización primaria (adherencia bacteriana a la película adquirida).
2. 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 colonizadoras como *Streptococcus* del grupo viridans y géneros como *Lactobacillus*, *Actinomyces*, etc.

La colonización secundaria se divide en dos fases:

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

En esta etapa el mecanismo de adherencia y adición bacteriana depende exclusivamente de la síntesis extracelular de polímeros a partir del desdoblamiento de la sacarosa; *Streptococcus mutans* produce en presencia de este carbohidrato, polímeros adherentes llamados dextranas y mutanas que permiten la colonización de otros microorganismos, también actúan las levaduras que servirán como nutrientes para los microorganismos, dando paso a la siguiente fase.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	30 /166

b) Multiplicación: Al principio la población bacteriana está constituida por cocos Gram positivos, transformándose rápidamente en una placa compleja que incluye otros cocos, bacilos y filamentos. Por otra parte, los microambientes ácidos creados por los colonizadores primarios facilitan el desarrollo de diferentes géneros tales como *Lactobacillus* y *Veillonella* que prefieren un medio ácido para su desarrollo.

Dentro del proceso de caries dental, participa de forma importante el género *Streptococcus* del grupo viridans; estos son descritos como cocos Gram positivos, de forma esférica u oval, que se agrupan en pares o cadenas, inmóviles, no esporulados, catalasa negativos, aerobios y anaerobios facultativos con crecimiento óptimo a 37°C; al fermentar azúcares producen ácido láctico y fórmico, etanol y bióxido de carbono.

Estas bacterias son consideradas parte de la microbiota bucal y al ser cultivadas en su medio selectivo agar mitis salivarius, presentan colonias altas, convexas, puntiformes, celestes, mucoides, opacas, que miden 0.5 a 1 mm de diámetro y tienen aspecto de vidrio esmerilado. Las especies del grupo viridans son:

- *Streptococcus mutans*: Está relacionado con el inicio de la placa dentobacteriana y su presencia en ella implica cariogenicidad, fue descrito por primera vez por Clarke en 1924.
- *Streptococcus sanguis*: En un papel antagónico, inhibe la presencia de *S. mutans* debido a la producción de peróxido de hidrógeno, por lo cual se ha asociado con sitios libres de caries.
- *Streptococcus salivarius*: Se encuentra en pocas cantidades en la placa dentobacteriana y en caries profundas.
- *Streptococcus mitis*: Se encuentra en la placa dentobacteriana, pero se asocia a sujetos libres de caries debido también a la producción de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, es la bacteria más frecuentemente asociada a endocarditis bacteriana.

Otros microorganismos involucrados en el proceso de caries dental son los lactobacilos, se ha encontrado que las especies. *L. casei/paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. salivarius* y *L. plantarum* están presentes en adultos, jóvenes y niños con lesiones cariosas profundas. El *Lactobacillus acidophylus* es considerado un colonizador secundario de la placa dentobacteriana. Son bacilos Gram positivos, microaerófilos o anaerobios, acidogénicos, acidúricos, generalmente inmóviles, con requerimientos nutricionales complejos. Algunas especies como *L. acidophylus* y *L. casei*, producen ácido láctico como producto final de su metabolismo (homofermentativos) y otras como *L. fermentum* y *L. brevis*, producen diferentes ácidos orgánicos y



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	31 /166

gas (heterofermentativos). Su medio de cultivo selectivo es agar rogosa. Estas bacterias se han aislado de caries activas y profundas, ya que tienen acción sinérgica con *S. mutans* en el avance de caries en dentina.

Se ha encontrado que los lactobacilos de la cavidad bucal de niños provienen de la cavidad bucal de las madres, debido al contacto cercano, así como de los alimentos que ellos comen incluyendo leche y diferentes productos fermentados.

Los *Actinomyces* son comunes en la placa supragingival humana, en caries radicular y en enfermedad periodontal. Estos son bacilos Gram positivos, rectos o curvos ocasionalmente ramificados, pleomórficos, anaerobios, microaerofílicos o facultativos, que forman micro colonias en 24 a 48 horas de cultivo y crecen en un medio enriquecido como agar sangre.

Dentro de este grupo se encuentran *A. viscosus*, *A. israelii*, *A. bovis*, *A. naeslundii*, y otras bacterias como *Arachnia propionica* y *Rothia dentocariosa*. Las pruebas bioquímicas o de metabolismo microbiano sirven para identificar plenamente 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, pero no podremos decir la especie hasta no realizar las pruebas bioquímicas. Estas pruebas 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 que se encuentran en la gran mayoría de los libros de microbiología. En este caso se anexan a esta práctica las tablas necesarias para identificar los microorganismos que aislaremos.

MATERIAL Y REACTIVOS

Medios de cultivo:

1 caja de agar mitis salivarius (SMS).

1 caja de agar rogosa.

1 caja de agar sangre de carnero al 5% (AS).

1 tubo caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente extraído con caries (donado en la clínica Zaragoza) con 72 horas de incubación a 37°C.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	32 /166

Pruebas bioquímicas:

Streptococcus

1 tubo caldo manitol con rojo de fenol

1 tubo caldo sorbitol con rojo de fenol

Lactobacillus

1 tubo caldo salicina con rojo de fenol

1 tubo caldo sorbitol con rojo de fenol

Catalasa:

1 frasco con peróxido de hidrógeno

1 portaobjetos

Tinción de Gram: cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina

Material y Equipo:

Hisopo

Mechero

Incubadora

SERVICIOS

Agua, luz y gas.

PROCEDIMIENTO

Esta práctica se realiza en dos sesiones:

Primera sesión

A) *Streptococcus*

- Tomar con un hisopo estéril una muestra de caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente con caries con 72 horas de incubación a 37°C y realizar en un extremo de la caja de agar mitis salivarius la descarga, posteriormente, realizar con el asa estéril la estría cruzada. Etiquetar la caja e incubar a 37° C en atmosfera parcial de anaerobiosis por 48 horas.

B) *Lactobacillus*

- Tomar con un hisopo estéril una muestra del caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente con caries, con 72 horas de incubación a 37°C y realizar en un extremo de la caja de agar rogosa la descarga, posteriormente, realizar con el asa estéril la estría cruzada. Etiquetar la caja e incubar a 37° C por 48 horas en atmosfera parcial de anaerobiosis.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	33 /166

C) Actinomyces

- Tomar con un hisopo estéril una muestra del caldo tioglicolato + suero de conejo al 1% + diente con caries, con 72 horas de incubación a 37°C y realizar en un extremo de la caja de agar sangre la descarga, posteriormente, realizar con el asa estéril la estría cruzada. Etiquetar la caja e incubar a 37° C por 48 horas en atmósfera parcial de anaerobiosis.

Segunda sesión

A) De la caja de agar rogosa

- Tomar una colonia y sembrar el tubo caldo salicina con rojo de fenol por agitación.
- Tomar una colonia y sembrar el tubo caldo sorbitol con rojo de fenol por agitación.

Etiquetar los 2 tubos e incubar a 37°C por 24 horas.

B) De la caja de agar mitis salivarius

- Tomar una colonia y sembrar el tubo caldo manitol con rojo de fenol por agitación.
- Tomar una colonia y sembrar el tubo caldo sorbitol con rojo de fenol por agitación.

Etiquetar los 2 tubos e incubar a 37°C por 24 horas.

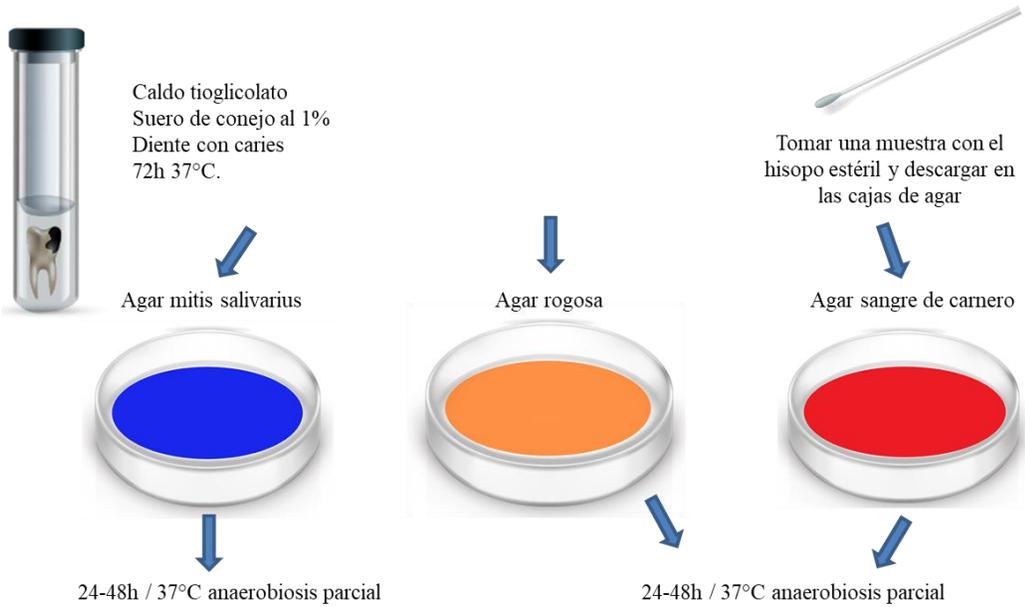
C) Realizar la prueba de catalasa y la tinción de Gram de una colonia característica de cada una de las tres cajas sembradas en la primera parte de esta práctica.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	34 /166

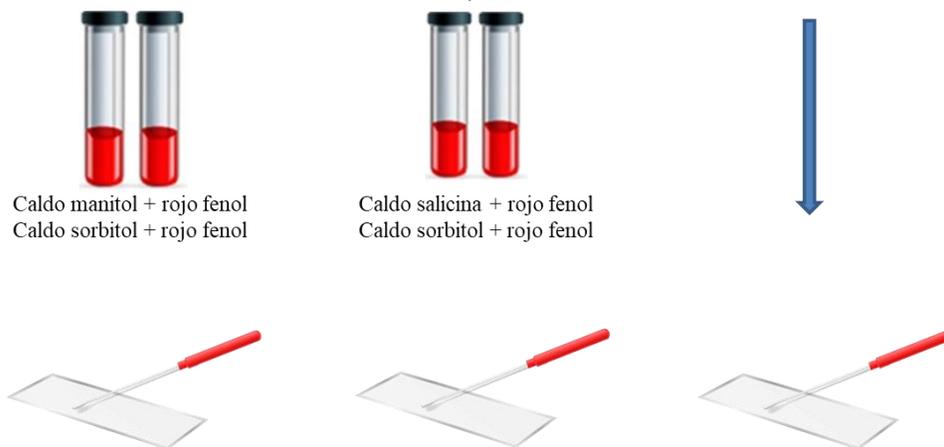
Práctica 3 Microorganismos de importancia en caries dental

Primera sesión



Segunda Sesión

Pruebas bioquímicas





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	35 /166

RESULTADOS DE LA PRIMERA Y SEGUNDA SESIÓN

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

- *Streptococcus*:

Describir la morfología 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 los resultados el género y especie de la bacteria cultivada (auxiliarse de la tabla 1).

- *Lactobacillus*:

Describir la morfología 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).

- *Actinomyces*:

Describir la morfología 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 desarrolladas 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.- ¿Cuál es la importancia de los microorganismos anaerobios en la producción de caries dental?
- 3.- Explique ¿por qué se agrega sacarosa al agar mitis salivarius?
- 4.- ¿Por qué es selectivo el agar rogosa para los lactobacilos?
- 5.- Defina caries dental dando un enfoque multidisciplinario.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	36 /166

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A.. (2011). Microbiología médica (25a. ed.) México: Mc Graw Hill.
2. Carrol K.C., Morse S.A., Mietzner, T.A., Miller, S. (2016). Microbiología médica (27a ed.) México: Mc Graw Hill.
3. Levinson W., & Jawetz E. (2006). Microbiología e inmunología médicas: evaluación, repaso (8ª ed.) México: Manual Moderno.
4. Liébana U.J. (2002). Microbiología oral (2a. ed.) España: Mc Graw Hill-Interamericana.
5. Negroni M. (2018). Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica (3ª ed.) Buenos Aires: Médica Panamericana.
6. Ruiz A., & Moreno G. (2006). Tratado SEIMC de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España: Médica panamericana.
7. Zezhang T. Wen, Xiaochang Huang, Kassapa Ellepola, Sumei Liao and Yihong Li. (2022). Lactobacilli and human dental caries: more than mechanical retention. USA; Department of Public and Ecosystem Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca.

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	N D	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	+	+	+	-	-	-	+	-



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	37 /166

Tabla 2. Diferenciación de *Lactobacillus*

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 aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	38 /166

Práctica No. 4

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A CARIES DENTAL

OBJETIVO

Conocer algunas de las pruebas de laboratorio utilizadas para determinar la susceptibilidad a desarrollar caries.

CONOCIMIENTOS PREVIOS:

- 1.- Describir a los agentes causales microbianos de la caries dental.
- 2.- Relacionar la placa dentobacteriana (biofilm) y la caries dental.
- 3.- Describir las características metabólicas de los microorganismos cariogénicos

FUNDAMENTO TEÓRICO

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, 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 carbohidratos.

Actualmente en la práctica clínica es posible identificar la presencia de *Streptococcus mutans* y 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 la capacidad amortiguadora salival.

Las primeras dos pruebas; Dentocult SM, es selectiva para *Streptococcus mutans* y la Dentocult LB para *Lactobacillus* se basan en la densidad de crecimiento en la tira por UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) de saliva, el kit contiene una guía para catalogar al paciente con bajo, medio y alto recuento de bacterias y por lo tanto un alto, medio, bajo o nulo riesgo de padecer caries dental.

La prueba de Snyder y fermentación de manitol determina la capacidad de los microorganismos de fermentar carbohidratos y producir ácido.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	39 /166

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; se utiliza el colorante púrpura de bromocresol que en pH neutro es de color morado, y cambia a color blanco en 24 horas cuando se acidifica. Esta prueba es solo cualitativa, es decir solo evidencia la presencia de *Streptococcus mutans* pero no indica el número de bacterias presentes.

PRUEBA DE SNYDER

Se utiliza para determinar la capacidad de los microorganismos de la saliva para producir ácidos, contiene glucosa y un indicador de pH llamado verde de bromocresol, el cual vira de verde (neutro) hacia amarillo (ácido) al ser fermentado el carbohidrato. Esta prueba es cualitativa ya que indica el riesgo a caries por la velocidad de cambio de color o acidificación del medio, con una lectura de 24, 48 y 72 horas.

Todas estas pruebas microbiológicas 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.

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

EQUIPO

Incubadora.

SERVICIOS: Agua, luz, gas



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	40 /166

PROCEDIMIENTO

1- Firmar cartas de consentimiento informado y coleccionar dos muestras de saliva de diferentes donadores, en un tubo de ensayo estéril cada uno, etiquetando los tubos de cada donador, siempre cerca del mechero y levantar índice CPO a cada uno de los donadores de saliva.

Medio Snyder:

- 1- Colocar los tubos con medio Snyder en baño maría hasta que estos se licúen, dejarlos enfriar hasta una temperatura aproximada de 45° C.
- 2-Tomar 0.5 ml de saliva y colocarla en el tubo con medio Snyder.
- 3-Agitar inmediatamente hasta que la saliva y el medio queden perfectamente mezclados.
- 4- Repetir los puntos 2 y 3 con el segundo donador.
- 5-Incubar a 37° C por 24, 48 y 72 horas (hasta que cambie de verde a amarillo, pero no más de 72 horas).
- 5-Leer resultados a las 24, 48 y 72 horas.

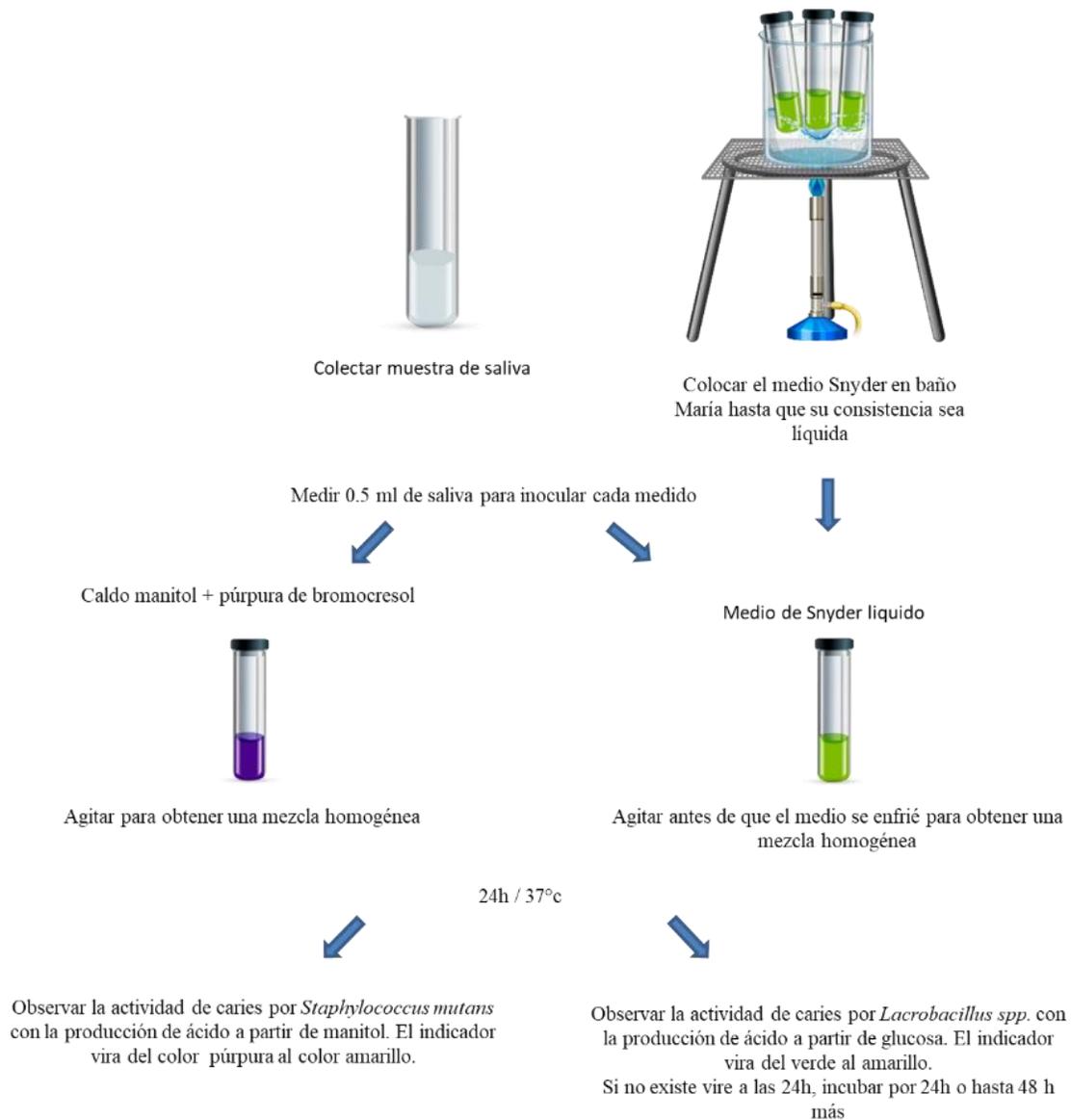
Caldo Manitol

- 1-Tomar 0.5 ml de saliva y colocarla en el tubo con caldo manitol.
- 2- Agitar hasta que la saliva y el medio queden perfectamente mezclados.
- 3- Repetir los puntos 1 y 2 con el segundo donador.
- 3- Incubar a 37° C por 24 horas.
- 4- Leer cambio de color.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	41 /166

Práctica 4 Pruebas de susceptibilidad a caries





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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	42 /166

RESULTADOS

PRUEBA DE SNYDER

Registrar el cambio de color de verde a amarillo durante tres días, con base en la siguiente tabla analiza los resultados y relacionarlos 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

PRUEBA DE MANITOL

Reportar cambio de color de morado a blanco **únicamente 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 indicaría a un paciente con alto riesgo de caries dental.
- 2.- Explique por qué 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.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	43 /166

BIBLIOGRAFÍA

Broks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2011). Microbiología Médica (25 ed.). Mc. Graw Hill.

Carrol, K. C., Morse , S. A., & Miller, S. (2011). Microbiología Médica (25 ed.). Mc Graw Hill.

Levison, W., & Jawetz, E. (2006). Microbiología e Inmunología Médica (7 ed.). México: El Manual Moderno.

Liébana, U. J. (2002). Microbiología Oral (2 ed.). España: Mc Graw Hill-Interamericna.

Marsh, P. D., & Martin, M. V. (2011). Microbiología Oral (5 ed.). Gran Bretaña: Amolca.

Negróni, M. (2018). Microbiología Estomatología; Fundamento y Guía Práctica (3 ed.). Argentina: Médica Panamericana.

Struther, J. K., & Westran, R. P. (2005). Bacteriología Clínica. Barcelo España: Masson.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	44 /166

PRÁCTICA No. 5

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *Mycobacterium* (BAAR+)

OBJETIVO

Analizar las características microscópicas del género *Mycobacterium*, por medio de la tinción Ziehl-Neelsen enfatizando en las especies patógenas para el hombre.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

- 1.- Enfermedades de importancia para el cirujano dentista ocasionadas por el género *Mycobacterium*.
- 2.- Realiza un dibujo de la pared celular de *Mycobacterium*

FUNDAMENTO TEÓRICO

Actualmente, existen más de 170 especies reconocidas de *Mycobacterium*, se caracterizan por ser bacilos de entre 0.2 a 0.6 micras de tamaño, aerobios inmóviles, de división lenta, sin cápsula, no formadores de esporas, sensibles a la luz solar, luz ultravioleta y al calor, su pared celular lipídica es gruesa (hidrofóbica), responsable de su resistencia a la acción del ácido-alcohol (BAAR+).

Los organismos pertenecientes a este género son bastante diversos con respecto a su capacidad para causar enfermedades en humanos; algunos son patógenos estrictos, mientras que otros son patógenos oportunistas o no patógenos.

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

Como patógeno intracelular facultativo, *M. tuberculosis* ha desarrollado un estilo de vida inteligente para garantizar su resistencia en un huésped bastante sano. La transmisión de persona a persona se produce exclusivamente a partir de huéspedes que, por diversas razones de salud, ya no representan un nicho apropiado para los bacilos. Los bacilos tuberculosos se diseminan desde individuos gravemente infectados a través de las vías respiratorias.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	45 /166

M. tuberculosis es el responsable de la tuberculosis pulmonar y esta se transmite por las siguientes vías:

1. Aérea a través de la inhalación de microgotas en aerosoles cuando la persona enferma tose, habla o estornuda, por lo cual, para que una infección pulmonar se produzca, es necesario que los bacilos se instalen en los alvéolos pulmonares.
2. Ingesta de alimentos contaminados, el *M. bovis* se transmite a través de leche de vacas enfermas, produciendo inicialmente lesiones intestinales.
3. Por inoculación directa a través de las heces, orina y esputo.

En México, las formas clínicas más frecuentes de la tuberculosis son: pulmonar, ganglionar, renal y meníngea. Por lo que un enfermo de tuberculosis pulmonar no detectado puede infectar entre 10 y 15 personas en el transcurso de un año y de éstos entre 10 y 55% pueden desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida ya que el agente causal es liberado directamente al medio cuando habla, tose, estornuda, escupe y canta. Las gotas que se generan se evaporan rápidamente, convirtiéndose en aerosoles de pequeñas partículas (1-3 μm), las cuales por su tamaño permanecen en suspensión y pueden ser transportadas por el flujo del aire. Cuando una persona sana inhala una mínima parte de esta carga de bacilos dispersada en el aire, su pequeño tamaño facilita que algunos de estos lleguen a los alvéolos pulmonares. Después de la exposición sólo el 5% de los infectados desarrollarán la enfermedad en los dos años siguientes y otro 5% adicional en años posteriores.

La tuberculosis, localizada en la cavidad oral y faringe, pese a ser la siguiente en frecuencia que afecta el área de oídos, nariz, garganta, cabeza y cuello, es muy rara. La forma primaria oral es mucho más difícil de encontrar que su forma secundaria a otras infecciones en la vía respiratoria, sus características demográficas son en pacientes más jóvenes con enfermedad en las cadenas ganglionares del cuello y se manifiestan como lesiones indoloras en la cavidad oral. La secundaria es causada por la autoinoculación en las personas que tienen afectación pulmonar. La localización, en orden de frecuencia, es: la lengua y las encías, después el paladar, seguido de las amígdalas con los músculos palatogloso y palatofaríngeo, después la úvula, las glándulas salivales y la mucosa alveolar. La forma clínica se identifica por nódulos, úlceras superficiales, placas o lesiones induradas de evolución lenta, aunque también se pueden observar fisuras, vesículas o masas.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	46 /166

Ciertos procedimientos dentales como las preparaciones cavitarias con instrumental rotatorio especialmente a alta velocidad generan aerosoles detectables en el aire del consultorio dental. Cuando dichos procedimientos se realizan en enfermos con tuberculosis, es posible que estas partículas en suspensión contengan bacilos tuberculosos que pueden infectar al odontólogo, a los pacientes, al equipo de salud y convertirse en otra fuente de diseminación de la infección.

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepas:

Mycobacterium phlei

Nocardia sp

Colorantes Ziehl – Neelsen:

fucsina de Ziehl Neelsen

alcohol ácido

azul de metileno

Otros:

-asa bacteriológica

-portaobjetos

-mechero de Bunsen

-tripie

-pinzas

-rejilla de alambre con tela de asbesto

-recipiente de aluminio, solución desinfectante. -aceite de inmersión

-recipiente metálico

Equipo:

-microscopio



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	47 /166

SERVICIOS:

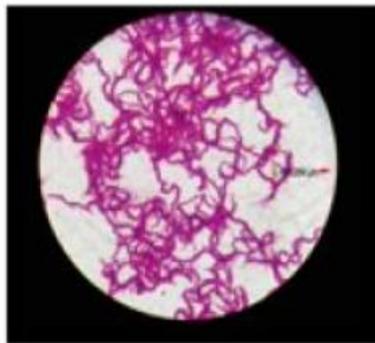
agua, luz, gas

PROCEDIMIENTO

1. A partir de un cultivo con *Mycobacterium phlei*, preparar un frotis. Después de utilizar el asa, **no esterilizarla directamente al fuego, colocarla en solución desinfectante.**
2. A partir de un cultivo con *Nocardia sp*, preparar un frotis. Después de utilizar el asa, **no esterilizarla directamente al fuego, colocarla en solución desinfectante.**
3. Fijar ambos frotis al calor con mucha precaución.
4. Colocar sobre el tripié una rejilla de asbesto y deposite sobre esta el recipiente metálico con agua.
5. En la parte superior del recipiente metálico coloque el frotis y proceda a calentar para iniciar la emisión de vapores.
6. Realizar la tinción de Ziehl-Neelsen.

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 cuando se ha enfriado.
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).



Lectura Ziehl Neelsen de *M. tuberculosis*, se observan cordones a 1000X. Fuente: Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2018;35(2):279.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	48 /166

Práctica 5 Morfología microscópica de *Mycobacterium* (BAAR +)

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 ebullición de vapores por 7 minutos



- Decolorar con alcohol ácido

Lavar con agua



- Cubrir con azul de metileno durante 30 segundos

Lavar con agua



Observar en el microscopio a 100X (inmersión)



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	49 /166

RESULTADOS

- * Observar y describir la morfología microscópica de cada uno de los microorganismos utilizados.
- * Los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR +) deben observarse de color rojo o rosa.

Cuestionario

- 1.- ¿Cuáles son las características microscópicas del género Mycobacterium?
- 2.- ¿Cuáles son las características de cultivo de este género?
- 3.- ¿A qué se denomina bacilo ácido alcohol resistente (BAAR)?
- 4.- ¿Qué es la Baciloscopia?
- 5.- Mencione qué medidas de bioseguridad debe aplicar el odontólogo ante un paciente con tuberculosis.
- 6.- ¿Para qué sirve la prueba de la tuberculina?

BIBLIOGRAFÍA

- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. (2011) Microbiología médica. 25a. ed. México: Mc Graw Hill.
- Carroll, K.C ; Morse S.A; Mietzner, T.A; Miller, S. (2016) Microbiología médica : 27a ed. México Mc Graw Hill.
- Negroni, M. (2018) Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica 3a ed. Buenos Aires: Médica panamericana.
- Nolte WA. (1986) Microbiología odontológica. México: Interamericana.
- Slots J, Taubman MA and Yankell S: (1992) Contemporary oral microbiology and immunology. 3a ed. Saint Louis: Mosby.
- Willett NP and White RR.(1991) Essential dental microbiology. Norwalk: Appleton & Lange Pila Pérez, Rafael; Holguín Prieto, Víctor Adolfo; Pila Peláez, Rafael; Rosales Torres, Pedro;
- Caballero Hernández, Danay Tuberculosis pulmonar y lingual. Presentación de un caso Revista Colombiana de Gastroenterología, vol. 29, núm. 2, abril-junio, 2014, pp. 183-187. Bogotá, Colombia <https://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v30s2/original5.pdf>



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	50 /166

- <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2020/pt202g.pdf>
https://support.google.com/websearch/answer/2364942?p=medical_conditions&hl=es-419 (fotos).
- Roberto, B.E. (2020). Tuberculosis. ¿Es la pandemia ignorada? Rev Mex Patol Clínica Med Lab, 67(2), 93-112.
- Forbes BA. Mycobacterial Taxonomy. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):380-383. doi: 10.1128/JCM.01287-16. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27927928; PMCID: PMC5277506.
- Dhar N, McKinney J, Manina G. Phenotypic Heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis. Microbiol Spectr. 2016 Nov;4(6). doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0021-2016. PMID: 27837741.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	51 /166

Práctica No. 6

MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN PATOLOGÍA PULPAR Y ABSCESO DENTAL

OBJETIVO

Conocer las características morfológicas y metabólicas de los microorganismos involucrados en la patología pulpar y absceso dental, así como su aislamiento e identificación.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Definición de absceso dental.
2. Clasificación clínica de alteraciones pulpares según la Asociación Americana de Endodoncia.
3. Tratamiento de patologías pulpares en dientes temporales y permanentes

FUNDAMENTO TEÓRICO

La cavidad bucal posee una gran diversidad de microorganismos conformada por la presencia de bacterias, hongos, protozoarios y virus.

Los microorganismos son los responsables de provocar enfermedades en el tejido pulpar y perirradicular. Las interacciones bacterianas y el intercambio de nutrientes entre las diferentes especies, es el factor determinante del desarrollo de la infección, el sistema de conductos radiculares representa un microambiente especial para su desarrollo. Donde sin duda, el crecimiento de ciertas especies bacterianas depende de los productos metabólicos de otras.

Un factor selectivo de la microbiota endodóntica es la baja concentración de oxígeno que tienen los conductos radiculares infectados, sobre todo cuando no hay comunicación de la cámara pulpar con la cavidad oral.

En la región apical, el bajo potencial de óxido-reducción del tejido necrótico favorece en un principio el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas y luego de las anaerobias estrictas. La microbiota presente en las pulpitis irreversibles asintomáticas, de respiración aerobia y anaerobia facultativa, se va



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	52 /166

transformando en un medio de respiración anaerobia estricta a medida que disminuye el potencial de óxidoreducción hístico, lo que, al dificultar los procesos fagocíticos, facilita el desarrollo y multiplicación microbiana, especialmente de bacterias anaerobias. Las bacterias gramnegativas anaerobias estrictas tienen una elevada capacidad proteolítica y colagenolítica, por lo que contribuyen en gran medida a la desestructuración del tejido conjuntivo pulpar.



Fig. 1. Comunicación de la cámara pulpar con el exterior.

Las vías de infección bacteriana para colonizar la pulpa son:

- 1) Túbulos dentinarios: Se refiere a la infección en la pulpa por la comunicación con dentina cariada, siendo los microorganismos anaerobios y las bacterias gram negativas las responsables de su alteración.
- 2) Comunicación directa de la cavidad oral con la pulpa: por caries, traumatismos, fisuras, fracturas, bruxismo, abrasión o por tallado de cavidades entre otros (Fig.1).
- 3) Vía periodontal: los microorganismos y sus productos pueden ingresar al conducto a través del foramen apical o conductos laterales y accesorios.
- 4) Anacoresis: es una vía discutida, donde se refiere al transporte de microorganismos a nivel de la sangre o linfa hacia un tejido inflamado, que podría ser la explicación para la necrosis en dientes traumatizados.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	53 /166

5) Extensión o contigüidad: la infección de la pulpa puede ocurrir como consecuencia de procesos infecciosos adyacentes, llegando a los conductos principal y/o lateral.

Para Liébana, la microbiota implicada en la infección pulpar ejerce su acción patógena por medio de diversos factores de virulencia que afectan la colonización y la capacidad de producir daño, a saber:

1. El número de bacterias que colonizan la pulpa será mayor cuanto mayor sea la puerta de entrada a la infección. Ello unido al tiempo, determinará el tipo de respuesta inflamatoria, donde la mayor relevancia la tiene la capacidad de las bacterias para multiplicarse.

2. Las características morfoestructurales del espacio pulpar, permite que las bacterias estén protegidas, otorgando las condiciones ideales de adhesión y la proliferación bacteriana.

3. Las alteraciones ocasionadas en el tejido pulpar son el resultado de la acción lesiva de exotoxinas, endotoxinas, enzimas y metabolitos, donde muchas de las bacterias implicadas en la patogenia de la enfermedad pulpar y periapical poseen estos elementos de virulencia.

4. Si los microorganismos, sus toxinas u otros productos derivados de su metabolismo ingresan al tejido pulpar, se producirá la inflamación de la pulpa. Ésta puede ser reversible o irreversible, esto dependerá de la respuesta defensiva del hospedero, y de la capacidad infecciosa de las bacterias. Dentro de la pulpa puede ocurrir una respuesta inflamatoria aguda, y posteriormente una respuesta inflamatoria crónica con reacciones inmunitarias asociadas. Si se desarrolla una inflamación amplia, puede ocurrir la necrosis pulpar como consecuencia del compromiso vascular. Por lo tanto, el cuadro clínico y la gravedad de la infección están relacionados con la interacción entre la microbiota presente en el espacio pulpar tras la infección bacteriana, y la respuesta defensiva del hospedador.

Microbiota de la Infección Endodóntica

Las infecciones polimicrobianas se extienden desde el conducto radicular hacia los tejidos perirradiculares contiguos. Los abscesos endodónticos son infecciones mixtas con una variedad de cepas de bacterias, por ejemplo, se ha demostrado que existen bacterias productoras de pigmento negro en cultivo puro que sólo producen una infección leve en un modelo animal, sin embargo, cuando estas bacterias se mezclan con otras especies (*Fusobacterium nucleatum*), la combinación genera abscesos e incluso puede producir infecciones generalizadas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	54 /166

Bystron y Sundqvist (1981), reportaron que las especies más prevalentes en la infección endodóntica pertenecían al género *Fusobacterium*, *Bacteroides* y *Peptostreptococcus*. La tecnología molecular ha permitido aislar a bacterias productoras de pigmento negro incluídas previamente en el género *Bacteroides*, se clasifican ahora en los géneros *Porphyromonas* (asacarolítico) y *Prevotella* (sacarolítico).

Cambios taxonómicos recientes de las antiguas especies *Bacteroides*

- *Porphyromonas*: productoras de pigmento negro (especies *Bacteroides* asacarolíticas)

Porphyromonas asaccharolyticus (usualmente no oral)

Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas endodontalis

- *Prevotella*: productora de pigmento negro (especies *Bacteroides* sacarolíticas)

Prevotella melaninogenica

Prevotella denticola

Prevotella loescheii

Prevotella intermedia

Prevotella nigrescens

Prevotella corporis

Prevotella tanneriae

- *Prevotella*: no pigmentado (especies *Bacteroides* sacarolíticas)

Prevotella buccae

Prevotella bivia

Prevotella oralis

Prevotella oris

Prevotella oulorum

Prevotella ruminicola

MATERIAL Y REACTIVOS

1 tubo caldo BHI (infusión cerebro corazón) con muestra de absceso dentoalveolar (Donada en Clínica Zaragoza).

1 tubo caldo de tioglicolato sembrado con muestra de absceso dentoalveolar (Donada en Clínica Zaragoza).

2 cajas agar sangre

1 caja agar Voguel Johnson

1 caja agar Bilis Esculina



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	55 /166

Equipo de Gram
Peróxido de hidrógeno
Mechero de Bunsen
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 descargar en un extremo de las cajas agar sangre y agar Voguel Johnson, realizar sembrado por estría cruzada e incubar en aerobiosis a 37°C durante 24 horas.
2. Tomar con un hisopo estéril una muestra de caldo tioglicolato con muestra de absceso dentoalveolar y descargar en un extremo de las cajas agar sangre y agar Bilis Esculina, realizar sembrado por estría cruzada e incubar en anaerobiosis a 37°C durante 24 horas.

SEGUNDA SESIÓN

1. Seleccionar colonias bien aisladas de las cuatro cajas sembradas en la sesión anterior. Anotar en tablas su morfología colonial y condiciones bajo las que crecieron (aerobiosis y anaerobiosis).
2. A partir de los cuatro medios de cultivo sembrados, hacer una selección de las colonias, realizar un frotis de cada uno de ellos y teñir por técnica de Gram. Anotar los resultados en una tabla.
3. De las colonias sembradas en anaerobiosis que resulten ser cocos Gram positivos, hacer prueba de catalasa.
4. Si se obtiene una colonia de *Staphylococcus* en el medio de Voguel Johnson, hacer prueba de catalasa.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	56 /166

Práctica 6 Microorganismos de importancia en patología pulpar y absceso dental

Previo a la sesión Práctica

Tomar muestra de la porción purulenta e inocular en los medios

incubar 24- 48 h /37°C

Propagación

Caldo BHI

Caldo Tioglicolato

Primera sesión

Agar Vogel Johnson

Agar sangre de carnero

Agar Bilis esculina

Agar Sangre de carnero



aislamiento

Incubar 24h/37°C

Incubar 24/37°C anaerobiosis

Segunda sesión

Observar y describir la morfología colonial característica

Catalasa y tinción de Gram





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	57 /166

RESULTADOS

1. De cada una de las cajas sembradas, anotar: morfología colonial, requerimientos de oxígeno, tipo de hemólisis, morfología microscópica, Gram, prueba de catalasa.
2. De las colonias sembradas en anaerobiosis:
 - Que resulten ser cocos Gram positivos reportar como posible *Peptoestreptococcus*
 - Las que resulten ser cocos Gram negativos, reportar como sospechosos de *Veillonella*.
 - Los bacilos Gram positivos reportar como posibles bacilos difteroides o *Lactobacillus*
 - Los bacilos Gram negativos reportar como posibles *Porphyromonas* o *Prevotella*, se observarán colonias negro-pigmentadas.

De las cajas incubadas en aerobiosis:

- De la caja de agar sangre que se observen cocos gram positivos en cadena reportar posibles *Streptococcus*.
- Cocos gram positivos en racimos reportar posibles *Staphylococcus*.
- Bacilos gram positivos reportar como posibles *Lactobacillus*.

De la caja de agar Voguel Jhonson si se observan colonias negras y cambio de color de rojo a amarillo por fermentación del manitol reportar como *Staphylococcus*.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué microorganismos son aislados con mayor frecuencia en infecciones de pulpa y absceso dental?
2. ¿Para qué se utiliza el medio de tioglicolato?
3. Mencione tres factores de virulencia producidos por bacterias asociadas a abscesos dentoalveolares y explique su mecanismo de acción.
4. Describa las características clínicas e histológicas del absceso dentoalveolar.
5. ¿Qué importancia tiene el conocimiento y control bacteriológico en los tratamientos del sistema de conductos?



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	58 /166

BIBLIOGRAFÍA

1. Kenneth M. Hargreaves & Louis.H. Berman & Louis.H. Berman & Kenneth M. Hargreaves (2022) : Odontología y Ortodoncia. Elsevier 12a Ed. Pag 992
2. Arena de Castellano A. Carvajal M. (2018) Histología Pulpar y Periapical. [Archivo pdf] [Histopatología pulpar y periapical.pdf \(972.5Kb\)](#)
3. Frank, A., et al. Endodoncia clínica y quirúrgica. Fundamentos de la práctica odontológica. Labor. Barcelona 1983. Págs. 77-78
4. Fouad, Ashraf F. ENDODONTIC MICROBIOLOGY.Wiley-Blackwell. Iowa. 2009.
5. Grossman, L. Endodontic Practice. 11a. Edición. Lea & Febiger. Philadelphia. 1988. Pág. 237
6. Guldener, P., Langeland, K. Endodoncia. Diagnóstico y tratamiento. Springer.-Cuellar. México. 1995. Pág. 128
7. Hargreaves, Kenneth M & Goodis, Harold E. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Quintessence Publishing Co. Chicago. 2002. Págs. 292-301
8. Lasala, A. Endodoncia. 3ª ed. Salvat. México. 1979. Págs. 97-107
9. Leonardo, M. Endodoncia. Tratamiento de los conductos radiculares. Panamericana. Buenos Aires. 1983. Págs. 158-167
10. Ørstavik, Dag, & Pitt Ford, Thomas R. Essential Endodontology. Blackwell Science. London. 1999. Págs. 106-127
11. Sundqvist, G, Microbiología endodontológica en Guldener P. & Langeland, K. Endodoncia. Diagnóstico y tratamiento. Springer y Cuellar. México. 1995. Pág. 81-83
12. Walton, R.E. Medicamentos intracaniculares. Clínicas Odontológicas de Norteamericana. Interamericana. México. 1987. Págs. 771-785
13. Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. Endodoncia. 2a ed. México: Manual Moderno; 2011. (UDC:RK351 T4918 2011)
14. Berman, L.H., Hargreaves, K.M, COHEN'S PATHWAYS OF THE PULP, 12th. ed.Elsevier. St. Louis Missouri. 2021.
15. Berutti, E y Gaglliani M. Manual de endodoncia. AMOLCA. 2017
16. Canalda Sahli C, Brau Aguadé E.. ENDODONCIA. Técnicas clínicas y bases científicas. 4a. ed. Elsevier Health Sciences Spain, 2019.
17. Fouad, Ashraf F. ENDODONTIC MICROBIOLOGY 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc.. Hoboken, NJ USA. 2017. 452 pp.
18. Goldberg, M. The Dental Pulp, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014
19. Gopikrishna, V. GROSSMAN'S ENDODONTIC PRACTICE 14 th. edition. Wolters Kluwer, New Delhi. 2020. Amazon Kindle
20. Hargreaves, K.M. SELTZER AND BENDER'S DENTAL PULP. 2nd. edition. Quintessence Publishing Co. Chicago, 2012. 493 pp. (UDC:RK351 S43 2012)



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	59 /166

21. Hargreaves KM., Cohen S. Cohen's pathways of the pulp, 10th. ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2011.
22. Ingle JI. Endodontics. 6th. ed. BC Decker Inc Hamilton, Ontario. 2008.
23. Leonardo MR, Leonardo RT. Endodoncia: Conceptos Biológicos y Recursos Tecnológicos. Sao Paulo: Artes Médicas Latinoamérica; 2009
24. Leonardo MR. Endodoncia. Tratamiento de conductos radiculares. Principios técnicos y biológicos. 2 vol. Sao Paulo: Artes Médicas Latinoamérica.2005.
25. Lima Machado ME. Endodoncia. Ciencia y tecnología. 3 volúmenes. Caracas, Venezuela. AMOLCA; 2016.
26. Malamed, Stanley F.. *Manual de Anestesia Local*, 6a ed, .Elsevier Health Science, Barcelona, España. 2013. 409 pp
27. Mjör IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Chicago: Quintessence Book; 2002.
28. Ørstavik, Dag, Ford, Thomas Pitt, ESSENTIAL ENDODONTICS.3rd ed. Blackwell Science Ltd. London. 2020. 393 pp
29. Ricucci, Domenico & Siqueira Jr, José F. Endodontology, An integrated biological and clinical view. Quintessence Publishing, Co. New Malden, Surrey, United Kingdom. 2013. 425 pp
30. Schwartz, R.& Canakapalli. V. Best practices in endodontics : a desk reference. Quintessence Publishing Co, Inc. Hanover Park, IL., 2015
31. Shenoy,A & Mala, K. ENDODONTICS. Principles and practices. Elsevier Relx India. Pvt Ltd. Hayana, India. 2016. 289 pp. Amazon Cloud: .<https://read.amazon.com/?asin=B07F9MKMRQ>
32. Siqueira, José F. TREATMENT OF ENDODONTIC INFECTIONS. Quintessence Publishing Co.Ltd. Berlin. 2011, 403 pp
33. Suresh Chandra, B., Gopikrishna, V. GROSSMAN'S ENDODONTIC PRACTICE 13 th. edition. Wolters Kluwer, New Delhi. 2015.
34. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res. 1981 Aug;89(4):321-8. doi: 10.1111/j.1600-0722.1981.tb01689.x. PMID: 6947391.
35. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Int Endod J. 2022 May;55 Suppl 3:512-530. doi: 10.1111/iej.13677. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34958494.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	60 /166

Práctica No. 7

MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN ENFERMEDAD PERIODONTAL

OBJETIVO

Conocer las principales características morfofisiológicas de los microorganismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Definición de biopelícula y cálculo dental.
2. Definición de periodontitis.
3. Clasificación de las enfermedades periodontales.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La cavidad bucal alberga una de las comunidades microbianas más heterogéneas del organismo humano, ocupando el segundo lugar (en términos de diversidad y complejidad de especies) después de la microbiota gastrointestinal. En la cavidad bucal se encuentran bacterias, arqueas, hongos y virus. Estos microorganismos están organizados en comunidades ecológicas complejas cuya composición puede variar entre los diferentes individuos, dependiendo de la edad, el estilo de vida y la genética del huésped.

Se ha estimado la presencia de más de 600 especies bacterianas en la cavidad bucal, estos microorganismos tienden a formar comunidades altamente organizadas que están inmersas en una matriz de exopolisacáridos, a las cuales se les denomina biopelícula donde adquieren protección y resistencia a la penetración de agentes externos.

Tradicionalmente se pensaba que la comunidad microbiana oral era la causante de la enfermedad y por lo tanto había que eliminarla. Actualmente se sabe que una vez que el microbioma oral se establece, se mantiene una interacción bidireccional entre el hospedero y la microbiota, donde ambos coexisten armoniosamente.

En este sentido la microbiota oral normal contribuye al desarrollo del sistema inmunológico del hospedero, impide la invasión y el crecimiento de microorganismos patógenos. Por lo anterior cuando esta microbiota se desequilibra, se da una disbiosis

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	61 /166

en la cual diversos factores de riesgo modifican la composición y abundancia de las especies, dando como resultado una microbiota patógena. (Figura 1)

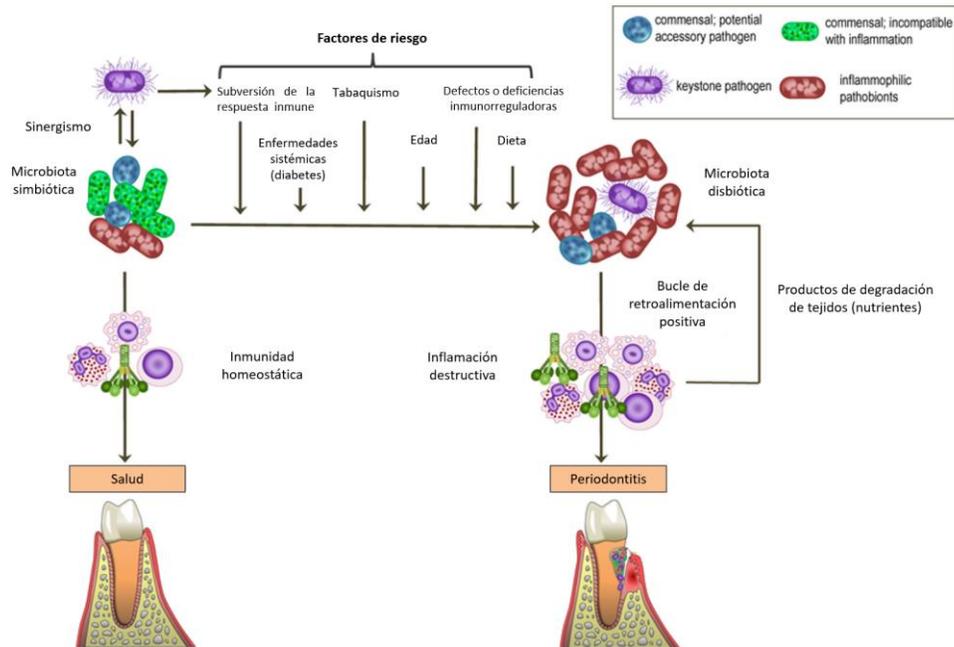


Figura 1. A diferencia de lo que sucede en la salud periodontal, la periodontitis se asocia con una comunidad polimicrobiana disbiótica. Los patógenos accesorios aportan nutrientes a los patógenos claves, como *P. gingivalis*. Cuando diversos factores de riesgo hacen que aumente el número de patobiontes en un huésped susceptible, se genera inflamación, que, a su vez, puede exacerbar la disbiosis mediante el suministro de nutrientes para las bacterias (péptidos de colágeno y compuestos que contienen hemo). (Modificado de Hajishengallis et al. 2020)

Entre los microorganismos que se asocian con mayor fuerza al inicio y desarrollo de la periodontitis, se encuentran en la microbiota subgingival, un grupo de tres organismos Gram negativos, llamado "Complejo Rojo del Dr. Socransky", compuesto por *Prophyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*.

Estos microorganismos han sido denominados patobiontes en lugar de patógenos porque, aunque están implicados en enfermedades, normalmente están presentes en menor abundancia en la microbiota de sujetos sin marcadores clínicos de periodontitis. Si bien, los diferentes patobiontes (y sus enzimas difusibles, como lipasas, proteasas y nucleasas) son un factor "gatillo" necesario para la enfermedad periodontal, la respuesta inflamatoria mediada por el hospedero es lo que termina desencadenando la



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	62 /166

enfermedad. A este hecho se le suman diversas condiciones del individuo como: factores genéticos, epigenéticos, susceptibilidad, dieta baja en micronutrientes (vitaminas C y D), tabaquismo y enfermedades sistémicas.

Los factores ambientales pueden afectar considerablemente la composición del microbioma oral y provocar la aparición de trastornos relacionados con el estilo de vida. La evidencia que han aportado muchas publicaciones indican que *P. gingivalis* aumenta el riesgo de trastornos metabólicos, inflamatorios y autoinmunes a través de un mecanismo que aún no se ha dilucidado del todo.

Además, el tabaquismo puede promover directamente cambios en el entorno microbiano a través del contacto directo con los miembros de la comunidad microbiana, o indirectamente, al interferir con el sistema inmunológico del hospedero, el proceso de formación de biopelícula o la tensión de oxígeno.

La biopelícula, el cálculo, la microbiota oral y los factores locales del huésped, forman una hiperrespuesta donde pueden intervenir las hipersensibilidades tipo I, III y IV; y la hiperactivación del complemento, por vía alterna.

Socransky y col. (1998) establecieron un modelo (Figura 2) que representa las relaciones entre bacterias de la biopelícula:

- Las especies del complejo rojo están fuertemente asociadas con la profundidad de la bolsa y con el sangrado al sondaje. *Tannerella forsythia*, *Porphyromona gingivalis* y *Treponema denticola* se encuentran en mayor número según aumenta la profundidad de bolsa.
- Los microorganismos del complejo naranja también muestran una asociación significativa con la profundidad de bolsa.
- *Actinomyces naeslundii* y *Streptococcus sanguis* son ejemplos de especies bacterianas que no se han visto asociadas de manera estadísticamente significativa con la profundidad de bolsa.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	63 /166

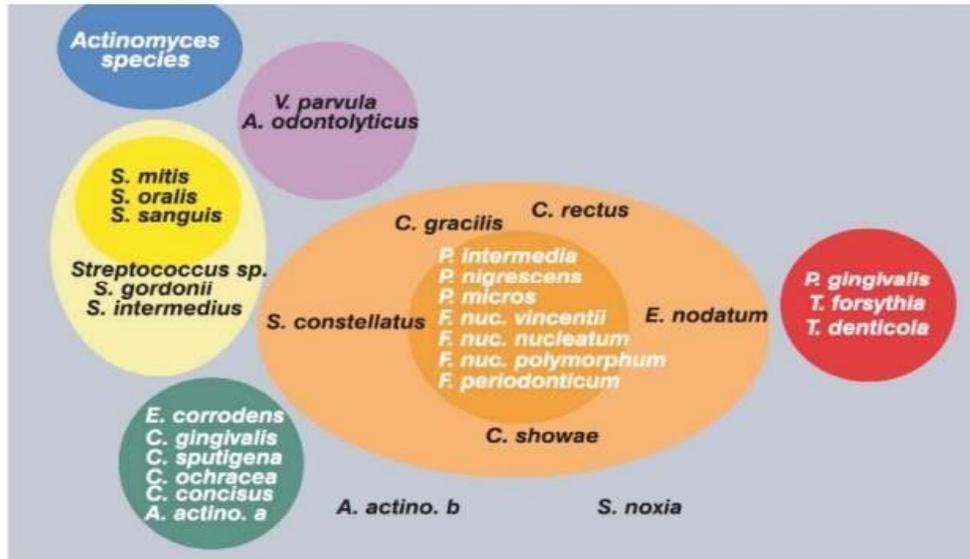


Fig. 2. Diagrama de grupos de bacterias asociadas a enfermedades gingivales. Fuente: Propia

Se ha descrito una gran variedad de enzimas producidas por bacterias presentes en el surco gingival, cuyo sustrato son componentes del hospedero lo que resulta en la formación de bolsas periodontales y destrucción de los tejidos (Cuadro I).

Cuadro 1. Tipos de bacterias que se encuentran en el surco gingival y los sustratos que necesitan para producir diferentes enzimas.

Tipo de bacterias	Sustratos	Enzimas producidas
<i>Staphylococcus</i>	Ácido hialurónico, plasma, ADN, regiones sebáceas	Hialuronidasa, coagulasa, lipasa, desoxirribonucleasa.
<i>Streptococcus</i>	Ácido hialurónico, fibrina, ADN, plasma	Hialuronidasa, estreptoquinasa, estreptodornasa, hemolisinas.
Coryneformes	Ácido hialurónico, sistema nervioso central	Hialuronidasa, neuroaminidasa
Fusobacterias	Plasma, fosfolípidos, proteínas	Colagenasa, fosfolipasa, proteasas
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Ácido hialurónico, colágeno, epitelio, endotelio.	Hialuronidasa, colagenasa, epiteliotoxinas, endotoxina
Cocos Gram (-)	Proteínas, lípidos	Endotoxinas, lipasas

Fuente: Propia



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	64 /166

MATERIAL Y REACTIVOS

Muestras bacterianas:

1 tubo con muestra de cálculo dental (Donado en Clínica Zaragoza) en caldo tioglicolato.

Medios de cultivo:

1 caja agar sangre

1 caja agar sangre de carnero al 5% con kanamicina, hemina y menadiona

Pruebas bioquímicas:

2 tubos caldo lactosa + rojo

fenol 2 tubos caldo manitol +
rojo fenol

2 tubos caldo sacarosa + rojo

fenol 1 tubo caldo nitrato

Reactivos:

Peróxido de hidrógeno al 3%

Ácido sulfanílico

Solución alfa-naftilamina

Colorantes:

1 equipo de Gram

Portaobjetos

1 paquete con hisopos estériles.

Cámara de anaerobiosis

Servicios: Agua, luz, gas.

PROCEDIMIENTO

Esta práctica se realiza en 2 sesiones:



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	65 /166

PRIMERA SESIÓN:

1. Tomar una muestra de caldo tioglicolato con cálculo dental con un hisopo estéril, y sembrar por estría cruzada la caja de agar sangre y la caja de agar sangre con Kanamicina, hemina y menadiona. Incubar en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 a 48 hrs. y refrigerar para la segunda sesión de la práctica.

SEGUNDA SESIÓN

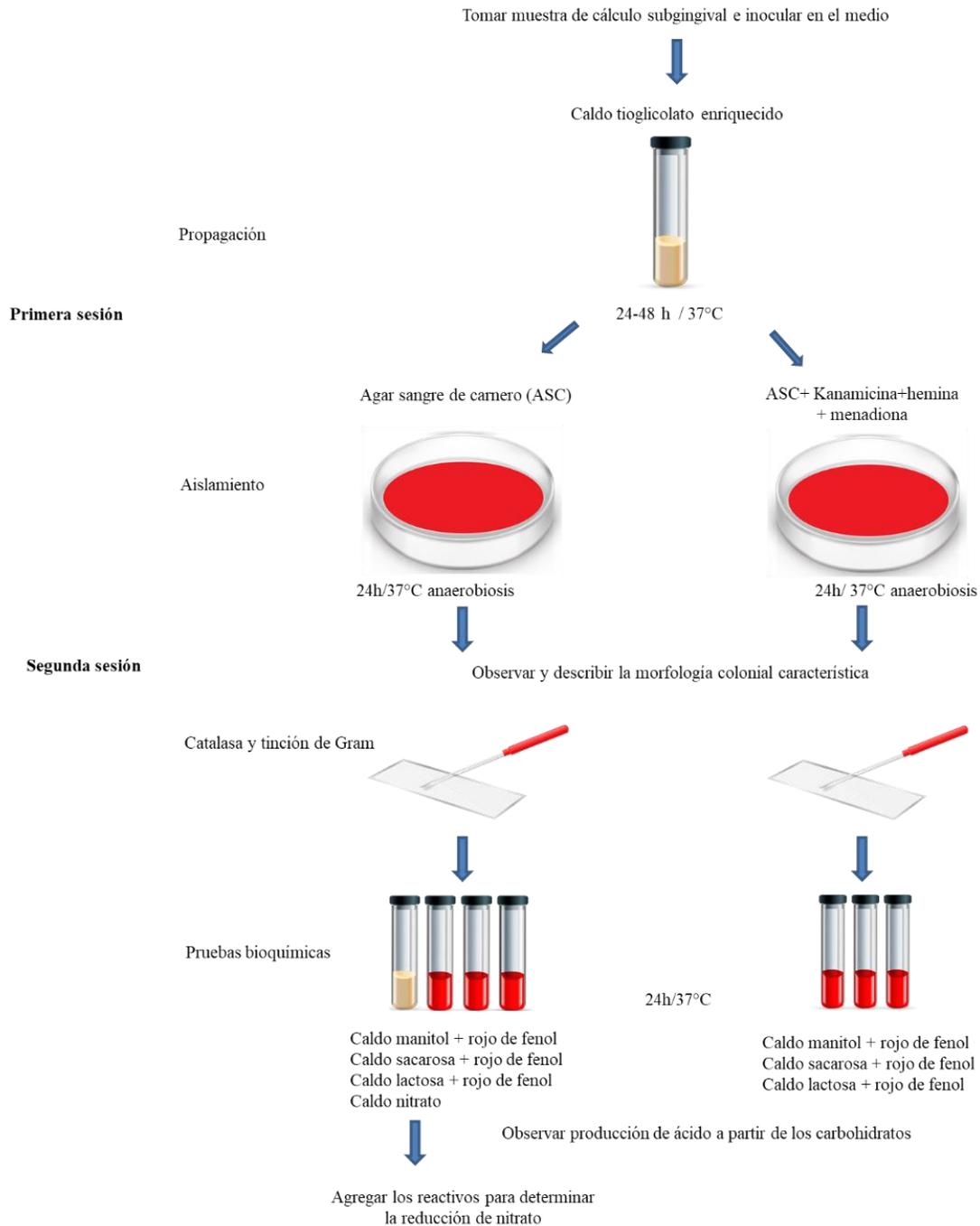
1. Seleccionar colonias aisladas de las 2 placas sembradas y anotar su morfología colonial.
2. De las colonias seleccionadas hacer un frotis de cada una de las colonias y teñirlos por la técnica de Gram, anotar los resultados y ver el cuadro 2.
3. Elegir colonias con morfología típica y tipo de Gram correspondiente a las descritas en el cuadro 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 los caldos lactosa, manitol y sacarosa.
 - A partir de la caja de agar sangre inocular colonias aisladas en los medios líquidos de manitol, sacarosa, lactosa y nitrato.
4. Realizar prueba de catalasa de cada una de las cajas, en un portaobjetos colocar una gota de peróxido de hidrógeno y agregar una asada de la colonia a probar.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	66 /166

Práctica 7 Microorganismos de importancia en enfermedad periodontal

Previo a la sesión Práctica





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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	67 /166

Cuadro 2. Género probable de acuerdo con el medio de cultivo y tinción de Gram

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

Fuente: Propia

Cuadro 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	-	+	+	+	-	+

F

1. *Arachnia propionica*

2. *Actinomyces israelii*

3. *Actinomyces bovis*

4. *Actinomyces naeslundii*

5. *Actinomyces viscosus*

6. *Actinomyces odontolyticus*

7. *Actinomyces eriksonii*

8. *Rothia dentocariosa*

w- reacción débil

d- diferentes reacciones



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	68 /166

Cuadro 4. 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 gingivalis*
3. *Eikenella corrodens*
4. *Veillonella sp.*
(d- diferentes reacciones)

RESULTADOS

- a. Prueba de catalasa: si hay presencia de burbujas la prueba es positiva.
- b. Fermentación de carbohidratos: esta se observa por el cambio de color del indicador rojo fenol a amarillo (viraje de color) indicando producción de ácido.
- c. 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.
- d. Interpretar los resultados según los cuadros de identificación correspondientes y reportar género y especie probablemente aislados. Cuadros 3 y 4.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	69 /166

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Qué factores de patogenicidad posee *Porphyromonas gingivalis* y como intervienen en la patogénesis de la enfermedad periodontal?
- 2.- Relacione la destrucción tisular de la enfermedad periodontal con las reacciones de hipersensibilidad tipo I, III y IV.
- 3.- Defina enfermedad periodontal con sus propias palabras.
- 4.- Explique para que se utilizan las pruebas bioquímicas

BIBLIOGRAFÍA

- Araos, R., & D'Agata, E. M. C. (2019). The human microbiota and infection prevention. *Infection control and hospital epidemiology*, 40(5), 585–589. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.28>
- Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H., & Koo, H. (2018). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends in microbiology*, 26(3), 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>
- Chapple, I. L., Bouchard, P., Cagetti, M. G., Campus, G., Carra, M. C., Cocco, F., et al. (2017). Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*, 44 Suppl 18, S39–S51. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12685>
- Di Stefano, M., Polizzi, A., Santonocito, S., Romano, A., Lombardi, T., & Isola, G. (2022). Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 5142. <https://doi.org/10.3390/ijms23095142>
- Fine D, Markowitz K, Furgang D and Velliyagounder K. (2010). Aggregatibacter actinomycetemcomitans as an Early Colonizer of Oral Tissues: Epithelium as a Reservoir. *Journal of Clinical Microbiology*;48(12):4464–4473.
- Hajishengallis, G., Chavakis, T., & Lambris, J. D. (2020). Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontology 2000*, 84(1), 14–34. <https://doi.org/10.1111/prd.12331>



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	70 /166

- Henderson B, Ward J, Ready J. (2010). *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen *Periodontology 2000*; 54:78– 105.
- Kato, T., Yamazaki, K., Nakajima, M., Date, Y., Kikuchi, J., Hase, K., Ohno, H., & Yamazaki, K. (2018). Oral Administration of Porphyromonas gingivalis Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome. *mSphere*, 3(5), e00460-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00460-18>
- Nath, S., Pulikkotil, S. J., Weyrich, L., Zilm, P., Kapellas, K., & Jamieson, L. (2022). Effect of Periodontal Interventions on Characteristics of the Periodontal Microbial Profile: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms*, 10(8), 1582. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081582>
- Nearing, J. T., DeClercq, V., Van Limbergen, J., & Langille, M. G. I. (2020). Assessing the Variation within the Oral Microbiome of Healthy Adults. *mSphere*, 5(5), e00451-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00451-20>
- Newman M, Takei H, Carranza F. (2012). Carranza's Clinical Periodontology. 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Radaic, A., & Kapila, Y. L. (2021). The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 1335–1360. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.010>
- Scannapieco, F. A., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2021). Dysbiosis revisited: Understanding the role of the oral microbiome in the pathogenesis of gingivitis and periodontitis: A critical assessment. *Journal of periodontology*, 92(8), 1071–1078. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0120>
- Sedghi, L. M., Bacino, M., & Kapila, Y. L. (2021). Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 766944. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.766944>
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S. V., & Kapila, Y. L. (2021). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontology 2000*, 87(1), 107–131. <https://doi.org/10.1111/prd.12393>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	71 /166

Valm A. M. (2019). The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *Journal of molecular biology*, 431(16), 2957–2969. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.016>

Wade W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological research*, 69(1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	72 /166

Práctica No. 8

IDENTIFICACIÓN DE CANDIDA EN CAVIDAD ORAL

OBJETIVO

Identificar las características morfológicas y fisiológicas de *Candida albicans*

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Morfología de *Candida albicans*.
2. Describe las características clínica de la candidiasis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Candida albicans tiene la particularidad de ser un hongo dimórfico, alternando entre formas unicelulares y pluricelulares. En su estado unicelular, actúa como comensal, sin representar un riesgo de invasión tisular. No obstante, al transformarse en forma pluricelular, adquiere la habilidad de invadir y dañar tejidos, desencadenando la enfermedad. Esta transformación inicia con el desarrollo de un tubo germinativo a partir de la levadura, que luego da paso a la formación de pseudohifas, hifas y micelio, características observables a través del microscopio mediante medios de cultivo especializados.

La diferenciación de *Candida albicans* frente a otras especies se realiza mediante pruebas específicas, destacando la formación de tubo germinativo en suero, que es indicativa de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Es importante mencionar que, después de un período de incubación de entre 3 a 4 horas, todas las especies de *Candida* son capaces de formar tubos germinativos, con la excepción de *C. glabrata*. Además, la capacidad de producir pseudomicelio y clamidoconidios se examina en medios de cultivo sencillos, como el agar harina de maíz o agar papa dextrosa, ver Imagen 1.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	73 /166



Imagen 1. Obtenida de M.McGinnis 2000.Doctorfungus Corporation.

Las infecciones por hongos del género *Candida* pueden variar desde problemas leves en la piel y las membranas mucosas hasta infecciones sistémicas graves. Aunque hay más de 150 especies de *Candida*, solo unas pocas son responsables de la mayoría de las infecciones humanas. Las nueve especies de *Candida* más comúnmente identificadas como patógenas para los humanos son:

1. ***Candida albicans***
2. ***Candida glabrata***
3. ***Candida parapsilosis***
4. ***Candida tropicalis***
5. ***Candida krusei***
6. ***Candida auris***
7. ***Candida guilliermondii***
8. ***Candida lusitaniae***
9. ***Candida dubliniensis***

Estas especies de *Candida* tienen la capacidad de causar una amplia gama de infecciones, desde superficiales hasta sistémicas, dependiendo de la especie involucrada y del estado inmunológico del hospedero.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	74 /166

Para la identificación de las especies de *Candida*, las pruebas bioquímicas de fermentación (zimograma) y asimilación (auxonograma) de carbohidratos son herramientas clave. Estas pruebas se basan en la capacidad de las diferentes especies de *Candida* para metabolizar una variedad de fuentes de carbono. La identificación precisa de las especies es crucial para el tratamiento efectivo, dado que algunas especies pueden ser resistentes a los tratamientos antifúngicos estándar.

Pruebas de Fermentación (Zimograma)

El zimograma se basa en la capacidad de las levaduras para fermentar varios azúcares, produciendo gas y/o alcohol como productos finales. Este proceso puede ser monitoreado en un medio de cultivo que contenga un indicador de pH para detectar cambios ácidos resultantes de la fermentación, y en algunos casos, un sistema de captura para el gas producido. Los azúcares comúnmente utilizados en estas pruebas incluyen glucosa, maltosa, sacarosa, y lactosa, entre otros. La producción de gas y/o cambios en el pH indican la fermentación del azúcar específico.

Pruebas de Asimilación (Auxonograma)

El auxonograma evalúa la habilidad de las levaduras para utilizar diversas fuentes de carbono como única fuente de energía, asimilando estos compuestos para su crecimiento. Este método implica la inoculación de las cepas en placas que contienen medios mínimos con una única fuente de carbono (por ejemplo, diferentes tipos de azúcares como glucosa, galactosa, xilosa, etc.). La evaluación se realiza observando el crecimiento de las colonias en estos medios. La capacidad o incapacidad de crecer en presencia de ciertos azúcares permite la diferenciación entre especies de *Candida*.

En 1995, Sullivan y colaboradores identificaron una nueva especie emergente, denominada *C. dubliniensis*, principalmente en pacientes con VIH-SIDA, quienes mostraban resistencia al fluconazol. Actualmente, esta especie también ha sido aislada en individuos diabéticos y otros grupos de pacientes. *C. dubliniensis* es muy similar a *C. albicans*, llegando a considerarse casi gemelas, y en un principio solo se podía diferenciar mediante secuenciación genética. Hoy en día, sin embargo, existen pruebas fenotípicas que permiten distinguir entre estas dos especies.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	75 /166

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepa: Candida albicans

Medios de cultivo:

- 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
- Colorantes para tinción de Gram

Material

Pinzas

Equipo

1 microscopio

Incubadora

SERVICIOS

Agua, luz, gas.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	76 /166

PROCEDIMIENTO

I.- CRECIMIENTO EN AGAR SABOURAUD

Tomar una asada de la cepa de *C. albicans* y sembrar por estría cruzada la caja de agar Sabouraud e incubar a 37°C por 24 hrs. y leer la morfología colonial.

II.- PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE TUBOS GERMINATIVOS

Tomar una muestra de la cepa *C. albicans* y suspenderlo en un tubo que contiene 0.5 ml de suero humano. Incubar a 37°C por más de tres horas.

III.- 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.

IV. PRUEBA DE ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS (AUXONOGRAMA).

1. En una placa de agar base levadura – nitrógeno + púrpura de bromocresol, sembrar por estría masiva *C. albicans*.

2. Colocar discos de papel filtro impregnados con las diferentes soluciones de carbohidratos, distribuirlos lo más separado posible en la placa.

3. Incubar por 24 horas a 37°C.

V. PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS (ZIMOGRAMA).

1. A cada tubo Durham con caldo levadura – nitrógeno + púrpura de bromocresol + carbohidrato, inocular por agitación *C. albicans*.

2. Incubar de 24 a 48 horas a 37°C.

VI. TINCION DE GRAM

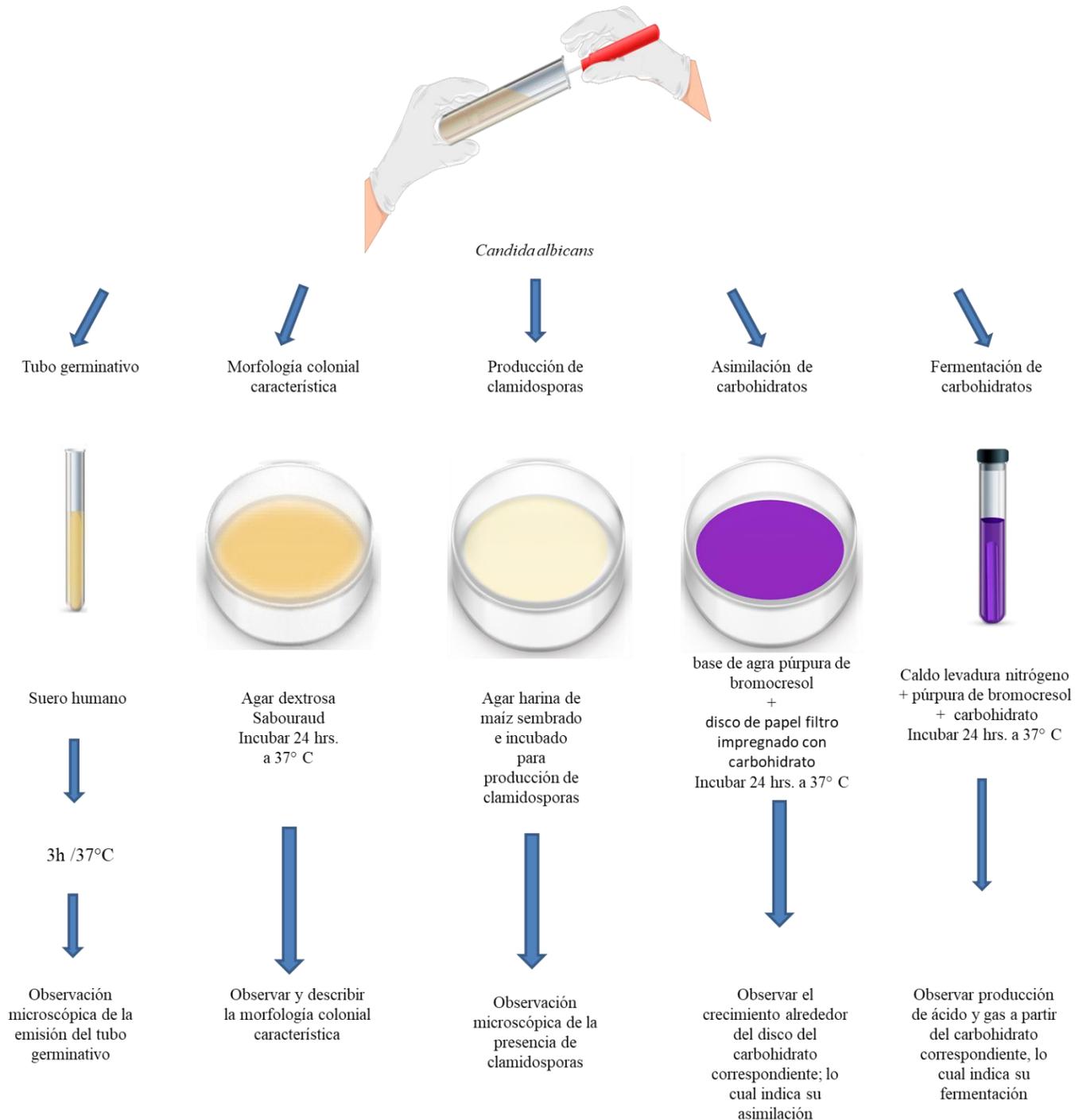
1. Realizar la Tinción de Gram

Observar al microscopio en 100X.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	77 /166

Práctica 8 Identificación de *Candida albicans*





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	78 /166

RESULTADOS

I. CRECIMIENTO EN AGAR SABOURAUD

Leer la morfología colonial de las colonias de *C. albicans*.

II. 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.

III. AGAR HARINA DE MAÍZ.

Observar al microscopio a 40X la formación de clamidosporas de pared gruesa al final de las pseudohifas.

IV. AGAR BASE LEVADURA – NITROGENO + PURPURA DE BROMOCRESOL (AUXONOGRAMA).

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

V. TUBO DURHAM CON CALDO LEVADURA – NITROGENO + PURPURA DE BROMOCRESOL (ZIMOGRAMA).

Después de la incubación, se observarán dos reacciones: La formación de una burbuja por producción de gas (fermentación, zimograma) el cual es el único criterio de fermentación de carbohidratos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	79 /166

Imagen 4. Resultados obtenidos del Grupo 3353-2024 del Módulo de Mecanismos Infecciosos y Respuesta Inmune del Sistema estomatognático. Facultad de Estudios Zaragoza.



El cambio de color en el tubo durham con caldo levadura-nitrógeno y púrpura de bromocresol indica la asimilación de los carbohidratos.

VI. TINCION DE GRAM

Observar la morfología microscópica 100X de *Candida albicans*.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	80 /166

CUESTIONARIO

- 1.-Explique el cuadro clínico de la candidiasis eritematosa oral y mencione la edad en la que se presenta con más frecuencia.
- 2.- Investigue la epidemiología en México de la candidiasis oral.
- 3.-Explique el término oportunista y cuáles son los factores predisponentes de las candidiasis.
- 4.-Investigue el tratamiento de la candidiasis local y sistémica.

BIBLIOGRAFIA

- AL-Dabbagh, A. A. H., Ajah, H. A., & Salman, J. A. S. (2022). Detection of Virulence Factors from *Candida* spp. Isolated from Oral and Vaginal Candidiasis in Iraqi Patients. *Original Articles*. Department of Biology, College of Science, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359464.2420>
- Arenas, R., & Torres Guerrero, E. (2019). *Micología médica ilustrada* (6a ed.). Mc Graw-Hill Interamericana
- Bagán, S. J. V. (2010). *Medicina bucal* (2a ed.). Medicina Oral S.L.
- Cannon, R. D., & Lamping, E. (2019). *Antifungal Agents: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Calderone, R. A., & Clancy, C. J. (2012). *Candida and candidiasis*. En R. A. Calderone & C. J. Clancy (Eds.), *Candida and Candidiasis* (2nd ed., pp. 1-16). ASM Press.
- Castellanos, S. J. L., Díaz, G. L. M., & Gay, Z. O. (2015). *Medicina en odontología: Manejo dental de pacientes con enfermedades sistémicas* (2a ed.). El Manual Moderno.
- Engleberg, N. K., Di Rita, V. J., & Dermody, T. S. (2013). *Mecanismos de las enfermedades microbianas* (5a ed.). Filadelfia.
- González, F. R. M., & Molina, L. J. (2009). *Microbiología bucal* (4a ed.). Méndez Editores.
- Liébana, U. J. (2002). *Microbiología oral* (2a ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Lira, L. A., & Rondanelli, B. M. (2011). *Atlas de patología de los maxilares*. Ripano.
- Marsh, P. D., & Martin, M. V. (2011). *Microbiología oral* (5a ed.). Amolca.
- Negrón, M. (2018). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica* (3a ed.). Médica Panamericana.
- Neville, B. (2015). *Oral and Maxillofacial Pathology* (4a ed.). Saunders Company.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	81 /166

Regezi, J., Sciubba, J. J., & Jordan, R. C. K. (2017). Oral pathology: Clinical pathologic correlations (7th ed.). Elsevier.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews, 36(2), 288-305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	82 /166

Práctica No. 9

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

OBJETIVO

Comparar la acción antimicrobiana de soluciones desinfectantes de uso común en la práctica odontológica.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Concepto de desinfectante (biocida) y antiséptico
2. Clasificación de los desinfectantes
3. Mecanismos de acción de los desinfectantes

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los antisépticos y desinfectantes representan una opción en la prevención y control de las infecciones. Existen factores dependientes que influyen entre la interacción del desinfectante y el microorganismo como:

- Dependientes del desinfectante: composición química, concentración del principio activo y modo de acción.
- Dependientes de la exposición: Tiempo, temperatura, pH y sustancias interferentes (sangre, saliva y residuos orgánicos).
- Dependientes del Microorganismo: Concentración de microorganismos, tamaño, morfología y afinidad por los lípidos.

El odontólogo emplea en su práctica clínica diferentes soluciones de uso cotidiano a diferentes concentraciones, con fines terapéuticos y antisépticos, los cuáles actúan eliminando/inhibiendo el crecimiento o la multiplicación bacteriana.

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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	83 /166

Eugenol

Es un líquido incoloro a amarillo claro derivado del fenol, 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. En altas concentraciones tiene efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de proteínas, lo que resulta en daño a la membrana celular. En bajas concentraciones tiende a estabilizar las membranas celulares, lo cual previene la penetración de las bacterias a los conductos dentarios.

Es tóxico y capaz de provocar necrosis y trombosis de los vasos sanguíneos al ser aplicado directamente sobre el tejido pulpar.

Las acciones farmacológicas del eugenol, pueden afectar negativamente otras funciones importantes de algunas células del tejido dañado, lo que está muy relacionado con la forma en que se use.

A pesar de que su aplicación es común, el eugenol puede llegar a provocar lesiones cáusticas o quemaduras superficiales cuando es colocado en forma directa y en altas concentraciones en los tejidos blandos. La severidad del daño es proporcional al tiempo de exposición, a la dosis y a la concentración. Se ha visto que el eugenol puede llegar a mostrar tanto *in vivo* como *in vitro* diferentes tipos de toxicidad, tales como daño directo al tejido, dermatitis, reacciones alérgicas, disfunciones hepáticas, coagulación intravascular diseminada, hipoglicemia severa, e incluso la muerte por falla orgánica múltiple.

Es importante destacar que el eugenol nunca debe utilizarse solo y seguir las indicaciones del fabricante en cuanto a proporciones polvo líquido.

Peróxido de hidrógeno

Es un líquido compuesto por hidrógeno y oxígeno de color azul claro que cuando es diluido en distintas concentraciones toma aspecto incoloro. Es un agente oxidante que reacciona cuando entra en contacto con materia orgánica, metales y soluciones alcalinas por producción de radicales libres hidroxilo que reaccionan con lípidos, proteínas y ADN.

Un mecanismo de acción antibacteriano de este compuesto es la liberación de oxígeno después de ser descompuesto por acción enzimática de la catalasa o enzimas similares; esta liberación de oxígeno tiene efecto tóxico sobre microorganismos anaerobios, por lo tanto, su viabilidad disminuye.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	84 /166

Su acción antiséptica y antimicrobiana, aun cuando se considera de amplio espectro, es mayor para Gram positivos que para Gram negativos. También Incluye bacterias esporuladas, virus y levaduras. La concentración en la cual es usada determina su efecto antiséptico, al ser bactericida entre el 3 y 6%; esta concentración tiene bajo efecto sobre esporas y necesita un tiempo de contacto más prolongado. Por el contrario, las soluciones de concentraciones altas de 10 y 30% han mostrado efecto rápido in vitro sobre esporas.

Hipoclorito de sodio

Esta solución es una sal formada por ácido hipocloroso (HOCl) e hidróxido de sodio (NaOH), muy soluble en agua y relativamente inestable; es usado como primera elección en los tratamientos de conductos radiculares, por sus propiedades antimicrobiana, antimicótica y antiviral, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana.

En endodoncia se utilizan soluciones al 1, 2 y 5% para la irrigación de conductos por su gran actividad antimicrobiana.

En México la concentración de este producto debe de estar anotada en la etiqueta y debemos basarnos en ese dato para aplicar la fórmula de solución porcentual deseada:

$$V2 = \frac{C1 (V1)}{C2}$$

Donde

V1: Es el volumen de la solución final de cloro que deseamos preparar (Cantidad de solución que deseo preparar en mililitros)

V2: Es el volumen que requerimos de la solución concentrada de cloro (Cuanto cloro tomaré en mililitros del envase original).

C1: Es el porcentaje final de cloro que queremos preparar (1%, 2%, 5%)

C2: Es la concentración de cloro que contiene el envase original (revisar la etiqueta del producto)



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	85 /166

Hidróxido de calcio

Se presenta como un polvo blanco, alcalino, poco soluble en agua. Es un compuesto altamente inestable, puesto que al entrar en contacto con el dióxido de carbono regresa a su estado de carbonato de calcio. Por ello, se recomienda que sea almacenado en un frasco bien cerrado.

Se ha demostrado que actúa por disociación iónica y que su efecto antimicrobiano se debe a su elevado pH (12.8). La acción bactericida ha sido relacionada con la liberación de iones hidroxilo, los cuales son radicales altamente oxidantes, con una gran reactividad, lo que dificulta que puedan difundirse a sitios distantes. También se ha sugerido que tiene la capacidad de absorber el dióxido de carbono, lo que puede contribuir a su actividad antimicrobiana.

Es una de las sustancias más utilizadas en endodoncia desde su introducción por Hermann en 1920. Ha sido propuesto para un gran número de procedimientos, tales como: medicación intra-conducto, solución irrigadora, tratamiento de reabsorciones, cemento sellador, reparación de perforaciones, recubrimientos pulpaes, apexificación y apexogénesis. Estimula a los odontoblastos para la formación de dentina terciaria e induce el cierre de los ápices. No está indicado su uso en recubrimientos directos ya que provoca la calcificación de los accesos a conductos radiculares.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	86 /166

Derivados Fenólicos

Los derivados fenólicos como el **Formocresol** y el **Paramonoclorofenol alcanforado** fueron utilizados ampliamente en la práctica odontológica.

Actualmente su uso está contraindicado debido a que se han demostrado sus efectos carcinogénicos, hepatotóxicos y mutagénicos según la FDA.

Clorhexidina

Es el antiséptico estándar para la prevención de infecciones. Su forma más usada es el digluconato. Las concentraciones varían desde 0,003%, en algunos enjuagues orales, hasta el 4%, en jabones quirúrgicos. Como antiséptico oral, la clorhexidina tiene una mayor sustantividad que otros productos. Una vez se realiza un enjuague, aproximadamente el 30% del compuesto se retiene en la cavidad oral, a través de interacciones electrostáticas con los grupos ácidos, sobre las macromoléculas de las secreciones mucosas que cubren las superficies orales.

A bajas concentraciones es bacteriostática y a altas concentraciones es bactericida. Algunos microorganismos como *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Enterococcus spp.*, y *Acinetobacter spp.* se han reportado como resistentes. La clorhexidina tiene efecto contra bacterias grampositivas y gramnegativas, anaerobias facultativas, aerobias, hongos, levaduras y virus con envoltura. Se ha reportado que no es activa contra esporas ni contra el género *Mycobacterium*, ya que estas tienen una barrera impermeable que la clorhexidina no puede atravesar. Las agrupaciones bacterianas que forman biopelículas también pueden sobrevivir a sus efectos. Es eficiente en tratamientos periodontales, sus presentaciones comerciales son en gel y enjuagues bucales.

Vera y Col. (2012), mencionan que una desventaja de esta solución es la formación de un precipitado altamente tóxico, citotóxico y carcinogénico cuando se combina con hipoclorito de sodio, conocido como paracloroanilina.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	87 /166

Solución electrolizada de superoxidación con pH neutro al 0.0015%.

Las soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) tienen efecto antiséptico, desinfectante y esterilizante. Son desarrolladas a partir de agua común y sal a la cual se somete a corriente eléctrica generando diversos elementos como O, H y Cl.

Su mecanismo de acción se atribuye al efecto de oxidación de los grupos sulfhídrico y aminoácidos de la pared bacteriana, lo que afecta el proceso de respiración y nutrición microbianas, mediante oxidación de los componentes respiratorios, inhibición de la síntesis de proteínas, mientras que sobre los virus genera represión en la síntesis de RNA y ruptura del material genético.

Un estudio realizado por la Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, reporta que esta solución tiene una nula capacidad antimicrobiana en contra de *E. faecalis* en los tiempos sugeridos por sus fabricantes. Existen otros estudios que han demostrado su ineficacia contra otras bacterias de cavidad oral. En el mercado existen varios productos como por ejemplo el OXORAL.

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepas: *Staphylococcus aureus*

Streptococcus mutans

Escherichia coli

Medios de cultivo: 3 cajas con agar Mueller Hinton

Material: 1 asa bacteriológica

1 tubo con discos de papel filtro estéril Mechero de bunsen

Soluciones: Eugenol

Clorhexidina al 0.2%

Hipoclorito de sodio al 1%

Hipoclorito de sodio al 2% (comercial)

Hipoclorito de sodio al 5%

Peróxido de hidrógeno comercial (Zonite)

Peróxido de hidrogeno 3%

Hidróxido de calcio + agua destilada

Suero fisiológico

Solución electrolizada de superoxidación



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	88 /166

Incubadora

SERVICIOS:

Agua, luz, gas.

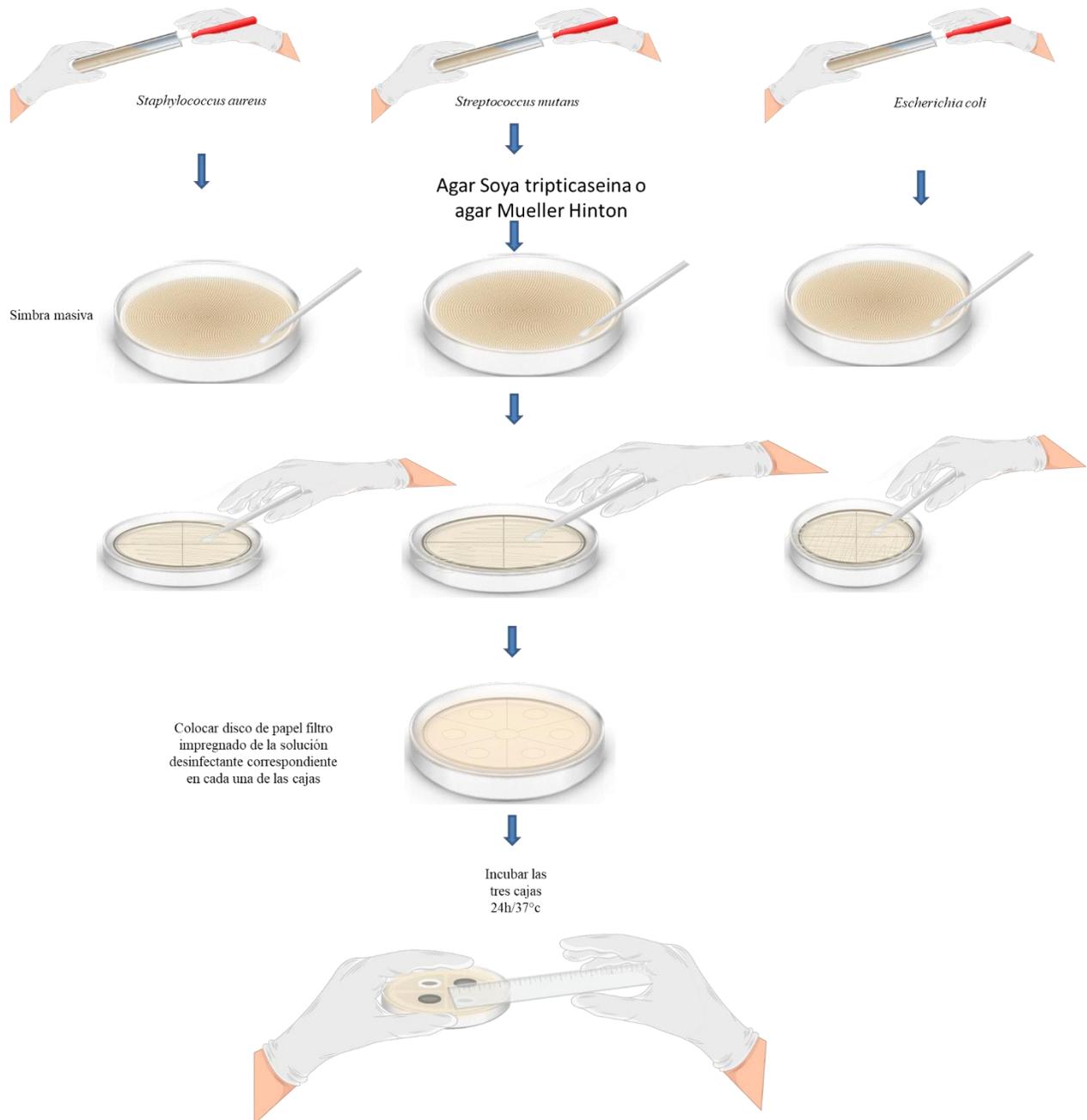
PROCEDIMIENTO

1. En una caja de agar Mueller Hinton sembrar masivamente con el asa bacteriológica la cepa *Staphylococcus aureus*.
2. Distribuir en la superficie del agar los discos de papel filtro humedecido con cada una de las soluciones y 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 Mueller Hinton sembrando masivamente con el asa bacteriológica la cepa *Streptococcus mutans*.
4. Realizar el mismo procedimiento con otra caja agar Mueller Hinton sembrando masivamente con el asa bacteriológica la cepa *Escherichia coli*.
5. Incubar las tres cajas durante 24 horas a 37° C.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	89 /166

Práctica 9 Acción antimicrobiana de algunas soluciones de uso común en la práctica odontológica





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	90 /166

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.



Realizar una tabla de las soluciones que inhibieron (de mayor a menor inhibición) a los diferentes microorganismos en cada una de las cajas.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué características ideales tiene el eugenol al mezclarse con el óxido de zinc para las bases cavitarias o curaciones temporales?
2. ¿Qué solución o soluciones utilizaría para desinfectar conductos radiculares y por qué?
3. ¿Qué complejo se forma al mezclar clorhexidina e hipoclorito de sodio en conductos radiculares?
4. ¿Qué efectos tiene la intrusión de hipoclorito de sodio a los tejidos perirradiculares?
5. En tratamientos de conductos, ¿cómo se utiliza el hidróxido de calcio químicamente puro y con qué fin?



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	91 /166

BIBLIOGRAFÍA

- Bergenholtz, G. Horsted, BP. Reit, C. (2011). Endodoncia. El Manual Moderno.
- Burgos, ZF. (2013). Medicación intraconducto en Endodoncia. Postgrado en Endodoncia. Universidad de Valparaíso.
- Canalda, SC. (2019). Endodoncia: técnicas clínicas y bases científicas. 4ª ed, Elsevier.
- Cohen, S. Hargreaves, KM. Berman, LH. (2022). Las vías de la pulpa. 12 ed, Elsevier.
- González, FRM. Molina, LJ. (2009). Microbiología bucal. Méndez editores.
- Liébana, UJ.(2002). Microbiología oral. Mc Graw Hill-Interamericana. Marsh, PD.
- Martin, MV. (2011). Microbiología oral. Amolca.
- Negróni, M. (2018). Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Médica Panamericana.
- Soares, IJ. Goldberg, F. (2019). Endodoncia técnica y fundamentos. Editorial Médica Panamericana



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	92 /166

Práctica No. 10 ANTIBIOGRAMA

OBJETIVO

Conocer las indicaciones, características y usos del antibiograma, y el efecto de los antibióticos sobre los microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. ¿Qué es un antibiótico?.
2. Defina inhibición bacteriana.
3. Diferencias entre antiséptico y antimicrobiano.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El aumento cada vez mayor de la resistencia bacteriana derivada del mal uso de antibióticos asociada a la automedicación, hace indispensable el uso de auxiliares de laboratorio como el antibiograma para atacar de una manera más efectiva las infecciones bacterianas, siendo esta prueba, una guía para que el odontólogo seleccione el antibiótico ideal para cada paciente. Los antibiogramas son estudios que se realizan *in vitro* y que permite identificar la resistencia o el grado de sensibilidad de los microorganismos frente a diferentes antimicrobianos.

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 respecto a una bacteria cuando inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa *in vitro* determinando la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	93 /166

Los fenómenos de transferencia genética y mutaciones en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, han dado lugar a la aparición de cepas resistentes a uno o varios antimicrobianos, este fenómeno se ha incrementado tanto en la población general como en el ambiente hospitalario. 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 en donde se aísla el microorganismo.

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, por lo cual, en ningún momento será la base para indicar un medicamento, pues se deben tener en cuenta otros elementos antes de prescribir un fármaco como son:

- Reacciones adversas o de hipersensibilidad al fármaco.
- Vía de administración del medicamento, tomando en cuenta la edad del paciente y la gravedad del padecimiento.
- Costo del medicamento.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	94 /166

- Frecuencia de la ingesta del medicamento de acuerdo con la ocupación del paciente.

Al indicar un antibiograma, el laboratorio de análisis clínicos enviará los resultados con las letras “R” (resistente) y “S” (sensible), el antibiótico de elección será siempre el que tenga la letra “S”, tomando en cuenta los criterios anteriormente mencionados y sobre todo las características del paciente.

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. Estos, se venden preparados para microorganismos Gram positivos, Gram negativos y mixtos, con la cantidad exacta de los medicamentos a prueba para cada tipo de microorganismo, son de sencillo manejo y lectura fácil de realizar, solo se miden los milímetros del halo de inhibición.

MATERIAL Y REACTIVOS

Cepas:

- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*

Medios de cultivo y reactivos:

Dos cajas con agar Mueller Hinton

Multidisco Gram positivo

Multidisco Gram negativo

Material:

Pinzas de curación

Mechero

SERVICIOS: Agua, luz, gas.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	95 /166

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar masivamente una caja de agar Müller Hinton con *Staphylococcus.aureus*.
2. Colocar con las pinzas flameadas un multidisco Gram positivo, cuidando que quede perfectamente adherido al medio.
3. Sembrar masivamente la otra caja de agar Müller Hinton con *Klebsiella pneumoniae*.
4. Colocar con las pinzas flameadas un multidisco Gram negativo, cuidando que quede perfectamente adherido al medio.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	96 /166

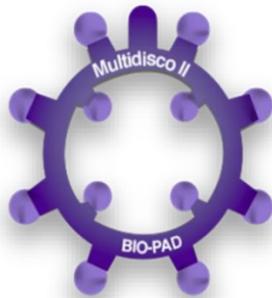
Práctica Antibiograma



Staphylococcus aureus



Agar Mueller Hinton



Colocar multidisco correspondiente:
Staphylococcus aureus
Grampositivos



Klebsiella pneumoniae



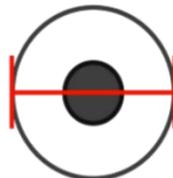
Agar Mueller Hinton



Colocar multidisco correspondiente:
Klebsiella pneumoniae
Gramnegativos

Siembra masiva

24h/37°C
Observar los halos de inhibición del
crecimiento y medir su diámetro en mm





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	97 /166

RESULTADOS

- Medir los halos de inhibición en milímetros de cada antibiótico en cada una de las cajas (Gram positivos y Gram negativos), identificar los antibióticos con mayor efecto inhibitor, menor efecto inhibitor y efecto medio tomando en cuenta la información del fabricante.



- De cada uno de los antibióticos de mediano efecto (que serían los de primera elección), buscar la siguiente información: 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.

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



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	98 /166

Pefloxacina	PEF	5µg
Penicilina	PE	10U
Tetraciclina	TE	30µg
Trimetoprim- Sulametoxasol	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



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	99 /166

CUESTIONARIO

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

BIBLIOGRAFÍA

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. y Mietzner, T.A. (2011).

Microbiología médica. Mc Graw Hill.

https://cmapspublic3.ihmc.us/rid=1RP7PC45V-WZK14Y-1H7Z/Microbiologia_medica_Jawetz.pdf

Espinosa, M.M.T. (2012). *Farmacología y terapéutica en odontología*. Medica panamericana.

González Figueroa, R.M. y Molina López, J. (2009). *Microbiología bucal*. Méndez editores.

Liébana, U.J. (2002). *Microbiología oral*. Mc Graw Hill-Interamericana.

https://www.academia.edu/40281608/MICROBIOLOG%C3%8DA_ORAL

Marsh, P.D. y Martin, M.V. (2011). *Microbiología oral*. Amolca.

Nolte W.A. (1986). *Microbiología odontológica*. Interamericana.

Negroni, M. (2018). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*.

Médica Panamericana



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	100 /166

Ruiz, G. y Fernández, A. (2013). *Fundamentos de farmacología básica y clínica*. Médica panamericana.

Slots, J., Taubman, M.A. y Yankell, S. (1992). *Contemporary oral microbiology and immunology*. Mosby.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	101 /166

Práctica No. 11

ACCIÓN DE LA LISOZIMA COMO MECANISMO DE DEFENSA INNATA EN CAVIDAD BUCAL

OBJETIVO

Identificar la acción antimicrobiana de la lisozima presente en las diferentes secreciones corporales.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Concepto de inmunología.
2. Tipos de inmunidad.
3. Factores que modifican la inmunidad
4. Clasificación de mecanismos inespecíficos en cavidad bucal.
5. ¿Cuál es la función de la lisozima en cavidad bucal?.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Todos los seres humanos estamos expuestos a diversos microorganismos, entre los cuales se encuentran parásitos, hongos, bacterias y virus, así como sustancias tóxicas las cuales pueden provocar infecciones.

En la medida que el sistema inmunitario defiende al hospedero contra los patógenos, utiliza diferentes sistemas de reconocimiento, a fin de eliminar de manera efectiva al patógeno invasor o a sus productos. Una respuesta generada contra un patógeno potencial se llama respuesta inmunitaria. La inmunidad innata es la primera línea de defensa, es inespecífica, se moviliza rápidamente hacia el sitio inicial de la infección, pero carece de memoria inmunológica, es el estado de protección o resistencia que cada individuo tiene al nacer, por su capacidad de reconocer a microorganismos patógenos y destruirlos, sin que haya existido un contacto previo con ellos.

Los determinantes de la inmunidad innata o natural incluyen factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales, además de otros como las barreras de protección mecánica.

Entre los elementos y mecanismos innatos de protección o resistencia se clasifican en barreras: físicas, bioquímicas y biológicas.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	102 /166

Dentro de las barreras bioquímicas existen diferentes moléculas encargadas de nuestra defensa, una de ellas es la lisozima también conocida como muraminidasa, es una enzima presente en la mayoría de los tejidos y secreciones corporales como lágrimas, moco nasal, saliva, secreciones intestinales y respiratorias, etc. Esta es producida principalmente por los poliformonucleares y en la cavidad bucal constituye una importante barrera bioquímica, actúa sobre las bacterias especialmente Gram + provocando la lisis de la pared bacteriana, debilitando la capa de mureína.

La lisozima está presente en los gránulos de las células de defensa, de donde se libera en los sitios de inflamación.

En estudios recientes se ha notificado también la capacidad que tiene esta enzima de hidrolizar la pared celular de hongos y levaduras. Asimismo, se ha reportado su efectividad como agente antibacteriano y antifúngico cuando se combina con otros compuestos activos como el quitosano, el cual es un biopolímero policatiónico capaz de retardar o inhibir el desarrollo de bacterias y hongos al interactuar con los componentes celulares presentes en la membrana y la pared celular.

Otra molécula de defensa es la lactoferrina que es una proteína que se encuentra en secreciones corporales, como lágrimas, saliva, leche materna y especialmente en el calostro. La lactoferrina es una proteína que se une al hierro, elemento que muchas bacterias necesitan para funcionar, lo que puede explicar parte de su actividad bactericida, pero además tiene una importante capacidad antimicrobiana frente a diversos tipos de patógenos mediante otros mecanismos como la desestabilización química de la membrana de ciertas bacterias y hongos.

La peroxidasa es otra molécula con acción antimicrobiana que se encuentra presente en saliva, leche y neutrófilos.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	103 /166

MATERIAS Y REACTIVOS

Cepa:

Micrococcus lysodeikticus

Medios de cultivo:

1 caja agar soya tripticasa

Material y equipo:

- 1 mechero
- 1 tubo con discos de papel filtro estéril
- 1 tubo con solución salina estéril
- 1 pinza de curación
- 1 asa bacteriológica

SERVICIOS: Agua, luz y gas

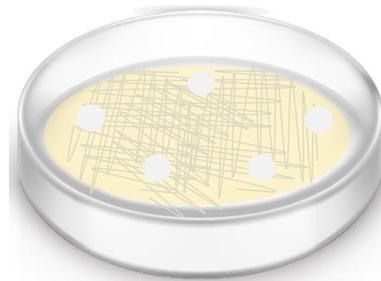
PROCEDIMIENTO

LISOZIMA

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



2. Tres compañeros del grupo previa firma de la carta de consentimiento informado, harán ejercicio para donar sudor, saliva, lágrima y secreción nasal.
3. Colocar sobre la caja sembrada los discos de papel filtro impregnados con las siguientes secreciones y solución:
 - a) Lágrima
 - b) Saliva
 - c) Sudor
 - d) Secreción nasal
 - e) Solución salina



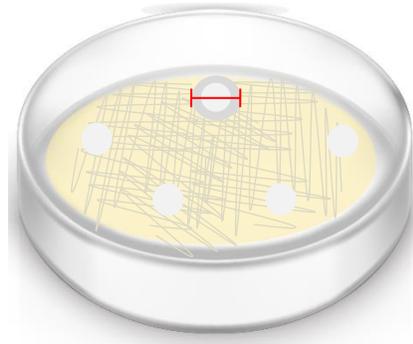


Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	104 /166

4. Incubar 37° C durante 24 horas, leer resultados.

RESULTADOS

1. Medir los halos de inhibición en milímetros de cada una de las secreciones y solución utilizada.



2. Anotar los resultados en la siguiente tabla comparativa y reportar en cual secreción hay mayor concentración de lisozima.

	Lágrima	Saliva	Sudor	Secreción nasal	Solución salina
Diámetro del halo en milímetros					

CUESTIONARIO

1. Explique la importancia de los mecanismos de defensa inespecíficos.
2. ¿Qué otros mecanismos de defensa inespecíficos pueden encontrarse en saliva?
3. ¿Contra qué bacterias actúa la Lisozima?
4. ¿A qué nivel actúa la Lisozima en la bacteria?



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	105 /166

BIBLIOGRAFÍA

- Vargas Casillas, Ana Patricia y Yáñez Ocampo, Beatriz Raquel. (2022). *Periodontología e Implantología*. Medica Panamericana
- Rojas Espinosa, Oscar.(2017). *Inmunología (de memoria)*. Medica Panamericana.
- Negroni, Marta.(2018). *Microbiología Estomatológica*. Medica Panamericana.
- Regueiro González, José y Martínez Naves, Eduardo. (2022). *Inmunología, Biología y patología del sistema inmunitario*. Medica Panamericana.
- Riedel, Stefan y Hobden, Jeffery.(2019). *Microbiología Médica*.Mc Graw Hill.
- Salinas Carmona. Mario César. (2023). *La inmunología en la Salud y la Enfermedad*. Medica Panamericana.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	106 /166

Práctica No. 12

LA FAGOCITOSIS COMO MECANISMO DE DEFENSA INESPECIFICO

OBJETIVO

Identificar la importancia de la fagocitosis como mecanismo de defensa inespecífico del organismo.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

- 1.- Mecanismos celulares de la respuesta inmunitaria innata.
- 2.- Definición de fagocitosis.
- 3.- Células que llevan a cabo la fagocitosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La fagocitosis es un mecanismo de defensa inespecífico encargado de eliminar agentes extraños, se caracteriza por la ingesta de partículas grandes y la llevan a cabo los fagocitos, células que fueron descubiertas por Elie Metchikoff en 1892. Los neutrófilos y macrófagos, son fagocitos y se encuentran ampliamente distribuidos en todos los tejidos del cuerpo. Los macrófagos circulan en el torrente sanguíneo en un estado inmaduro, llamado monocito, cuando estas células llegan a los tejidos maduran y se convierten en macrófagos, los cuales se encuentran en todos los tejidos y órganos del cuerpo (hueso, pulmones, hígado, sistema nervioso, piel, mucosa oral, etc), dependiendo de su localización los macrófagos reciben un nombre especial, por ejemplo, en el pulmón se llaman macrófagos alveolares, en el hueso se denominan osteoclastos, mientras que en el sistema nervioso central reciben el nombre de microglía, etc.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	107 /166

En cavidad bucal la fagocitosis se lleva a cabo principalmente en el surco gingival ya que el fluido gingival contiene neutrófilos y monocitos.

La presencia de un agente extraño (bacterias, hongo, etc.), induce la secreción de quimiocinas, cuya función es atraer a los leucocitos del torrente sanguíneo hacia las zonas de infección (quimiotaxis). Los fagocitos son las primeras células en llegar a estas zonas, en donde por diferentes mecanismos son capaces de reconocer a los agentes extraños y eliminarlos al llevar a cabo la fagocitosis. El proceso de fagocitosis involucra cuatro etapas que a continuación se describen:

- 1) Reconocimiento:** Es indispensable que los fagocitos reconozcan y se adhieran a los microorganismos. Para ello, los macrófagos poseen en su superficie receptores que les permiten reconocer directamente moléculas presentes en la membrana o pared celular de las bacterias. Por otro lado, también pueden reconocer a los anticuerpos unidos a las bacterias (opsonizadas), en este caso se lleva a cabo una fagocitosis mediada por anticuerpos. Aunque la opsonización facilita el proceso de fagocitosis, no es indispensable para que los fagocitos puedan reconocer a los microorganismos (Fig. 1).
- 2) Ingestión:** La unión del macrófago al agente extraño, induce señales que provocan cambios en la membrana celular del fagocito y que le permite englobar al microorganismo e ingerirlo. En este proceso el agente extraño queda contenido en una vesícula llamada fagosoma (Fig. 1).
- 3) Digestión:** Durante esta etapa, se lleva a cabo la muerte y degradación del microorganismo, para ello, el fagosoma se fusiona con un lisosoma presente en el citoplasma del fagocito, el resultado es la formación de un fagolisosoma, el cual contiene al microorganismo y un conjunto de enzimas encargadas de matarlo y degradarlo (Fig. 1).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	108 /166

4) **Excreción:** Después de la digestión del microorganismos, es necesario eliminar los desechos, esto se lleva a cabo mediante la exocitosis.

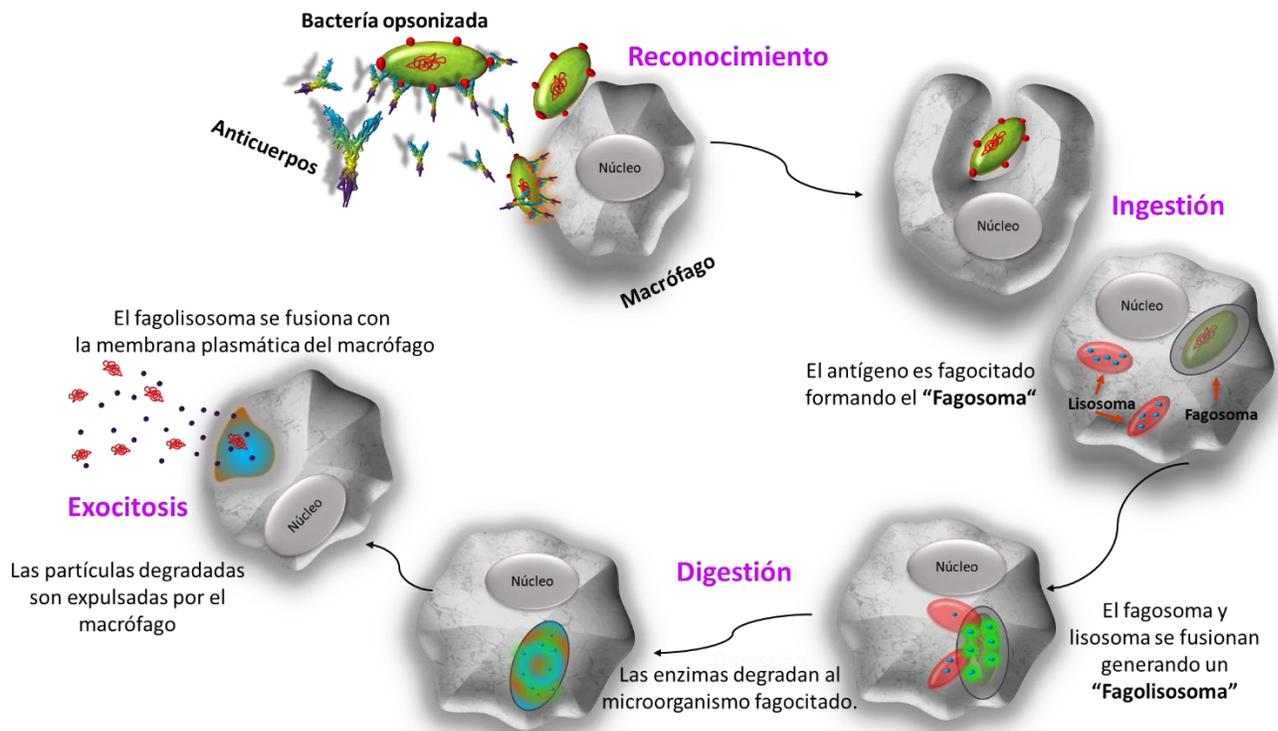


Figura 1: Fagocitosis mediada por anticuerpos. Etapas representativas de la fagocitosis de una bacteria opsonizada o no opsonizada. Se muestra el reconocimiento, la ingestión, digestión y exocitosis (Modificado de Castro-Manrreza y Paredes-Monsalvo).

Es importante mencionar que no todas las moléculas del microorganismo digerido son desechadas, algunas son procesadas para llevar a cabo la presentación de antígenos, mecanismo indispensable para la inducción de una respuesta inmunitaria específica. También se debe resaltar que la fagocitosis no solo se encarga de ingerir y destruir partículas extrañas, también participa en la eliminación de células muertas de nuestro cuerpo por causas naturales o por daño, ejemplo de ello son los osteoclastos quienes se encargan de degradar hueso para permitir su remodelación.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	109 /166

En las siguientes direcciones, puedes visualizar videos de la fagocitosis realizada por fagocitos vivos:

<https://www.youtube.com/watch?v=cwputi8wE7w>

<https://youtu.be/438EovW4tzs>

<https://www.youtube.com/watch?v=IN5Lr4qUQQU>

MATERIALY REACTIVOS

- Preparaciones fijas de fagocitosis.
- Aceite de inmersión.

EQUIPO

Microscopio

SERVICIOS

Luz, agua

PROCEDIMIENTO

- Observar cuidadosamente a 100x (inmersión) las preparaciones fijas identificando los pasos de la fagocitosis.
- Realizar dibujos de las observaciones.

RESULTADOS

- Realizar los dibujos de las observaciones mencionando que pasos de la fagocitosis observó e identifique que células están participando en la fagocitosis.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	110 /166

CUESTIONARIO

Elabore un resumen del artículo de la bibliografía número 3 y conteste las siguientes preguntas:

- 1) ¿Qué son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)? y explique cuál es su importancia en la fagocitosis.
- 2) ¿Qué mecanismos emplean los fagocitos para reconocer a los microorganismos?
- 3) ¿Qué es la presentación de antígenos?
- 4) Mencione algunas de las consecuencias que se presentan cuando el proceso de fagocitosis no es eficiente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abul. K. Abbas, Andrew H. Lichman, Shiv Pillai. Inmunología celular y molecular. 8º edición España. Editorial Elsevier. 2015
2. Abbas K. Abul. Inmunología básica. 5ta edición España. Editorial Elsevier. 2017
3. Castro-Manrreza ME y Paredes-Monsalvo C. (2020). La fagocitosis es un proceso biológico que nos defiende de los microbios. MedLab. Julio-octubre 12 (3): 5-11. ISN:2395-9967



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	111 /166

Práctica No. 13

REACCIONES DE PRECIPITACIÓN EN CAPILAR

OBJETIVO

Conocer una de las reacciones antígeno–anticuerpo y relacionar este evento, con las diferentes formas que tiene el cuerpo humano y la cavidad bucal para defenderse.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. ¿Cuáles son los mecanismos de defensa inespecíficos de cavidad bucal?
2. Defina antígeno y anticuerpo.
3. Defina célula plasmática.
4. Explique qué características debe de tener el antígeno y el anticuerpo para que se dé una 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 inespecíficos, que son eficaces contra una gran variedad de microorganismos 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 como nuestro cuerpo reaccionará ante cualquier tipo de agresión ya sea mecánica, física, química o microbiana. Un microorganismo necesita entrar en los tejidos del huésped para infectarlo. El cuerpo humano tiene un gran número de barreras que lo protegen contra la entrada de este tipo de agresores.

Los mecanismos de defensa 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.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	112 /166

Dentro de esta capacidad de defender al cuerpo tenemos a la inmunidad específica o adaptativa 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 actúa cuando existe un nuevo contacto con el mismo microorganismo que ocasionó la primera infección. En este tipo de inmunidad adaptativa, también se encuentra de forma artificial, que se obtiene mediante el uso de vacunas, y que prepara al cuerpo para reconocer al agente agresor y atacarlo sin padecer la enfermedad.

Ambos tipos de inmunidad adaptativa (natural o artificial) son específicos ya que 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 específico para el cual fue creado.

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 ejemplo, los antisueros contra venenos.

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:

- Precipitación
- Aglutinación
- Flocculación
- Neutralización

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

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



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	113 /166

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 al medir los precipitados resultantes. 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 (gráfica1):

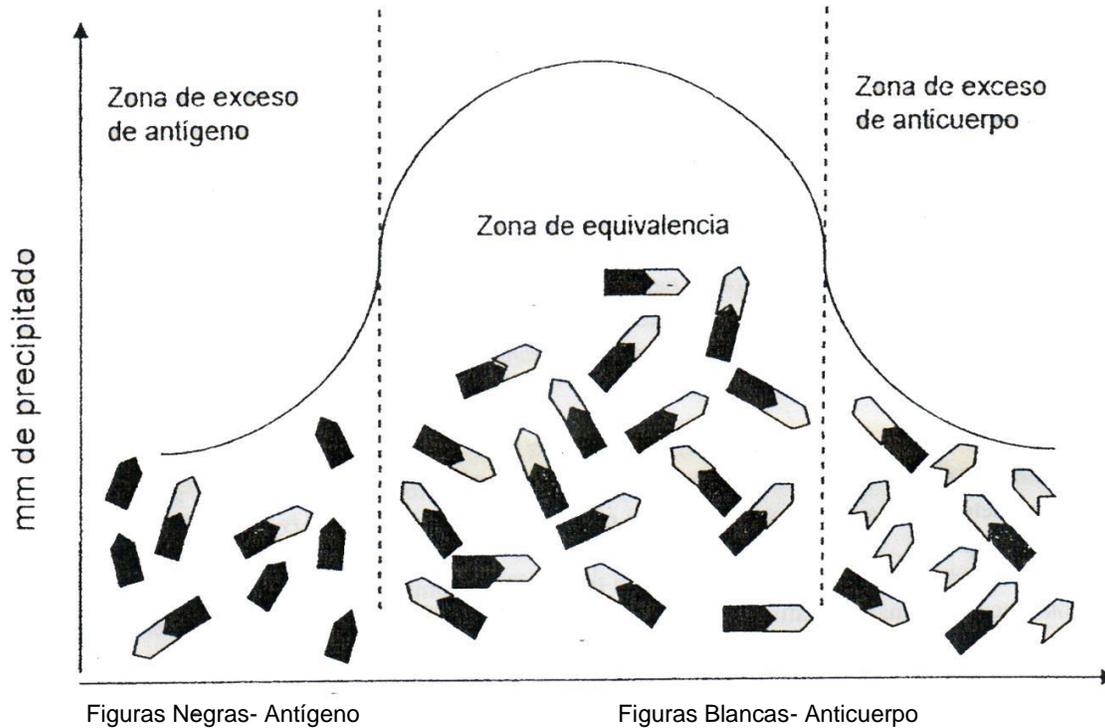
Exceso de antígeno: Llamado también prozona, todos los anticuerpos están combinados, pero la precipitación es baja debido a que gran parte de los complejos antígeno- anticuerpo son pequeños y solubles, tienden a disolverse, la cantidad de precipitado es también menor a la de equivalencia.

Equivalencia: se encuentran en proporciones iguales las cantidades de antígeno y anticuerpo por lo que se observa un máximo precipitado.

Exceso de anticuerpo: Los anticuerpos se encuentran en mayor proporción 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.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	114 /166

GRÁFICA 1. CURVA DE PRECIPITACIÓN EN CAPILAR



MATERIAL Y REACTIVOS

- 9 tubos capilares.
- 9 tubos de ensayo de 13 x 100 en gradilla.
- 3 pipetas de 1ml graduadas en décimas.
- 1 barra de plastilina.
- 1 tubo de ensayo con Suero Bovino Total (SBT) (Antígeno).
- 1 tubo de ensayo con Antisuero Bovino Total (ASBT) (Anticuerpo).
- Solución salina.

SERVICIOS: Luz, agua.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	115 /166

PROCEDIMIENTO

1. Tomar nueve tubos capilares y dividirlos en cuatro partes iguales por medio de una regla y un marcador.
2. En los 9 tubos de ensaye 13 x 100 previamente etiquetados, colocar 0.5 ml de solución salina.
3. Agregar 0.5 ml de suero bovino total (SBT) al tubo de ensaye número 1 mezclándolo perfectamente.
4. Tomar 0.5 ml del tubo número 1 y colocarlos en el tubo número 2, mezclar.
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 **siempre primero** con un tubo capilar el antisuero bovino total (ASBT) hasta la primera marca que realizó.
7. Girar el tubo capilar a 180° y dejar que el ASBT baje o descienda hasta el borde contrario de donde se 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 en el capilar.
10. Colocar el líquido en el centro del capilar girándolo y clavarlo en la barra de plastilina sin retirar el dedo hasta que esté bien clavado.
11. Realizar el mismo procedimiento con cada uno de los tubos capilares, cambiando de dilución.
12. Dejar la barra de plastilina a temperatura ambiente por unos minutos y después en refrigeración 24 a 48 horas.



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

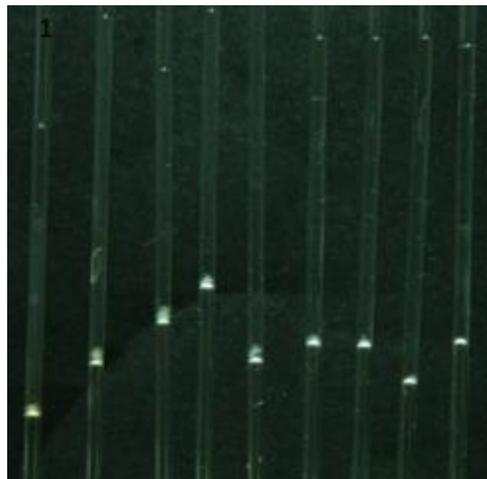


Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	116 /166

RESULTADOS

· Realizar una tabla como la siguiente:

Tubo capilar No.	Tubo capilar No.	Tubo capilar No.
1	1:1	
2	1:2	
3	1:4	
4	1:8	
5	1:16	
6	1:32	
7	1:64	
8	1:128	
9	1:256	



Fuente: Propia

- 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 bovino funcionará como antígeno y el antisuero bovino total será el anticuerpo, coloque en el eje de las abscisas de su



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	117 /166

gráfica la dilución de suero 1:1, 1:2, 1:4 etc, y en el eje de las ordenadas la cantidad de precipitado en milímetros.

- Identifique cada una de las zonas de su curva de precipitación.

CUESTIONARIO

1. Explique qué es una reacción antígeno anticuerpo.
2. Mencione a qué tipo de mecanismo de defensa pertenecen las reacciones antígeno anticuerpo.
3. ¿Qué células son las encargadas de formar los anticuerpos?
4. ¿Qué importancia tiene este mecanismo de defensa en cavidad bucal?

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A.K. Lichtman A.H. y Pober J.S.(2004). Inmunología celular y Molecular. 5ª.ed. España: Elsevier.
- Fainboim, L., Geffner, J. (2011). Introducción a la Inmunología humana. Argentina: Médica Panamericana.
- Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. (2004). Inmunología. 9a. ed. España: Elsevier.
- Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden DJ. (2002). Inmunología básica y clínica. 10ª Ed. México: Manual Moderno.
- Spicer WJ. (2009). Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. 1ª edición- España. Elsevier.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	118 /166

Práctica No. 14

REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN EN GEL (Ouchterlony)

OBJETIVO

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

CONOCIMIENTOS PREVIOS

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

FUNDAMENTO TEÓRICO

La técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony se aplica para determinar las relaciones existentes entre diferentes antígenos. En esta técnica se colocan soluciones de antígeno y anticuerpos en pocillos separados en agar. La doble difusión se lleva a cabo al colocar los pozos de antígeno y anticuerpo en diversos ángulos, los cuales difunden a través del agar en forma radial, estableciéndose los gradientes de concentración de cada sustancia, las cuales al encontrarse forman un precipitado que se observa como una línea opaca en la región donde se encuentran en proporciones equivalentes.

El gel de agarosa no contiene anticuerpos sino que se añade tanto al antígeno como al anticuerpo en dos pocillos situados a unos cuantos milímetros.

Basándose en este patrón de líneas de precipitación, esta técnica también se emplea para determinar si las muestras son idénticas (identidad total), si comparten algún epítopo, pero no todos (identidad parcial), o bien, si se trata de muestras

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	119 /166

diferentes (no identidad). 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 se difunden con la misma velocidad.

Las tres modalidades características básicas de estas reacciones se mencionan a continuación (Figura 13.1)

- I. Reacción de identidad total: Se observa una línea en forma de “V” los anticuerpos se unen a los mismos determinantes antigénicos en cada muestra y son idénticos
- II. Reacción de identidad parcial: Se observa una línea de precipitación en forma de “Y” en este caso contiene un antígeno diferente que comparte con algún determinante pero no todos
- III. Reacción de no identidad: Se observa una línea en forma de “X” esto sucede cuando se añaden dos antígenos sin relación, no son compatibles con ningún determinante

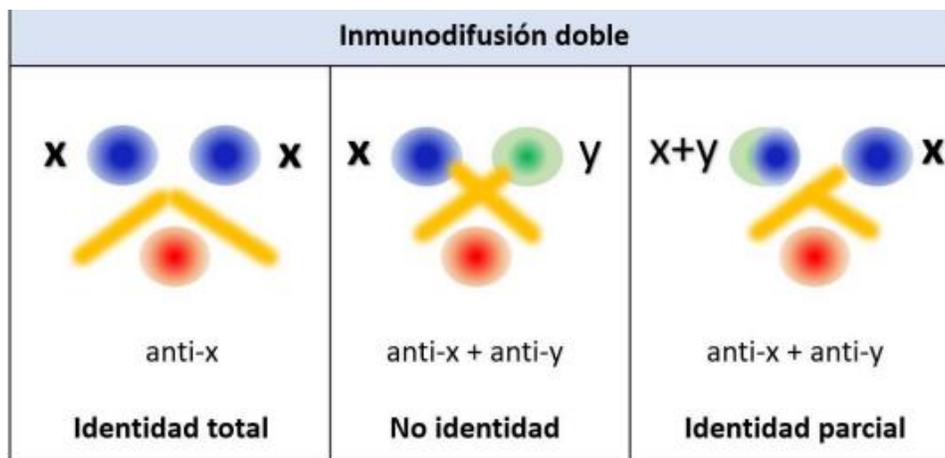


Figura 13-1 Reacción de precipitación

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. Son pruebas que se utilizan para evaluar la respuesta humoral frente a la infección y los antecedentes de exposición a agentes infecciosos de un individuo.

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.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	120 /166

MATERIAL Y REACTIVOS

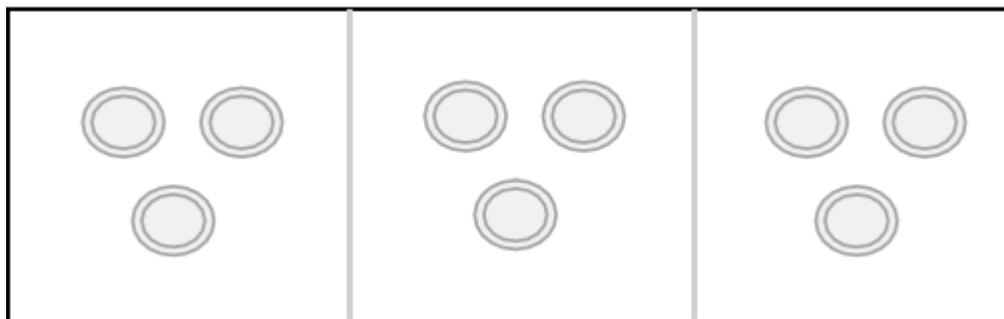
- 1 portaobjetos con ion agar (Oxoid).
- 1 caja de Petri.
- 1 aplicador de madera.
- 1 pipeta Pasteur.
- Papel filtro.
- Solución de antígenos:
 - ✓ Suero bovino total (SBT).
 - ✓ Albúmina bovina.
 - ✓ Gammaglobulina bovina u Ovoalbúmina.
- Solución de anticuerpos.
 - ✓ antisuero bovino total (ASBT).
 - ✓ antigammaglobulina bovina + antiovoalbúmina.

SERVICIOS

Luz, agua.

PROCEDIMIENTO

1. Realizar tres sistemas con tres perforaciones en el agar, de forma que quede un pozo en cada vértice, formando un triángulo equilátero (como lo muestra el esquema):



Fuente: Propia

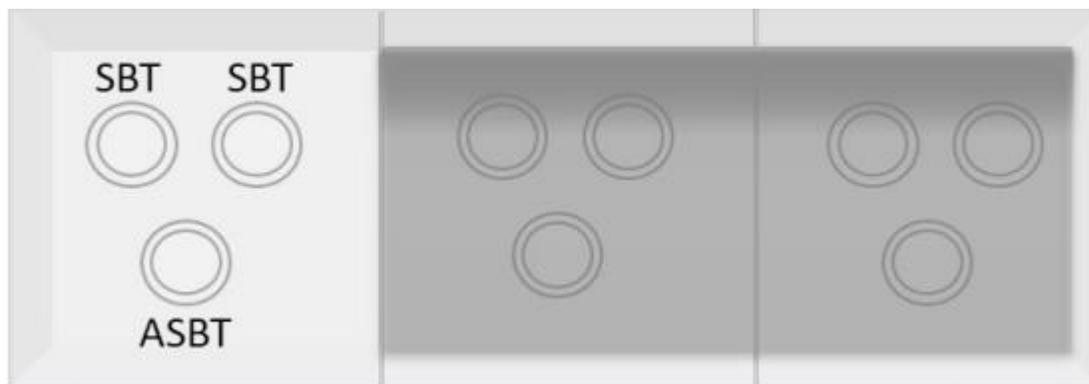


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO MECANISMOS
INFECCIOSOS Y RESPUESTA INMUNE DEL SISTEMA
ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	121 /166

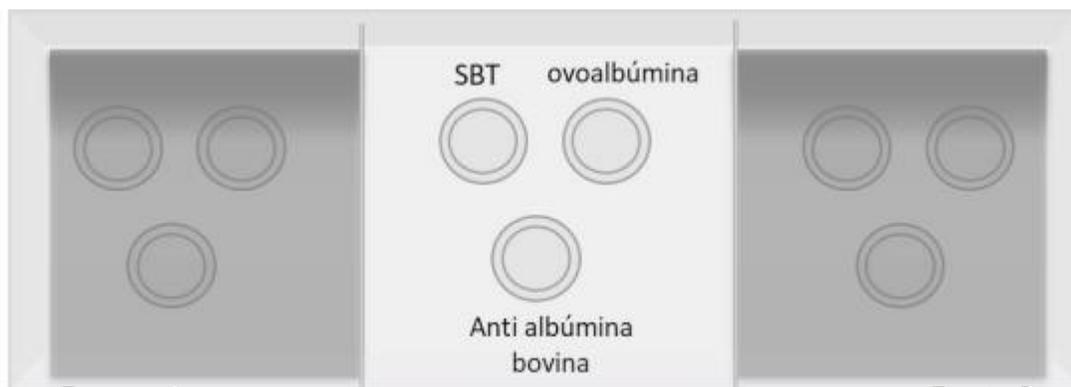
2. Con un tubo capilar rellenar los pozos en el primer sistema como lo indica el esquema 2.



Esquema 2

Fuente: Propia

3. En el segundo sistema con un tubo capilar rellenar los pozos como lo indica el esquema 3



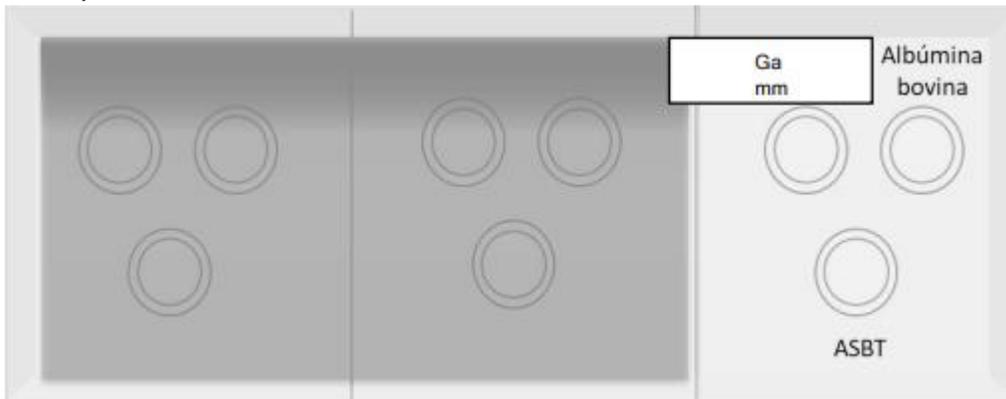
Esquema 3

Fuente: Propia



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	122 /166

4. En el tercer sistema con un tubo capilar rellenar los pozos como lo indica el esquema 4



Esquema 4

Fuente: Propia

5. Improvisar una cámara húmeda con una caja de Petri, colocando papel humedecido con agua en la base y en la tapa.

6. Se colocan los portaobjetos preparados en la cámara húmeda sobre el aplicador de madera.

7. Se incubó 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 con las instrucciones de su profesor y dibujar las bandas de precipitación que se observen.

Identificar el tipo de reacción que se observó (identidad total, no identidad o identidad parcial).



Ejemplo de como se observa una banda de precipitación
Fuente: Propia



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	123 /166

CUESTIONARIO

1. Mencione que ventajas tiene el método de precipitación en gel sobre la precipitación en capilar.
2. Explique qué aplicaciones tiene el método de precipitación en gel.
3. ¿Cuáles son las características que debe tener un antígeno y un anticuerpo para que se lleve a cabo una reacción de precipitación?
4. ¿Qué aplicación tiene esta prueba en su práctica odontológica?

BIBLIOGRAFÍA

- Ragueiro G, Martínez N, López L, Corell A. (2021) Inmunología Biología y patología del sistema inmunitario. Médica Panamericana
- Delves, P. Martin, S. Burton, D. Roitt, I. (2015). Inmunología: fundamentos. Médica Panamericana.
- Fainboin, L. Geffner, J. (2011). Introducción a la inmunología. Médica panamericana.
- Goldsby, RA. Kindt, TJ. Osborne, BA. (2007). Inmunología de Kuby. España: Mc Graw Hill. –
- Murray, P. Rosenthal, K. Pfaller, M.(2017). Microbiología médica. Barcelona: ELSEVIER.
- Parslow, T. Stites, D. Abba, T. Imboden, DJ. (2002). Inmunología básica y clínica. México: Manual Moderno.
- Male D, Brostoff (2013). Inmunología. ELSEVIER Health Sciences



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	124 /166

Práctica No. 15

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

OBJETIVO

Conocer la importancia de las reacciones de aglutinación en diferentes pruebas de laboratorio, particularmente en la determinación del grupo sanguíneo.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Concepto de aglutinación.
2. Tipos de reacción de aglutinación.

FUNDAMENTO TEORICO

La reacción antígeno-anticuerpo forma parte de los mecanismos de defensa específicos del cuerpo humano. El estudio detallado de este proceso ha generado conocimiento con numerosas aplicaciones clínicas, ya que nos ayuda a identificar la presencia o ausencia de hormonas, antígenos, anticuerpos, enzimas, células, etc. en diferentes fluidos (sangre, orina, saliva, etc.). Los análisis de laboratorio basados en la interacción antígeno-anticuerpo son importantes en el diagnóstico de enfermedades, evaluación de tratamientos y el seguimiento de procesos fisiológicos normales; ejemplo de lo anterior, son las pruebas para detectar la infección con el VIH o las pruebas de embarazo. Las reacciones de aglutinación son la base de numerosas técnicas empleadas en laboratorios clínicos y de investigación.

La reacción de aglutinación es la interacción *in vitro* de un anticuerpo (aglutinina) con un antígeno (aglutinógeno), este último localizado en la superficie de una célula o partícula, generalmente este proceso es visible a simple vista, por lo que no es necesario un microscopio (Figura 14.1). Las reacciones de aglutinación se clasifican en dos tipos:



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	125 /166

a) **Aglutinación directa:** esta reacción se lleva a cabo cuando de manera natural una célula o partícula insoluble presenta en su superficie uno o más antígenos que reaccionan con anticuerpos específicos. Por lo tanto, células, bacterias y hongos pueden ser aglutinados fácilmente por los anticuerpos, debido a que en su superficie presentan numerosos antígenos. Ejemplo de lo anterior, son las pruebas para determinar el grupo sanguíneo.

b) **Aglutinación indirecta o pasiva:** esta reacción sucede cuando la superficie de células o partículas inertes se recubren artificialmente con el antígeno de interés. Generalmente se emplean eritrocitos o partículas de látex, las cuales actúan como soporte pasivo del antígeno. Este tipo de aglutinación es útil para determinar la presencia y la cantidad de anticuerpos (título de anticuerpos) en diferentes fluidos del cuerpo. Esta metodología se emplea para determinar el factor reumatoide, prueba de embarazo y anticuerpos anti-DNA. Es importante mencionar, que la partícula de látex, también puede ser recubierta con un anticuerpo de interés, las partículas sensibilizadas con anticuerpos sirven para detectar la presencia de algún antígeno en los diferentes fluidos biológicos. En este caso la técnica se denomina **aglutinación pasiva inversa.**

Por otra parte, los eritrocitos también pueden ser aglutinados por ciertos virus o bacterias. Esta reacción de **hemaglutinación** puede inhibirse de manera específica en presencia de anticuerpos dirigidos contra estos microorganismos (ensayo de inhibición de la hemaglutinación). Estas técnicas sirven para determinar la concentración relativa (título) de virus y anticuerpos.

Como ya se mencionó la determinación de grupos sanguíneos es un ejemplo de la reacción de aglutinación directa, la prueba identifica la presencia o ausencia de antígenos característicos de los glóbulos rojos de la sangre. De acuerdo a la distribución de los isoantígenos A y B en los eritrocitos, la sangre de toda persona queda incluida entre los cuatro grupos denominados A, B, AB y O, según tengan un antígeno (A o B), los dos antígenos al mismo tiempo (A y B) o carezcan de ellos (O). Los grupos sanguíneos fueron descubiertos por Karl Landsteiner en 1901, lo que



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	126 /166

permitió establecer los criterios de compatibilidad sanguínea entre humanos. Aunado a lo anterior, en 1940 Landsteiner y Wiener determinaron la existencia de otro antígeno, el factor Rh, denominado así debido a que también se encuentra en

la sangre del mono Rhesus. Las personas que presentan el factor Rh son Rh positivos (Rh+) y los que no lo poseen son Rh negativos (Rh-). Lo anterior resalta la importancia de la reacción de aglutinación *in vitro*, gracias a ella podemos determinar el tipo de sangre de todas las personas, lo cual es fundamental al momento de realizar una transfusión sanguínea para evitar una reacción de hemólisis, que puede culminar con la muerte del paciente.

Los antígenos del sistema ABO, son los más antígenicos y por ello son importantes en medicina transfusional. Generalmente, las personas poseen anticuerpos naturales, contra los antígenos, que no están presentes en sus propios eritrocitos, por ello durante una trasfusión de sangre incompatible se pueden observar reacciones adversas e incluso fatales. Ejemplo de lo anterior es la reacción de hemólisis inducida por la transfusión de sangre incompatible, lo que ocurre a nivel intravascular y es inmediata; se produce hipotensión, fiebre, coagulación intravascular diseminada, falla renal y muerte. Debido a lo anterior, es vital determinar la compatibilidad de los grupos sanguíneos antes de realizar una trasfusión.

A diferencia de lo que ocurre con el sistema ABO, no existen isoanticuerpos contra el antígeno Rh. Sin embargo, si una persona Rh negativa recibe eritrocitos del tipo Rh positivo, reaccionará y sintetizará anticuerpos contra el factor Rh. Esto es peligroso cuando una mujer Rh negativa se embaraza y su esposo es Rh+. Cuando el feto sea Rh+ al tener contacto con la sangre de la madre, esta producirá anticuerpos contra el factor Rh presente en los eritrocitos fetales. Estos anticuerpos serán del tipo IgG, los cuales pueden cruzar la barrera placentaria, reaccionar con los eritrocitos fetales e inducir una enfermedad hemolítica conocida como eritroblastosis fetal. Generalmente el primer hijo no sufre peligro alguno. Sin embargo, si en la mujer ocurre una respuesta inmune primaria al antígeno Rh en el

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	127 /166

momento del parto, puede generar una respuesta inmune secundaria contra el siguiente feto Rh+, los anticuerpos anti-Rh 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 tipo Rh+ 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 con eritrocitos tipo Rh- con bebés con eritrocitos de tipo Rh+. La determinación de los grupos sanguíneo se realiza mediante una reacción *in vitro* de aglutinación, en la cual sucede una reacción inmunológica entre los eritrocitos presentes en una gota de sangre y los anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno A (suero anti-A), antígeno B (suero anti-B) o antígeno D (suero anti-D o anti-Rh). La presencia o ausencia de aglutinación, determinará el tipo de sangre.

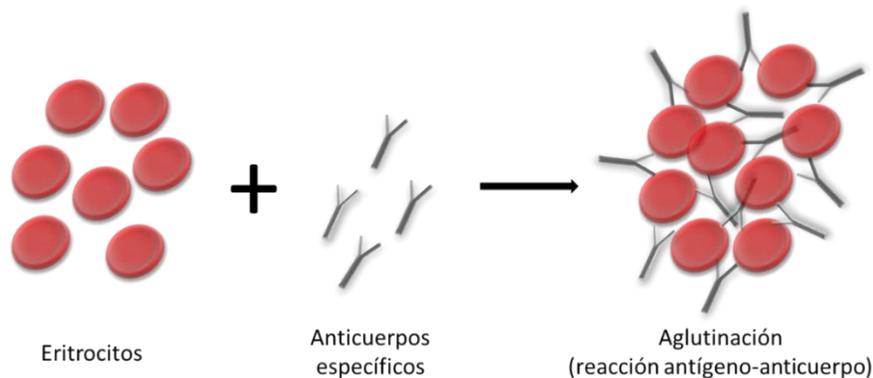


Figura 14.1 Reacción de aglutinación. Los anticuerpos específicos reaccionan con los antígenos presentes en la superficie de los eritrocitos, lo anterior provoca que los glóbulos rojos se agrupen y formen grumos fácilmente visibles (Fuente: Dra. Marta Elena Castro Manreza).

MATERIAL Y REACTIVOS POR EQUIPO

- 2 lancetas estériles.
- 2 portaobjetos.
- 2 aplicadores de madera.
- 2 torundas con alcohol.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	128 /166

MATERIAL Y REACTIVOS POR GRUPO

- 1 frasco de suero hemotipificador A.
- 1 frasco de suero hemotipificador B.
- 1 frasco de suero hemotipificador Rh o D.

SERVICIOS: Luz, agua.

PROCEDIMIENTO

- 1) Dos compañeros de cada equipo firmarán la carta de consentimiento informado.
- 2) Limpiar el área (dedo) con una torunda impregnada con alcohol.
- 3) Puncionar con una lanceta estéril y colocar en un portaobjetos limpio, tres gotas de sangre separadas.
- 4) En la primera gota de sangre colocar una gota de suero anti-A, en la segunda gota de sangre agregar una gota de suero anti-B, y en la última, una gota de suero anti-D.
- 5) Inmediatamente mezclar con un aplicador de madera, cuidando que no haya contacto entre cada gota de sangre.

RESULTADOS

Dibuje o fotografíe sus resultados, con base en las siguientes observaciones:

1. La presencia de aglutinación (grumos) en la mezcla en un lapso de minutos, indica la unión antígeno-anticuerpo (resultado de la prueba: positivo).
2. La ausencia de aglutinación (grumos) indica que no existe reacción de aglutinación (resultado de la prueba: negativo).
3. Se observará en que mezcla hubo aglutinación, reportando como grupo sanguíneo **A** si hubo aglutinación en el suero anti-A, grupo sanguíneo **B** si hubo



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	129 /166

aglutinación con el suero anti-B, grupo sanguíneo **AB** si aglutina en ambos sueros y grupo sanguíneo **O** si no hay aglutinación.

4. Si aglutina con el suero anti-D, Rh positivo, si no aglutina Rh negativo.

5. Realizar un cuadro de resultados que incluya todos los grupos sanguíneos observados en el grupo.

Determinación de grupos sanguíneos y Rh.
Sueros grupos sanguíneos.

	A	B	AB	O	Rh+	Rh-
Anti-A						
Anti-B						
Anti-A y Anti-B						
Anti-Rh						

Aglutinación. No aglutinación.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la importancia de conocer nuestro tipo de sangre?
2. ¿Cuándo se requieren y cuál es la función de las pruebas cruzadas?
3. Explique la diferencia entre reacción de aglutinación, precipitación y neutralización.
4. Investigue en qué consiste la prueba de Coombs directa e indirecta.

BIBLIOGRAFÍA

- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. (2011). *Microbiología médica*. (25a. ed.) McGraw Hill Interamericana Editores.
- Parslow T, Stites D, Abba T, Imboden D. J. (2002) *Inmunología básica y clínica*. (10a. ed.) Manual Moderno.
- Rojas E. (2006) *Inmunología (de memoria)*. (3a. ed.) Médica Panamericana.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	130 /166

Práctica No. 16

FIJACION DE COMPLEMENTO

OBJETIVO

Analizar la relevancia del sistema de complemento como mecanismo de defensa destacando su papel en la cavidad bucal.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

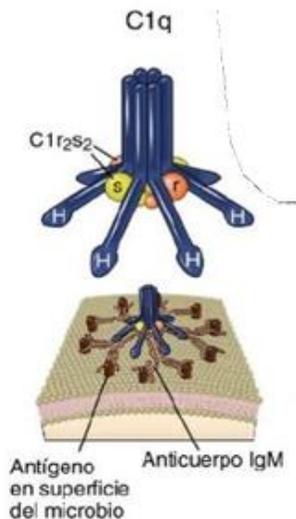
1. Definición de complemento.
2. Vías de activación del complemento.
3. Inmunoglobulinas que intervienen en la activación del complemento.
4. Definir los conceptos de normobiosis y disbiosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El complemento es un componente fundamental del sistema inmune innato, compuesto por una red de proteínas circulantes y de membrana, esenciales para combatir una variedad de microorganismos invasores. Estas proteínas representan aproximadamente del 10% al 15% de las proteínas en la sangre. Conformado por más de 30 proteínas, muchas de las cuales son enzimas proteolíticas o proteasas, el complemento circula en forma inactiva, conocida como zimógenos, hasta que es activado. Su síntesis ocurre principalmente en el hígado, aunque también puede ser producido por diversas células, como macrófagos, células endoteliales y adipocitos. El complemento puede desempeñar un papel específico cuando es activado por anticuerpos, o actuar de manera inespecífica cuando se activa por ciertos microorganismos.

Existen tres vías de activación bien conocidas: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de la lectina.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	131 /166



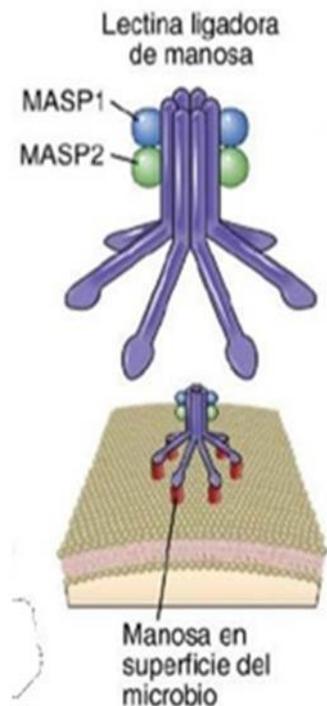
Fuente: Abbas, A. K., et al.(2015)

La vía clásica, así nombrada por ser la primera en ser descubierta, utiliza una proteína plasmática conocida como C1q para reconocer anticuerpos unidos a la superficie de un microorganismo u otra estructura. Una vez que el C1q se une a la porción Fc de los anticuerpos, se activan dos proteasas asociadas, llamadas C1r y C1s, desencadenando una cascada proteolítica que afecta a otras proteínas del complemento.

La vía alternativa, aunque descubierta posteriormente, es más antigua en la evolución filogenética que la vía clásica. Se activa cuando una proteína del complemento, C3, reconoce directamente ciertas estructuras en la superficie microbiana, como el lipopolisacárido bacteriano.

La vía de la lectina es iniciada por una proteína plasmática llamada lectina ligadura de manosa MBL (en inglés mannose-binding lectin) que identifica manosas terminales en glucoproteínas y glucolípidos microbianos. La MBL tiene una estructura hexamérica similar al componente C1q del sistema de complemento. Una vez que la MBL se une a los microorganismos, dos cimógenos, MASP1 (serina proteasa 1 asociada a la manosa) y MASP2, con funciones análogas a C1r y C1s, estos se asocian a la MBL para iniciar los pasos proteolíticos posteriores, los cuales son idénticos a los de la vía clásica.

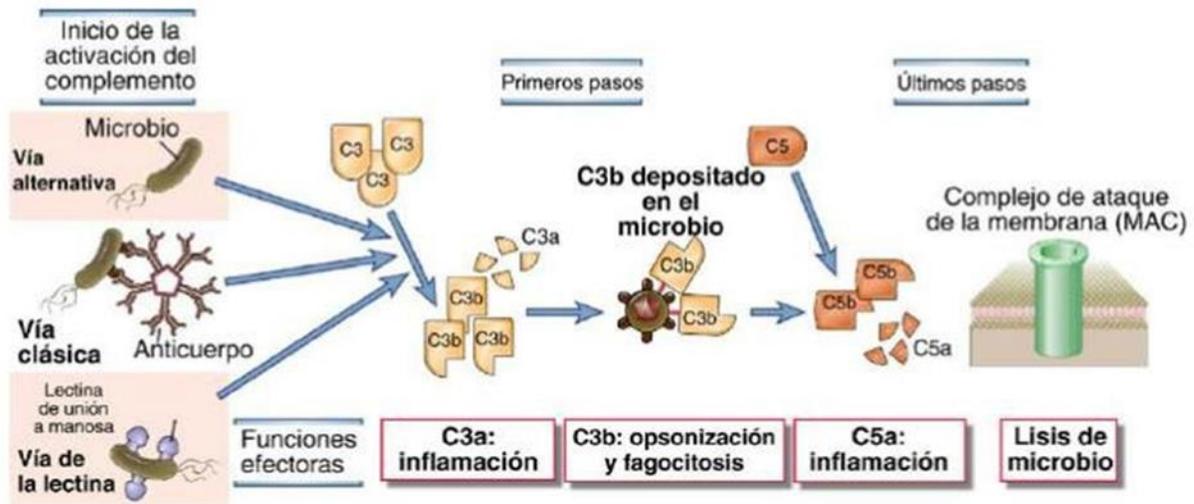
La activación del sistema de complemento puede desencadenarse a través de tres vías diferentes, las cuales conducen a la generación de C3b, marcando así los primeros pasos en la cascada de activación del complemento. El C3b, a su vez, inicia los pasos posteriores de activación del complemento, generando la producción de péptidos



Fuente: Abbas, A. K., et al. (2015).

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	132 /166

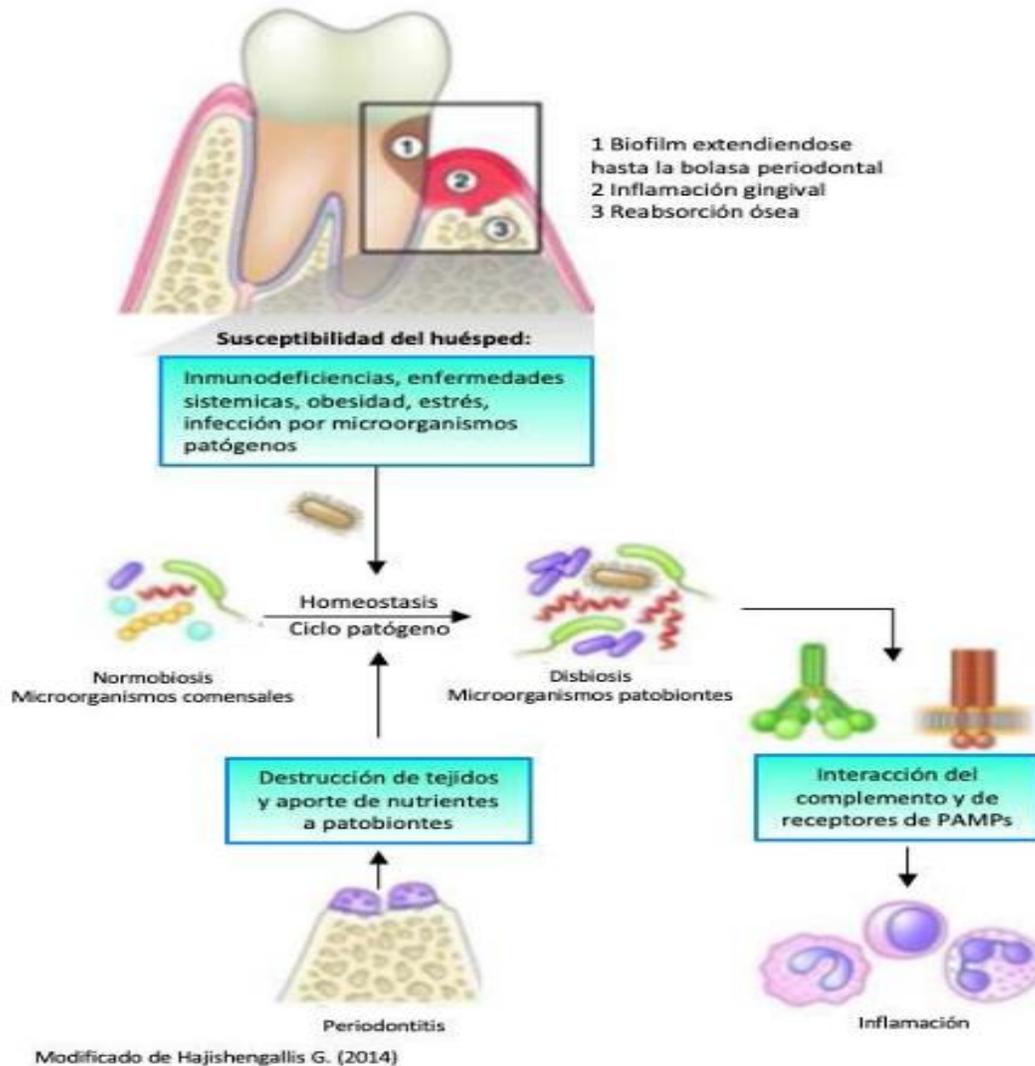
inflamatorios como C5a y en la polimerización de C9, formando el complejo de ataque a la membrana. Este último se llama así porque crea poros en la membrana plasmática.



Fuente: Abbas, A. K., et al. (2015).

La salud periodontal requiere un estado inflamatorio controlado que pueda mantener la homeostasis entre el huésped y los microorganismos en el periodonto. Sin embargo, los defectos en el estado inmunoinflamatorio del huésped, así como las condiciones predisponentes y los factores ambientales, pueden alterar este equilibrio hacia la disbiosis, un estado en el que los antiguos comensales se convierten en patobiontes proinflamatorios. De manera similar, la presencia de patógenos puede inclinar la balanza hacia la disbiosis.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	133 /166



La inflamación causada por la microbiota disbiótica depende, entre otros factores, de la activación del complemento y de la activación de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), lo que a su vez activa a los polimorfonucleares. Esta inflamación tiene dos efectos principales e interrelacionados: provoca la destrucción inflamatoria del tejido periodontal, incluida la pérdida ósea característica de la periodontitis, que a su vez proporciona nutrientes (péptidos de degradación de tejidos y otros productos) que promueven aún más la



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	134 /166

disbiosis y, por tanto, la destrucción de tejidos, generando así un ciclo patógeno que se perpetúa a sí mismo.

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 2 U. 100 % hemolíticas.
- ✓ Complemento 2 U. 100 % hemolíticas (suero).
- ✓ 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.

Equipo:

Centrífuga, incubadora.

SERVICIOS: Luz, agua.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	135 /166

PROCEDIMIENTO

- 1.- Extraer 10 ml de sangre de un alumno del grupo previa firma de la carta de consentimiento informado.
- 2.- Esperar a que coagule, separar el coagulo y centrifugar a 1000 rpm por 3 minutos, separar el Suero con una pipeta Pasteur y colocarlo en un tubo de ensaye.
- 3.- Colocar en una gradilla 3 tubos de ensaye de 13x100 previamente etiquetados con números del 1 al 3.
- 4.- Preparar cada tubo con los reactivos de acuerdo con la siguiente tabla de desarrollo

TUBO	ZYMOSAN ml.	SUERO ml.	I N C U B A R 37° C 15 min	GRC ml.	HEMOLISINA ml.	I N C U B A R 37°C 15 min.	BS FRIO ml.	C E N T R I F U G A R **
1	0.25	-		0.25	0.25		1.25	
2	0.25	0.25		0.25	0.25		1.0	
3	-	0.25		0.25	0.25		1.25	

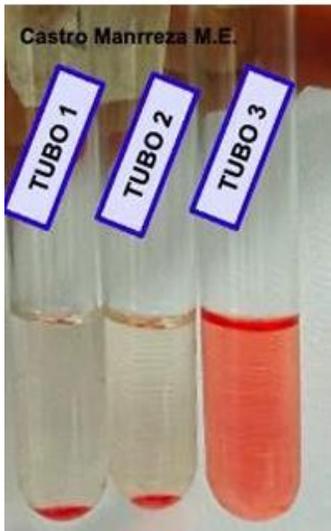
Tabla de desarrollo ** centrifugar a 1500 rpm durante 1 minuto después de agregar el TBS.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	136 /166

Resultados

Cuando hay lisis el contenido del tubo se observa con coloración rojiza (ruptura de eritrocitos), cuando no hay lisis el líquido se observa transparente y con un botón rojo en la base del tubo.



Tubo 1: Control negativo de activación del complemento ya que no contiene suero (no hay lisis).

Tubo 2: Se activa el complemento por vía alterna por acción del zymosan y dependiendo de la cantidad de complemento en suero puede o no presentar lisis.

Tubo 3: Debido a la ausencia del zymosan se activa el complemento por la vía clásica y se observara lisis.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué vía del complemento se activa con mayor frecuencia en la cavidad bucal?
2. ¿Qué moléculas presentes en los microorganismos de la cavidad bucal pueden desencadenar la activación del complemento por la vía alterna y por vía clásica?
3. ¿Cuál es el papel del C3b en la activación del sistema de complemento y cómo contribuye a la respuesta inmune en la cavidad bucal?
4. ¿Cómo puede la disbiosis en la cavidad bucal influir en la activación del complemento y contribuir a la periodontitis?
5. ¿Cuál es el mecanismo de acción del complejo de ataque a la membrana en la destrucción de microorganismos en la cavidad bucal?



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	137 /166

BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., et al. (2015). Inmunología celular y molecular (8a. ed.). Elsevier Health Sciences Spain.

Central, Hajishengallis G. (2014). Patogénesis inmunomicrobiana de la periodontitis: piedras angulares, patobiontes y respuesta del huésped. Tendencias en inmunología, 35(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>

Delves, P., Martin, S., Burton, D., & Roitt, I. (2014). Inmunología: fundamentos (12a. ed.). Médica Panamericana.

Jawetz, E., Melnick, J., & Adelberg, E. (2011). Microbiología médica (25a. ed.). México: McGraw Hill Interamericana editores.

Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2010). Inmunología de Janeway (7ª. Ed.). México: Mc Graw Hill-Interamericana.

Parham, P. (2011). El sistema Inmune (3ª ed.). México: Manual Moderno.

Parslow, T., Stites, D., Abba, T., & Imboden, D. J. (2002). Inmunología básica y clínica (10ª ed.). México: Manual Moderno.

Roja, E. (2006). Inmunología (de memoria) (3a. ed.). México: Panamericana.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	138 /166

Práctica No. 17 CHOQUE ANAFILÁCTICO

OBJETIVO

Analizar las reacciones de hipersensibilidad haciendo énfasis en el choque anafiláctico.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. Defina hipersensibilidad.
2. Mencione la clasificación de hipersensibilidad de acuerdo con Gell y Coombs.
3. Mencione la inmunoglobulina que interviene en la reacción de hipersensibilidad Tipo I.
4. ¿Qué células intervienen en esta reacción?

FUNDAMENTO TEÓRICO

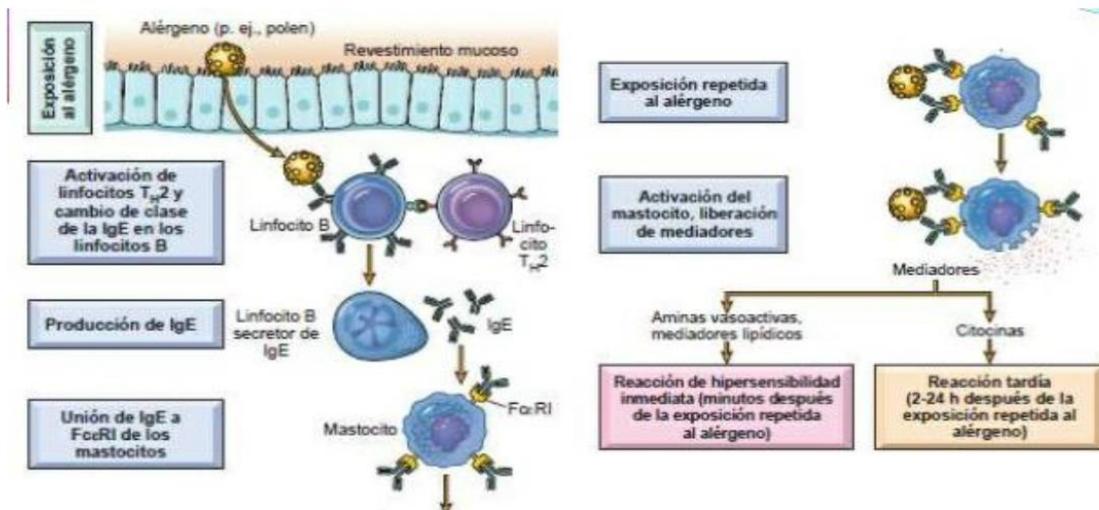
Toda respuesta inmunológica (normal o patológica), requiere de una fase de sensibilización, que siempre es silenciosa. Durante esta fase, las células presentadoras de antígenos procesan los antígenos propios o extraños y los presentan a los linfocitos T CD4. Estos linfocitos serán los encargados de dirigir el tipo de respuesta inmune, ya sea de tipo celular o humoral contra este antígeno, en forma silente, pudiendo concluir en una defensa exitosa o exagerada que cause daño orgánico en la persona.

El choque anafiláctico representa la manifestación más grave de la anafilaxia y es el resultado de la liberación de mediadores químicos de los mastocitos y basófilos (histamina, sustancia de reacción lenta de la anafilaxia, prostaglandinas, leucotrienos, etc.) dependientes de inmunoglobulina E (IgE).

De acuerdo con la clasificación de Gell y Coombs, esta respuesta corresponde a un mecanismo de daño mediado por linfocitos Th2 e IgE, también conocida como

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	139 /166

respuesta de hipersensibilidad inmediata. Durante la fase de sensibilización, se sintetiza IgE contra alérgenos, la cual se unirá a sus receptores en la superficie de los mastocitos. Cuando el nivel de IgE en los mastocitos alcance un nivel crítico, la siguiente exposición al alérgeno originará su desgranulación. Son esos mediadores químicos liberados durante este proceso, los responsables de los síntomas y signos como el broncoespasmo, los estornudos, la rinorrea, la congestión nasal, urticaria, angioedema, cólicos abdominales, diarrea, hipotensión, piel fría, pálida y sudorosa, venas subcutáneas colapsadas, taquicardia, oliguria o anuria, relajación de esfínteres y pérdida de la conciencia y en los casos más graves, la muerte.



Fuente: Robbins 2010

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, pelo de animales, plumas de aves, etc.)
- Látex.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	140 /166

Sin embargo, también intervienen otros factores importantes como:

- Características genéticas.
- Propiedades moleculares de los alérgenos.
- Contaminación Ambiental.
- Edad.
- Estilo de vida.

Clasificación de hipersensibilidad (Gell y Coombs)

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

Manifestaciones clínicas de la anafilaxia

Órgano o sistema involucrado	Signos y síntomas dominantes
Cardiovascular	Taquicardia, arritmias, hipotensión, colapso vascular, paro (Infarto de miocardio).
Respiratorio	Estornudos, rinorrea, ronquera, disfonía, estridor laríngeo, sensación de cerrazón de garganta, edema de vías aéreas superiores (lengua, úvula,



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	141 /166

	paladar blando, faringe, laringe) taquipnea, broncoespasmo, apnea, asfixia.
Piel	Prurito palmo-plantar inicial y luego generalizado, eritema, urticaria, angioedema.
1. Gastrointestinal	Náusea, vómitos, cólicos, dolor abdominal, deposiciones acuosas o sanguíneas.
2. Genitourinario	Cólicos uterinos, incontinencia urinaria.
3. Nervioso	Convulsiones sensación de “muerte inminente”, pérdida de la conciencia.

Tratamiento de choque anafiláctico en el consultorio dental:

1. Llamar al 911 y solicitar una ambulancia
2. Aplicar adrenalina 1:1000 I.M (repetir la dosis a los 15 o 30 minutos si es necesario).
3. Localizar la vena y canalizarla con alguna solución (Hartmann, glucosada al 5%, solución salina, entre otras.)
4. Colocar al paciente en posición de Trendelemburg
5. Si tenemos oxígeno aplicarlo al paciente 3 L.
6. Administrar antihistamínico I.V.
7. Administrar corticoesteroides I.V.
8. Administrar broncodilatadores I.V ó inhalados si hay conciencia.
9. Trasladar al paciente en ambulancia a un centro hospitalario, para su control.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	142 /166

MATERIAL POR GRUPO

Video grabación:

Analizar el video en donde se representa un evento de choque anafiláctico y tomar el tiempo que transcurre entre la aplicación del alérgeno y la aparición de los signos y síntomas, hasta llegar a la muerte del cobayo.

SERVICIOS:

Luz

Proyector

PC portátil

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 (botiquín de urgencias NOM-013-SSA2-2015).

CUESTIONARIO

1. ¿Qué sustancias y materiales de uso odontológico pueden desencadenar un choque anafiláctico?
2. ¿Qué mediadores químicos se liberan en esta reacción y que órgano o sistema ataca cada uno de ellos?
3. ¿Qué medicamentos deben existir en el botiquín de urgencias del consultorio dental (nombre comercial y genérico)?
4. ¿Cuál es el órgano diana en el choque anafiláctico?



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	143 /166

BIBLIOGRAFÍA

- Arce M.A.Y. (2009). *Inmunología e inmunopatología oral*. El manual moderno.
- Dewachter, P., Kopac, P., Laguna, J. J., Mertes, P. M., Sabato, V., Volcheck, G. W., Cooke, P. J. (2019). Anaesthetic management of patients with pre-existing allergic conditions: a narrative review. *British journal of anaesthesia*, 123(1),65–81.
<https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.01.020>
- Juliá Benito J.C., Álvarez Caro F. (2019). Anafilaxia en pediatría. *Protoc diagn ter pediatr*. 2:363-80.
- Murphy k., Travers P., Walport M. (2010). *Inmunología de Janeway*. Mc Graw Hill-interamericana.
- Parslow T., Stites D., Abba T., Imboden D.J. (2002). *Inmunología básica y clínica*. El manual moderno.
- Regueiro G.J.R., López L.C. (2010). *Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario*. Médica panamericana.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	144 /166

Práctica 18

PRESENCIA DE EOSINÓFILOS EN PROCESOS ALÉRGICOS

Objetivo

Comprender la importancia de los eosinófilos y su relación con procesos alérgicos.

Conocimientos previos

1. Morfología y funciones de los eosinófilos.
2. Concentración de células inmunes en secreciones nasales (valores normales).
3. Rinitis alérgica cuadro clínico, diagnóstico y tratamiento.

Fundamento teórico

Las células de los sistemas inmunitarios; innato (monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, NK) y adaptativo (linfocitos B y T), están presentes normalmente en forma de células circulantes en la sangre, en la linfa y en forma de células dispersas en casi todos los tejidos, generan respuestas protectoras eficaces contra microorganismos infecciosos.

Los eosinófilos (Eos), se originan en la médula ósea, son granulocitos sanguíneos que expresan gránulos citoplásmicos que contienen enzimas lesivas (eotoxinas) para las paredes celulares de los parásitos, pero que también pueden dañar los tejidos del hospedero. Los gránulos de los Eos contienen proteínas básicas que ligan pigmentos ácidos como la eosina. Algunos eosinófilos están presentes normalmente en los tejidos periféricos, en especial en los recubrimientos mucosos de las vías respiratoria, digestiva y genitourinaria. Los valores normales varían de 200 a 500 Eos por mililitro cúbico en sangre, estos pueden aumentar en algún proceso inflamatorio o cuando se presentan las manifestaciones alérgicas del árbol respiratorio superior. Su concentración en moco nasal y esputo aumentan



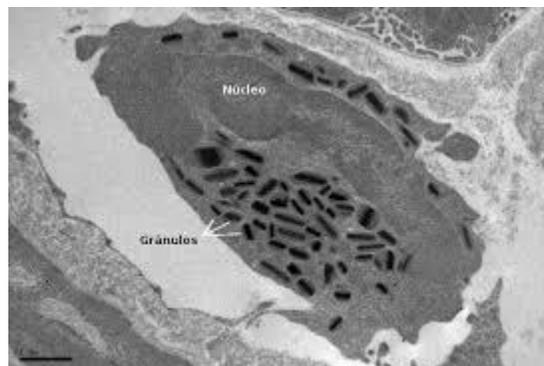
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO MECANISMOS
INFECCIOSOS Y RESPUESTA INMUNE DEL SISTEMA
ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	145 /166

considerablemente, y su determinación ayuda a definir un origen alérgico como puede ser la rinitis, bronquitis, asma y en otras afecciones como infecciones parasitarias, vasculitis, inmunodeficiencias de células T, enfermedad de Hodgkin, aspergilosis broncopulmonar, eosinofilia tropical y síndromes de hipereosinofilia idiopática.

Los eosinófilos tienen múltiples receptores de superficie, entre los que destacan los de adhesión, los ligandos del endotelio vascular, las integrinas a las que se unen las inmunoglobulinas, los receptores de selectinas que están en la célula endotelial y los ligandos de los carbohidratos, que son los que permiten que esta célula atraviese al espacio intravascular. Estos receptores de superficie, en especial IgE, IgM y C3b, aumentan cuando son ocupados por sus ligandos específicos, lo que a su vez incrementa el metabolismo oxidativo y ocasiona explosión respiratoria, la liberación de leucotrieno C4 y aumento de la actividad citotóxica. Como poseen receptores para las inmunoglobulinas, en especial para la IgA, pueden desencadenar degranulación importante de sus proteínas. Las proteínas granulares generan orificios transmembranosos, además, por su dotación enzimática, el eosinófilo puede neutralizar la acción de las células cebadas, y así la arilsulfatasa neutraliza la acción de las sustancias de reacción lenta de anafilaxia (SRS-A, slow-reacting substance of anaphylaxis), la fosfolipasa D inactiva al factor activador de plaquetas (PAF, platelets activating factor) y la histaminasa a la histamina, lo que inhibe y neutraliza la degranulación de basófilos y células cebadas.



Se observan los gránulos específicos en un eosinófilo

Fuente: Atlas de Histología Vegetal y Animal



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	146 /166

Material

- ✓ Equipo de hemocolorantes para tinción de frotis sanguíneo HYCEL que contiene:
 - Solución fijadora
 - Hemocolorante 1
 - Hemocolorante 2
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Isopo estéril
- ✓ Mechero bunsen
- ✓ Pinzas de disección
- ✓ Microscopio

SERVICIOS Agua, luz, gas

Procedimiento

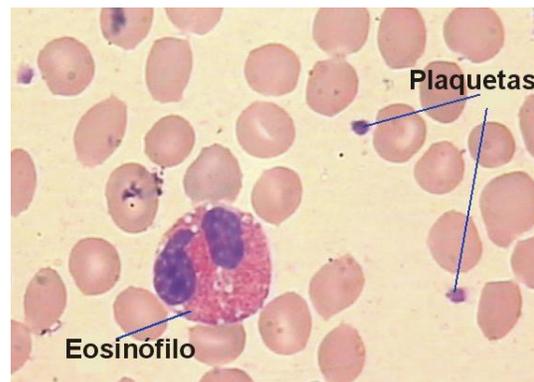
1. Tomar una muestra del moco nasal de un donador, previamente deberá firmar la carta de consentimiento informado.
2. Realizar la extensión de la muestra en un portaobjetos, dejar secar al aire.
3. Sumergir el portaobjetos en el recipiente con solución Fijadora para 3 veces durante 1 segundo cada vez. Dejar escurrir el exceso de líquido sobre una toalla de papel.
4. Sumergir el portaobjetos en el recipiente con Hemocolorante 1 por 1 segundo 4 veces. Dejar escurrir.
5. Sumergir 4 veces el portaobjetos en el recipiente con Hemocolorante 2 por 1 segundo cada vez. Dejar escurrir.
6. Enjuagar suavemente el frotis con agua.
7. Secar al aire y observar al microscopio a 10X y 40X.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	147 /166

Resultado

Si existe la presencia de eosinófilos en moco estos se observarán de la siguiente manera:



Fuente: Atlas de Histología Vegetal y Animal

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los valores normales de los eosinófilos en sangre?
2. ¿Cuál es la importancia de la rinitis alérgica en odontología?
3. Menciona dos diagnósticos diferenciales de la rinitis alérgica.
4. ¿Cuáles son las funciones principales de los eosinófilos?

Bibliografía

- Abbas, Abul K., et al (2015). Inmunología celular y molecular (8a. ed.), Elsevier Health Sciences Spain - T, ProQuest Ebook Central, <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbsp/detail.action?docID=3429504>. Created from bibliodgbsp on 2024-03-08 01:58:11.
- Lynch, (1985) Métodos de laboratorio. Ed. Interamericana. 2ª edición, pp. 734,. Técnicas de laboratorio en hematología clínica. Ed. CIB. Primera edición. Turgeon, M. Clinical Hematology. Ed. D.M.T.1988.
- K. Okubo , Y. Kurono , K. Ichimura , M. Enomoto , Y. Okamoto , Y. Kawauchi , et al. (Eds.)(2016). Directrices prácticas para el tratamiento de la rinitis alérgica en Japón. 8.ª ed., Life Science , Tokio (en japonés)
- Megías M, Molist P, Pombal MA. (2023) Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	148 /166

Práctica No. 19

USO Y MANEJO DE MICROPIPETAS

OBJETIVO

Aprender la forma correcta de utilizar micropipetas para realizar microdiluciones.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

1. ¿Que es una dilución?
2. Mencionar en que procedimientos se utilizan micropipetas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En el trabajo de laboratorio hay una serie de operaciones básicas, como son la pesada de los reactivos sólidos o la medida del volumen de un líquido, cuya correcta ejecución es determinante para la obtención de unos resultados analíticos fiables.

La medida de volúmenes de los líquidos se puede llevar a cabo mediante diferentes instrumentos como buretas, probetas o pipetas. Estas últimas se pueden encontrar en distintos formatos, fabricadas con materiales diferentes y con tamaños muy diversos. Entre los diferentes tipos de pipetas encontramos las pipetas graduadas o aforadas, las pipetas Pasteur o las micropipetas. La técnica mediante la cual se dosifica un volumen de un líquido utilizando una pipeta se denomina pipeteo.

Cuando queremos medir y transferir pequeños volúmenes de un líquido, en el rango desde unos pocos microlitros a mililitros, es muy aconsejable utilizar micropipetas. Existen diferentes tipos de micropipetas y la técnica para pipetear con cada una de ella requiere unas condiciones específicas de uso.

Aunque podemos encontrar formatos diferentes según la marca del fabricante, en general, estas micropipetas de desplazamiento de aire con accionamiento manual constan de las siguientes partes (Imagen 1):

- Empuñadura o cuerpo principal de la micropipeta.

Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	149 /166

- Émbolo o botón de accionamiento usado para el llenado y dispensado de los líquidos, este presenta dos toques que indican la presión que debemos ejercer para absorber (1er toque) y descargar (2º toque) el líquido. También las hay de un solo toque.
- Rueda o tornillo de ajuste del volumen con el que establecemos el volumen exacto que queremos dispensar.
- Ventana indicadora del volumen que muestra el volumen seleccionado.
- Botón de eyección o botón expulsor de la punta para desechar las puntas usadas.
- Cono o soporte de la punta.
- Eje de la micropipeta, que une la empuñadura o cuerpo con el soporte de la punta. En algunos modelos puede tener acoplado el eyector.

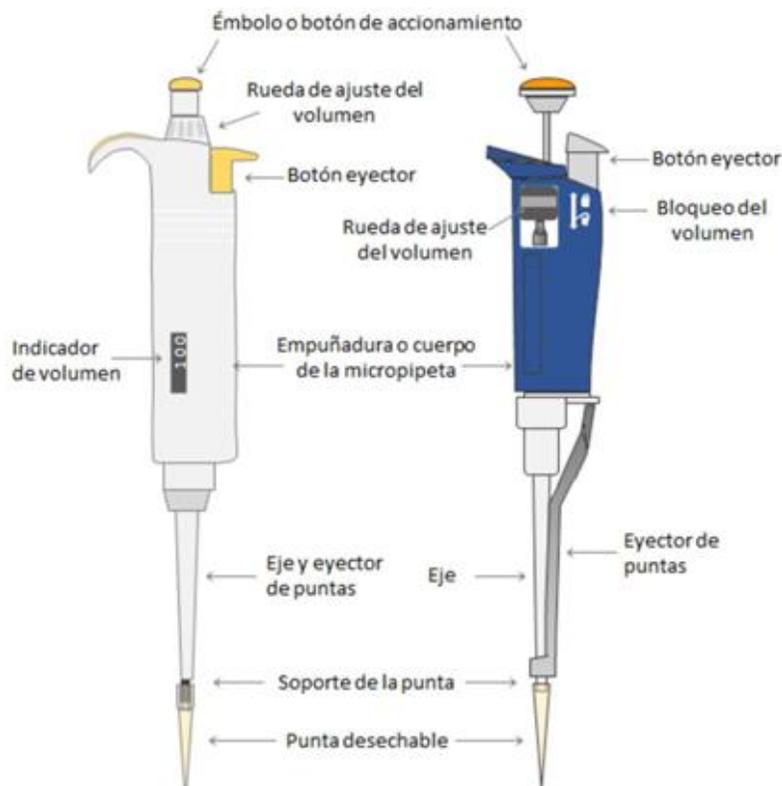


Figura 1 Partes de una micropipeta

Fuente: Manual de prácticas, R. Navarro et al



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	150 /166

1.-Manejo correcto de las micropipetas

A) Llenado de la pipeta

- Colocar el pulgar sobre el émbolo de pipeteado.
- Cuando el émbolo se presiona sentirá un punto de resistencia. Éste es el primer "alto" o "tope".
- Si continúa presionando encontrará un punto donde el émbolo ya no se mueve hacia abajo, este corresponde al segundo "alto" o "tope".
- Para llevar a cabo una correcta aspiración del líquido es muy importante mantener la micropipeta siempre en posición vertical (Figura 2).
- Manteniendo esta posición, deberemos presionar el émbolo con el pulgar hasta el primer tope antes de introducirlo en el líquido.

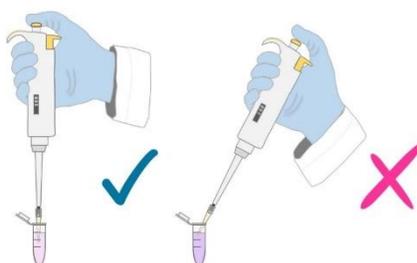


Figura 2. Ángulo de inmersión de la micropipeta en el líquido
Fuente: Manual de prácticas, R. Navarro et al

- Oprimir el émbolo hasta el primer tope y colocar la punta dentro del líquido, formando un ángulo de 90° con este, y soltaremos el émbolo de manera lenta y controlada, disminuya la presión del émbolo para permitir que se desplace hacia arriba. No suelte el émbolo abruptamente, al permitirlo causará que el líquido pueda salpicar dentro de la punta produciendo volúmenes inexactos y generando contaminación de la pipeta.
- La profundidad de inmersión depende del volumen de la punta que estemos utilizando. Mantener una profundidad de inmersión adecuada nos permitirá mejorar la precisión de nuestro pipeteo más de un 5% (Figura 3). Una vez el émbolo se haya desplazado hasta arriba mantenga la micropipeta en el líquido durante un segundo, esto evita que se aspire aire en la parte final.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	151 /166

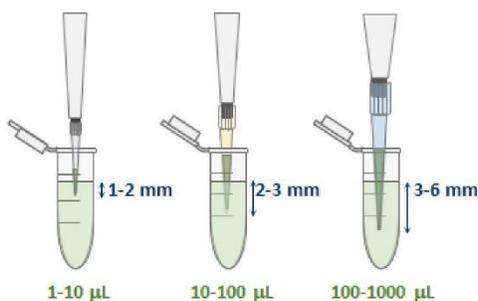


Figura 3. Profundidad de inmersión de la punta durante el pipeteo
Fuente: Manual de prácticas, R. Navarro et al

B) Dispensar el líquido

- La mejor técnica para dispensar el líquido es dejarlo caer por la pared lateral del recipiente donde queremos llevar la alícuota. Para ello, tocaremos ligeramente la pared del recipiente con la punta y presionaremos el pistón lentamente hasta llegar al segundo tope.
- Se puede depositar el líquido suavemente sobre la superficie o introduciendo ligeramente la punta en la solución (Figura 4). Haga este procedimiento a una velocidad moderada, hacerlo muy rápido hará que queden gotas de muestra en la punta. Si observa cuidadosamente, entonces notará que al oprimir hasta el segundo “tope” se expelle todo el líquido de la punta.

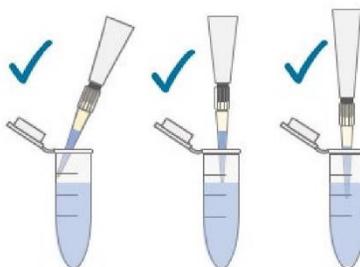


Figura 4. Formas de depositar el líquido
Fuente: Manual de prácticas, R. Navarro et al.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	152 /166

C) Expulsar y desechar la punta utilizada

Algunas micropipetas disponen de un botón eyector que nos permite expulsar las puntas de manera automática, facilitando su reemplazo y reduciendo el riesgo de contaminación.

Siempre debemos depositar las puntas utilizadas en un contenedor destinado para ello, según las características de los materiales o reactivos con los que estemos trabajando.

Recuerda que una buena gestión de los residuos o material desechado en el laboratorio es esencial para nuestra seguridad en el trabajo y para el medio ambiente.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Micropipeta de 50 ul.
- Puntas para micropipeta
- Microplaca de 96 pozos
- Tubos ependorff
- Solución tintada

SERVICIOS

Agua, luz

PROCEDIMIENTO

- 1.- Identificar las partes de las micropipetas utilizadas en tu laboratorio
- 2.- Compararlas con el esquema e identificar sus diferencias.
- 3.- Colocar 50 ul de agua en los 12 pozos de la fila A de la microplaca.
- 4.- Tomar 50 ul de la solución tintada del tubo ependorff y colocarlo en el pozo 1 de la fila A de la microplaca.
- 5.- Con la misma punta tomar 50 ul del pozo 1 y transferirlo al pozo 2
- 6.- Tomar 50 ul del pozo 2 y transferirlo al pozo 3
- 7.- Repetir el punto anterior transfiriendo en forma secuencial hasta el pozo 11
- 8.- El pozo 12 funcionará como testigo negativo.
- 9.- Practicar con la micropipeta el llenado y descarga de líquidos tintados depositándolos en microplacas y tubos ependorff.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	153 /166

RESULTADOS

Al concluir la práctica el alumno conocerá y será capaz de utilizar correctamente una micropipeta.

Analizar y realizar un cuadro indicando a que dilución corresponde cada pozo de la microplaca.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuándo está indicado realizar una microdilución?
2. Diferencia entre dilución y microdilución

BIBLIOGRAFÍA

- Eppendorf AG (2020). Eppendorf Research plus. Manual de instrucciones. Disponible en: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/es/174967/Eppendorf_LiquidHandling_Operating-manual_Research-plus.pdf.
- Departamento de Servicio Técnico de Eppendorf (2017). Calibración y ajuste de sistemas de dispensación en el laboratorio. Farmaespaña industrial, Septiembre-octubre 2017, pp. 86-88. Disponible: <http://www.farmaindustrial.com/digital-versions/magazines/index.html?id=61>.
- Fuentes López, Ana; Fernández Segovia, Isabel; Fuentes López, Cristina (2020). Manejo de micropipetas. Departamento de Tecnología de Alimentos. Centro Universitat Politècnica de València.
- Fuentes López, Ana; Fernández Segovia, Isabel; Fuentes López, Cristina (2020). Consideraciones en el uso y mantenimiento de micropipetas. Departamento de Tecnología de Alimentos. Centro Universitat Politècnica de València.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	154 /166

Practica No. 20

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS HETERÓFILOS COMO DIAGNÓSTICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

OBJETIVO:

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

CONOCIMIENTOS PREVIOS:

- ¿Qué significa titulación de anticuerpos?
- ¿Qué es una reacción cruzada?
- Mencione el cuadro clínico de mononucleosis infecciosa.
- Tratamiento de mononucleosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO:

El término anticuerpos heterófilos (AH) (del griego, hetero: diferente y filo: afinidad) es usado para describir anticuerpos humanos dirigidos contra antígenos de origen animal más que contra antígenos humanos.

Los AH se encuentran en ciertos tipos de leucemias, linfoma de Burkitt y enfermedad de Hodgkin (linfomas donde está fuertemente asociado a la infección por Virus Epstein Bar), también en hepatitis viral, lupus eritematoso sistémico, enfermedad del suero y mononucleosis infecciosa entre otros.

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad de distribución mundial, causada por el virus de Epstein-Barr (VEB), que 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 y alcanza un



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	155 /166

máximo a las dos semanas y permanece alto hasta por aproximadamente 6 semanas después. 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.

En la enfermedad del suero originada por faboterapia, la presencia de estos anticuerpos se debe a que en México, la mayor parte de los sueros usados en esta seroterapia provienen de caballos inmunizados deliberadamente con toxoides y venenos.

Los llamados anticuerpos heterófilos, que se forman durante la mononucleosis infecciosa se encuentran en el 80-90% de los pacientes que la padecen, 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.

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 POR EQUIPO:

- 2 Tubos de ensayo con muestra de saliva y suero.
- Suspensión de glóbulos rojos de caballo al 1% en PBS.
- Solución salina amortiguadora de fosfato (PBS).
- 1 Microplaca.
- Tubo control positivo.
- Micropipetas de 50 a 100 µl. con puntas.

PROCEDIMIENTO:

1. Extraer 5 ml de sangre de un compañero del grupo y solicitarle colecte también 5 ml de saliva, previamente deberá firmar la carta de consentimiento informado.
2. Colocar 50 µl de PBS en los pozos 1 al 12 de la fila A y en la fila B de la microplaca.

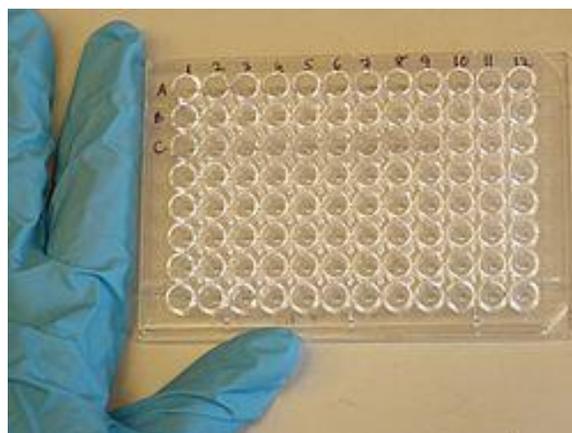


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO MECANISMOS
INFECCIOSOS Y RESPUESTA INMUNE DEL SISTEMA
ESTOMATOGNATICO



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	156 /166

3. En el pozo 1 de la fila A colocar 50 μ l de la muestra de saliva y realizar diluciones al doble con la micropipeta de 50 μ l hasta el pozo 11, desechar los últimos 50 μ l ya que el pozo 12 solo lleva PBS ya que es el testigo negativo.
4. En la fila B repetir el procedimiento anterior pero colocando suero en lugar de saliva.
5. Repetir el mismo procedimiento en la fila C pero con suero de conejo anti glóbulos rojos de caballo (esta fila será el testigo positivo del estudio)
6. Adicionar 50 μ l de suspensión de glóbulos rojos de caballo a todos los pozos en las tres filas.
7. Mover suavemente toda la placa de forma horizontal para que se mezclen.
8. Incubar 30 minutos a 37 grados centígrados.
9. Leer aglutinación y reportar el título de anticuerpos en saliva y suero humano.



microplaca Fuente: propia

RESULTADOS:

- Se observará un título de anticuerpos muy alto en la fila C del ensayo, lo que permitirá identificar las características que presenta una reacción de hemaglutinación.
- Comparar las fila A y B (problemas), con el pozo 12 de la fila que corresponda (testigo negativo) y la fila C que son testigos positivos.
- Los individuos que han recibido faboterapia darán resultados falsos positivos.

Ejemplo:



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	157 /166

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. La fila B es el control positivo de la prueba, por lo tanto ningún pozo se parece al pozo 12 .



En este ejemplo se puede observar que el título de anticuerpos heterófilos está en el pozo 7.

CUESTIONARIO.

1. ¿Qué manifestaciones bucales se presentan durante la mononucleosis infecciosa?
2. ¿Porqué es importante que los donadores de órganos estén libres del virus Epstein- Barr?



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	158 /166

BIBLIOGRAFÍA:

Brooks, G.F., Carrol K.C., Butel J.S.(2010), Microbiología médica, (capítulo 33) Herpesvirus, Mc GrawHill Interamericana, 25 Ed., México.

Drew L.W.(2007), Una introducción a las enfermedades infecciosas, Virus del Herpes, (capítulo 38), Mac GrawHill Interamericana, México.

Sumaya C.V., Jenson H.B.(2002) Manual of Clinical Laboratory Immunology, Epstein-Barr virus, Editorial Rose NR, American Society for Microbiology.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	158 /166

Práctica No. 21

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

1. OBJETIVO

Establecer la relación que existe entre la presencia de microorganismos cariogénicos, la presencia de anticuerpos en saliva y suero contra microorganismos cariogénicos con el índice de caries (CPO).

2. CONOCIMIENTOS PREVIOS

- Microorganismos que son cariogénicos.
- Definición de caries dental.
- Colonización bacteriana en la caries dental.
- Factores que intervienen en el proceso de caries dental.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los componentes inmunológicos y no inmunológicos de la saliva, son factores que pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de la salud dental, ya que interfieren en la fisiopatología de procesos infecciosos como la caries y enfermedad periodontal, donde los microorganismos son uno de los factores etiológicos más importantes.

Dentro del proceso cariogénico, los factores inmunes específicos más destacados son las inmunoglobulinas presentes en suero y saliva. La más estudiada es la IgA secretora (IgAs) que se sintetiza localmente y se secreta activamente, encontrándose en mayor cantidad en la cavidad bucal. En menor proporción se encuentran la IgA, IgG e IgM séricas, que llegan a través del fluido gingival.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	159 /166

La IgAs también se encuentra en lágrimas, sudor, secreciones bronquiales e intestinales, leche humana, calostro entre otros.

La IgAs en saliva inhibe la adhesión bacteriana, reduce la hidrofobicidad, la acumulación de las bacterias e inactiva las enzimas y toxinas bacterianas. Además, en algunos estudios se ha relacionado que un mayor nivel de IgAs se relaciona con pacientes que no tienen caries. Por lo anterior, hipotéticamente ayuda en la prevención de la caries dental. Sin embargo, en la literatura internacional existen artículos científicos con resultados contradictorios con respecto a la correlación entre IgAs en saliva y la caries dental. Esto puede ser explicado por la diferencia en los estudios de los métodos de muestreo, criterios de selección de pacientes, las pruebas de laboratorio y factores de condiciones sistémicas como desnutrición proteico-calórica, obesidad, infecciones bacterianas, estrés psicológico, tabaquismo, salud bucal, presencia de caries o dientes obturados, etc., todos estos factores afectan los niveles de IgAs en saliva.

Existen estudios que señalan que los anticuerpos séricos (especialmente IgG) son capaces de opsonizar *S. mutans*. Los neutrófilos poseen receptores específicos para la porción Fc de la IgG que se enlaza específicamente con *S. mutans*; de este modo, se forma un complejo IgG- *S. mutans*, que se adhiere a la membrana del polimorfonuclear. Una vez logrado esto, el componente es endocitado y forma fagosomas, los cuales se combinan con los lisosomas del neutrófilo (formando el fago-lisosoma). En esta estructura mezclan las enzimas lisosómicas con el microorganismo, tras lo cual este muere.

Por otra parte, las células plasmáticas que están en las glándulas salivales, producen IgAs, estas moléculas son considerablemente más resistentes a las enzimas proteolíticas que las IgA, IgG e IgM séricas. Esta resistencia relativa hace que la IgAs esté mejor adaptada a la cavidad oral y otras membranas mucosas.

También se ha observado que durante el desarrollo de la caries dental hay un aumento de los niveles de anticuerpos IgG e IgM en suero y de complejos inmunes compuestos por anticuerpos séricos y antígenos de *S. mutans* que pueden suprimir la estimulación del sistema inmune de mucosas, siendo esta una posible explicación del porqué los niveles de anticuerpos IgAs se deprimen tras el desarrollo de la caries dental. Este hecho fue apoyado



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	160 /166

por estudios secuenciales que revelaron que después del tratamiento contra la caries sigue un aumento en el nivel de anticuerpos IgA contra *S. mutans*, coincidiendo con una disminución de los niveles de IgG e IgM en el suero.

MATERIAL Y REACTIVOS POR GRUPO

Microplaca

Micropipetas de 50 µL

2 Tubos de ensayo 18 X 150

Saliva y suero de un mismo donador (de preferencia con caries activa)

Baño maría

PBS (solución amortiguadora de fosfatos)

Jeringas de 5 ml

Antígeno de Carbohidratos de *S. mutans* pegados a glóbulos rojos de carnero.

Antígeno de Carbohidratos de *S. sanguis* pegados a glóbulos rojos de carnero.

Mechero

Alcohol

Equipo:

Centrifuga

Incubadora.

SERVICIOS: Agua, luz, gas



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	161 /166

PROCEDIMIENTO

1. El compañero donador de sangre y saliva deberá firmar la carta de consentimiento informado.
 2. Extraer 5 ml de sangre de un compañero, centrifugar y separar el suero.
 3. Pedir al mismo donador 3 ml de saliva y filtrarla con la jeringa con algodón.
 4. Incubar ambas muestras en baño María a 62º C por 3 minutos para inactivar el complemento.
 5. Colocar con una micropipeta una gota (50µl) de PBS en cada uno de los pozos (1 a 12) de la microplaca en las filas A y B.
 6. Colocar con otra micropipeta una gota (50µl) de **SUERO** en el **pozo No. 1 fila A**.
 7. Con la misma punta de la micropipeta mezclar y tomar 50 µl, transferirlos al pozo 2.
 8. Realizar el mismo procedimiento para los siguientes pozos hasta el No. 11, ya que el No. 12 será el testigo negativo.
 9. En el **pozo No. 1 de la fila B** con una micropipeta agregar una gota (50µl) de **SALIVA** y repetir los pasos del 6 y 7.
 10. Colocar con otra micropipeta en los pozos del 1 al 12 una gota (50µl) de **glóbulos rojos** con el antígeno pegado en **ambas filas A y B**.
 13. Incubar a 37º 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 fila ya que este es un testigo negativo, de acuerdo con 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.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	162 /166

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 1:1, pozo No. 2 dilución 1:2, 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:

4. Mencione las características antigénicas de *Streptococcus mutans*.
5. ¿Por qué es necesario inactivar el complemento en esta práctica?
6. Mencione por lo menos dos funciones antibacterianas de IgAs.



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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	163 /166

BIBLIOGRAFÍA:

- Chamorro-Jiménez, A. L., Ospina-Cataño, A., Arango-Rincón, C., y Martínez-Delgado, Cecilia María. (2013). *Acción de la inmunoglobulina A secretora en el proceso de adherencia del Streptococcus mutans al diente humano. CES Odontología*, 26(2), 76-106.
- Delgado J. *Factores de virulencia de los microorganismos asociados a la caries. Univers Odont* 2000; 20 (supl 1):44-53.
- Gornowicz, A., Tokajuk, G., Bielawska, A., Maciorkowska, E., Jabłoński, R., Wójcicka, A., & Bielawski, K. (2014). The assessment of sIgA, histatin-5, and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 20, 1095–1100. <https://doi.org/10.12659/MSM.890468>
- Martínez, S. E., Juárez, R. P., Vila, V. G., y Hormaechea, M. I. (2013). *Relación entre la Salud Bucal y la Concentración de Inmunoglobulina A Salival en Adolescentes. Odontoestomatología*, 15(21), 38-44.
- López O., Cardona D., Gutiérrez L. (2005). *Relación entre el recuento de Streptococcus mutans y el estado de salud dental. Revista digital de Salud Universidad Autónoma de Manizales*, 1(1).
- Madariaga, V. I., Pereira-Cenci, T., Walboomers, X. F., & Loomans, B. A. C. (2023). Association between salivary characteristics and tooth wear: A systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry*, 138, 104692. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104692>
- Ranadheer, E., Nayak, U. A., Reddy, N. V., & Rao, V. A. (2011). The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 29(2), 106–112. <https://doi.org/10.4103/0970-4388.84681>
- Rodríguez A, González DO. (2000). *Fisiopatología de la caries dental. Univers Odont*, 20 (supl 1):21-27.
- Spatafora, G., Li, Y., He, X., Cowan, A., & Tanner, A. C. R. (2024). The Evolving Microbiome of Dental Caries. *Microorganisms*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010121>
- Zaldívar M. (2002). *El sistema inmunológico de las mucosas. Revista Cubana de Medicina General Integral*, 18(5):352-354.



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	164 /166

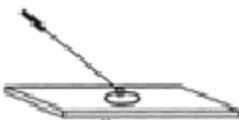
ANEXOS

TINCIÓN DE GRAM

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: Gram negativas y 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 bacteriana en una gota de agua sobre un portaobjeto y posteriormente fijarlo al calor con el método de Koch, a este procedimiento se le conoce como "frotis".

REALIZACIÓN DEL FROTIS





Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	165 /166

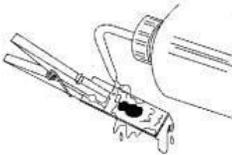
TÉCNICA

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).



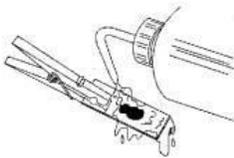
- 2.- Lavar con agua.



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



- 4.- Lavar con agua



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



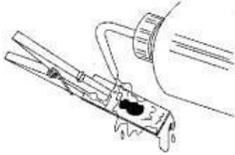


SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA MANUAL DE LABORATORIO DEL MÓDULO MECANISMOS
INFECCIOSOS Y RESPUESTA INMUNE DEL SISTEMA
ESTOMATOGNÁTICO



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	166 /166

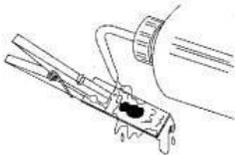
6.- Lavar con agua.



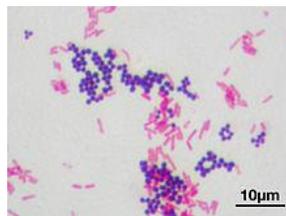
7.- Cubrir la muestra con safranina por 1 minuto (color de contraste).



8.- Lavar con agua.



9.- Dejar secar y observar al microscopio.





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



Código	Fecha de aprobación	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML08	00/07/2024	1	167 /166

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO

El que suscribe _____
con No. de cuenta _____ con domicilio en _____
_____ Teléfono _____
Correo electrónico _____ Edad _____ Género _____

Manifiesto que se me ha informado de manera amable y sin presión alguna, en forma clara, sencilla y suficiente que para la realización de la práctica de laboratorio número _____ Titulada _____ del módulo Mecanismos Infecciosos y Respuesta Inmune del Sistema estomatognático del Tercer año de la Carrera de Cirujano Dentista, se requiere realizar el siguiente procedimiento:

- Extracción de sangre.....
 - Recolección de saliva.....
 - Muestra de Exudado Faríngeo.....
 - Extracción de fluido nasal.....
 - Muestra de Lágrima.....
 - Muestra de Sudor.....
 - Muestra de cálculo dental.....
 - Muestra de absceso dental.....
 - Muestra de diente con caries.....
 - Otro.....
- Especifique _____

Se me informó que dicho procedimiento no implica riesgo para mi salud y/o integridad, y que es un procedimiento en el que siempre estará presente o realizará uno de los profesores responsables del grupo.

Manifiesto que la información que he proporcionado es verídica y que firmo esta carta de consentimiento informado, conociendo todo el procedimiento en el que se utilizará mi donación.

Ciudad de México a _____ del mes de _____ del 20____.

Nombre y firma del alumno _____

Nombre y firma del profesor responsable _____