



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

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



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



Licenciatura Médico Cirujano

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

Coordinación Área Biomédica

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

Vigente hasta: 03/08/26



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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	03	1 de X

PROFESORES QUE ELABORARON EL MANUAL

ELIZABETH PINEDA PEÑA

JOSE FERNANDO ARELLANO COBIAN

LINA ORTÍZ IBARRA

MARTHA ADELINA LÓPEZ HERNÁNDEZ

ROSA IRENE MONDRAGON VALDEZ

HUMBERTO RAMIREZ LOPEZ

FRANCISCO JAVIER PARADA GARCIA

VERONICA TORRES CABALLERO

CLAUDIA MARTÍNEZ CARRERA

MARIO AVILA AGUILAR

EDGAR IVÁN TORRES CORIORILES

JESSICA LOPEZ



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	3 de 155

Contenido	
INTRODUCCIÓN.....	5
Objetivos Generales	7
Reglamento General de los Laboratorios	8
Reglamento Interno del Laboratorio de Microbiología de la Licenciatura Médico Cirujano.	9
Manejo de Residuos Biológico – Infecciosos	14
Consentimiento informado.	18
Rúbrica de evaluación del Reporte de Prácticas de Laboratorio de Microbiología	22
Módulo 1. Piel y Musculo Esquelético.	24
Cultivo y aislamiento de <i>Staphylococcus</i> en muestra de piel.....	24
Diferenciación entre cepas de <i>Staphylococcus</i> patógenas primarias de cepas oportunistas.	29
Micosis cutáneas o superficiales por la técnica del microcultivo.	34
Toma de muestra y aislamiento de heridas infectadas.	39
Observación de <i>Leishmania mexicana</i> y otras especies.....	44
Módulo 2. Respiratorio.	48
Identificación de Streptococcus y Neumococcus en el aparato respiratorio.....	48
Exudado faríngeo y nasal.....	52
Identificación de microorganismo del exudado faríngeo.	57
Identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	62
Módulo 3. Cardiovascular, Linfático y Hematopoyético.....	66
Observación de preparación de <i>Plasmodium</i>	66
Observación de <i>Trypanosoma</i>	70
Hemocultivo.	74
Resiembra en medios selectivos	77
Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas.....	82



Reacciones febriles.....	86
Módulo 4. Digestivo.....	93
Cultivo de enterobacterias.....	93
Identificación de bacterias a partir del coprocultivo.....	97
Coprocultivo.....	100
Coproparasitoscópico por concentración (cualitativo).....	103
Diagnóstico de Amibiasis.....	107
Módulo 5. Urogenital.....	111
Diagnóstico de Sífilis.....	111
Urocultivo	115
Observación de sedimento urinario.....	118
Identificación de bacteria en orina.....	121
Cultivo de secreciones uretrales y vaginales.....	125
Módulo 6. Sistema nervioso y órganos de los sentidos.....	130
Meningitis bacteriana.....	130
Meningitis viral.....	135
Observación de <i>Cysticercus cellulosae</i>	137
Cultivo de Clostridium.....	143
Identificación del género Clostridium.....	147
ANEXO 150	
Reporte de practica.....	150
Técnicas.....	153
Técnica de coloración de Gram.....	153
Técnica de coloración de Ziehl – Neelsen.....	153
Demostración de endosporas (Método técnica de Scheffer – Futton).....	154
Coagulasa.....	154
Catalasa.....	154
Obtención de plasma citratado.....	155



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	5 de 155

INTRODUCCIÓN

El manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de Segundo Año ha sido elaborado como material didáctico que sirva como herramienta pedagógica del componente de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Carrera de Médico Cirujano de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y dirigido a los alumnos de segundo año de la carrera, que contribuya en la formación del médico cirujano acorde al perfil profesional establecido por la carrera.

Este manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de Segundo Año de la Carrera Médico Cirujano tiene por propósito que el alumno fortalezca los conocimientos de la microbiología e inmunología que se manejan durante la parte teórica de la asignatura y que son contemplados en el Plan de Estudios de segundo año correspondiente de la carrera. De manera que alumnos y profesores apliquen los conocimientos teóricos en el componente práctico mediante una metodología estandarizada, favoreciendo la adquisición de habilidades y destrezas en el desarrollo de experimentos tanto en el área microbiológica como en el área inmunológica. Siendo la finalidad general de este manual que el alumno pueda realizar un análisis e interpretación de los resultados obtenidos con una orientación clínica, es decir, que al finalizar cada práctica el alumno cuente con los elementos necesarios para identificar las indicaciones/recomendar cierto método diagnóstico de laboratorio al paciente en el entorno clínico para la identificación de las enfermedades causadas por los microorganismos vistos en cada módulo y sobre todo realice una interpretación orientada al tratamiento.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	6 de 155

Este manual abarca técnicas del área microbiológica e inmunológica que sustentan la información teórica manejada durante las diversas unidades contempladas en el Plan de Estudios correspondiente, siendo estas: Unidad I (Piel y Músculo Esquelético), Unidad II

(Respiratorio), Unidad III (Cardiovascular, Linfático y Hematopoyético), Unidad IV (Digestivo), Unidad V Urinario y Genital), Unidad 6 (Nervioso y Órganos de los sentidos). Para la Unidad VI (Endocrino), se contempla que el alumno realice una investigación bibliográfica profunda que le permita obtener la información más actual disponible en el campo para los temas propuestos en la unidad y contando con la orientación del profesor pueda definir la relevancia, validez e impacto del mismo, promoviendo su capacidad de análisis crítico para finalmente presentar un artículo científico mediante un seminario. Por lo que es importante que el alumno domine los conocimientos del componente práctico obtenidos previamente durante las sesiones prácticas de primer año, pues las destrezas se continuarán reforzando en esta etapa mediante la supervisión de los profesores. Cada práctica se ha organizado en los siguientes apartados: Objetivo(s), Fundamento teórico, Materiales (equipo, reactivos y servicios), Procedimiento, Resultados, Cuestionario y Referencias bibliográficas.

Es importante resaltar que el fundamento teórico proporcionado en este manual no pretende sustituir a los que el alumno adquiere en clases teóricas y tampoco sustituyen a la investigación bibliográfica que los estudiantes deben realizar para el desarrollo de las actividades en el laboratorio, por lo que este manual de procedimientos debe considerarse como una guía general que apoya el trabajo en el laboratorio y complementa el trabajo teórico de la asignatura. Se sugiere que la información manejada en cada práctica deben ser discutidos y enriquecidos en el diálogo entre estudiantes y profesores, favoreciendo la adquisición de conocimiento por parte del alumno mediante un pensamiento crítico.

Finalmente, la evaluación del componente práctico estará apegada en todo momento al programa académico vigente aprobado para el componente Microbiología, Parasitología e Inmunología de la carrera, considerando que se requiere un 80% de asistencia mínimo y que para llevar a cabo las prácticas en su totalidad la tolerancia de entrada será de 10 minutos máximo. En la evaluación se tendrá en cuenta: examen de conocimientos escrito semanal previo a la práctica, presentación de seminario, participación activa durante la



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	7 de 155

práctica y la entrega de reporte de práctica. La dinámica de evaluación será explicada a profundidad por los profesores en la sesión de introducción al laboratorio.

Objetivos Generales

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	8 de 155

- VI. Contribuir en la formación de profesionistas que colaboren de manera armoniosa con todos los integrantes del equipo de salud a través del trabajo en equipo.

Reglamento General de los Laboratorios

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	9 de 155

Reglamento Interno del Laboratorio de Microbiología de la Licenciatura Médico Cirujano. L-123, L-124

1. Será obligatorio el uso de bata blanca de manga larga y algodón que cubra hasta la rodilla para toda persona que permanezca dentro del laboratorio y durante la realización de las practicas se deberá utilizar el equipo de protección personal que sea necesario, así como el cabello recogido.
2. Por seguridad, se debe evitar el uso de lentes de contacto, zapato abierto, gorras, falda, short o bermuda, joyería, audífonos y cabello suelto dentro del laboratorio.
3. Está prohibido consumir alimentos, ingerir bebidas y fumar dentro del laboratorio.
4. El alumno deberá conducirse con ética, responsabilidad y de manera adecuada (no correr, no empujarse, no jugar) durante la realización de las practicas, así como en el manejo de animales de experimentación en caso de utilizarse.
5. El alumno deberá reportar a sus profesores si sufre alguna condición de salud que ponga en riesgo su participación en la práctica (crisis convulsivas, alteraciones cardiacas, toma de medicamentos antidepresivos, etc.), de manera que se tomen las precauciones necesarias para su seguridad dentro del laboratorio.
6. Se requiere de un 80% de asistencia mínimo para tener derecho a evaluación en el componente práctico, por lo que una ausencia de más de 10 minutos será considerada como falta.
7. Para una óptima realización cada práctica, la tolerancia de entrada será de 10 minutos máximo.
8. Las puertas de acceso, las áreas comunes y pasillos deberán estar libres de objetos que eviten el libre tránsito (bancos, mochilas, etc), así como no colocar mochilas o loncheras sobre la mesa de trabajo, estas deberán colocarse en el lugar destinado para este fin.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	10 de 155

9. Para el trabajo en el laboratorio, los integrantes del grupo formaran 5 equipos con el número de alumnos que determine el profesor titular de laboratorio.
10. El grupo en general es responsable de la limpieza y conservación del equipo, materiales y áreas comunes del laboratorio durante la práctica. En caso de encontrar sucio el laboratorio se deberá reportar al personal a cargo o mediante el formato del Sistema de Gestión de la Calidad correspondiente.
11. Todos los alumnos deberán asegurarse de dejar cerradas las llaves de gas, agua y aire de su mesa de trabajo al finalizar la práctica. Mientras que todos los profesores se aseguraran de dejar cerrada la llave de gas principal del laboratorio al final de la práctica.
12. El alumno deberá limpiar con desinfectante la mesa de trabajo al inicio y al término de la práctica, dejándolo limpio (sin basura).
13. Todos los alumnos deberán realizar lavado de manos al inicio y al final de la práctica.
14. Solamente se podrá utilizar teléfono celular, computadora u otro dispositivo electrónico para realizar actividades propias de laboratorio con autorización del profesor a cargo del grupo.
15. El alumno designado solicitará el material necesario para desarrollar la práctica al personal del interlaboratorio, usando un vale impreso expresamente para dicho fin y adjuntando una credencial vigente que lo acredite como alumno de la facultad. El listado del material se publicará en la puerta de acceso del interlaboratorio al inicio de la práctica.
16. Al recibir el material, el alumno designado revisará que el material se encuentre limpio, en buen estado y completo, deberá ser transportad de forma segura a su mesa de trabajo. En caso de que el material este deteriorado o incompleto deberán reportarlo de inmediato al personal de interlaboratorio y no transportarlo a su mesa de laboratorio hasta que le sea remplazado.
17. Al recibir el microscopio, el alumno designado verificará que se encuentre en condiciones óptimas y limpio registrando en la bitácora correspondiente cualquier observación. Al finalizar la practica el alumno anotará en la bitácora correspondiente las condiciones en las que lo entrega.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	11 de 155

18. El uso de aceite de inmersión en el microscopio solo se realizará bajo la supervisión del profesor de mesa y solamente se utilizará en el objetivo de inmersión (100x), mientras que alumnos y profesores verificarán que se limpie apropiadamente el objetivo antes de entregar el microscopio.
19. Durante el transcurso de la práctica, los alumnos solo podrán utilizar los aparatos, equipos y reactivos disponibles en el laboratorio si están siendo asesorados por un profesor.
20. El material utilizado durante la práctica, deberá ser entregado/devuelto al interlaboratorio máximo 10 minutos antes de que concluya el horario asignado. Dicho material deberá estar completo, sin daño y tal como se recibió.
21. Si por alguna razón, el material que se devuelve al interlaboratorio está deteriorado o incompleto, el usuario deberá hacer un vale adicional por ese material y dejar su credencial hasta que se reponga lo dañado o faltante; teniendo como límite dos semanas para reponer dicho material. Cumplido es tiempo, si no se ha repuesto el material, no se le permitirá el acceso al laboratorio a todos los integrantes del equipo deudor.
22. En el caso de que algún material (como cultivos, bioquímicas, etc.) requiera ser incubado o guardado en el interlaboratorio para su posterior observación, deberá ser etiquetado claramente con una leyenda que incluya número de equipo, grupo y fecha, presentándose a la lectura de resultados en el tiempo establecido para cada uno.
23. Los alumnos (máximo 2 por equipo) deberán presentarse a la lectura de resultados con su bata puesta y en el horario establecido para ello (horario publicado en las puertas de acceso al interlaboratorio) y anotándose en la bitácora correspondiente. El material incubado o guardado para lectura que no sea revisado por el alumno será desechado a los 3 días de haber realizado la práctica (salvo casos específicos), el equipo que no realice lectura será anotado en la bitácora para la sanción correspondiente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	12 de 155

24. Queda estrictamente prohibido el paso al interlaboratorio para cualquier alumno o persona ajena al área, sin autorización.
25. Queda prohibido que los alumnos se queden con laminillas de tinciones o frotis hechos en el laboratorio o cualquier material biológico.
26. Se deberá reportar al profesor responsable cualquier accidente/incidente por pequeño que sea.
27. En caso de romper algún material con contenido biológico el alumno deberá avisar inmediatamente al profesor y al personal de interlaboratorio, para llevar a cabo la contención correspondiente (inactivación con cloro por 15 minutos y limpieza).
28. El alumno deberá desocupar totalmente el laboratorio de preferencia 5 minutos antes de que concluya el horario asignado, con la finalidad de permitir la ventilación adecuada del mismo.
29. Al término de la práctica, al abandonar el profesor el laboratorio, ningún alumno podrá permanecer en el interior de este.
30. Cada reporte de practica deberá incluir el código generado en la evaluación de la actividad de laboratorio, mediante el sistema de gestión de calidad, el cual debe generarse máximo a los 4 días de haber realizado la práctica y será responsabilidad del jefe de mesa y de grupo vaciarlo en la bitácora correspondiente.
31. Cada mesa/equipo de trabajo podrá disponer de una gaveta para el resguardo del material básico (solución desinfectante, toallas desechables, algodón en rollo, encendedor, marcador indeleble, rollo de masking tape u otro material adicional que se requiera), colocando su propio candado y siendo su responsabilidad desocupar dicha gaveta al finalizar el ciclo escolar, de lo contrario serán abiertas (rompiendo los candados). Queda prohibido utilizar la gaveta para guardar artículos personales de valor u otro material ajeno a las practicas, ya que no tendrán acceso a ella en horario diferente a clase, con la finalidad de no interrumpir las actividades de otros alumnos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	13 de 155

32. Es obligación del alumno realizar disposición de los residuos acorde a lo establecido para para tal fin. Los frotis realizados no deben lavarse si no colocarse en solución inactivadora, lo mismo con asas utilizadas para inocular hongos.
33. Será responsabilidad de todo usuario del laboratorio leer cuidadosamente este reglamento al inicio del semestre e identificar las salidas de emergencia, las zonas de seguridad, los protocolos de emergencia y el manejo de los residuos, para un óptimo uso de las instalaciones y recursos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	14 de 155

Manejo de Residuos Biológico – Infecciosos

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

OBJETIVOS

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

INTRODUCCIÓN

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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	15 de 155

Agente biológico-infeccioso: cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades cuando está presente en concentraciones suficientes (inóculo), en un ambiente propicio (supervivencia), en un hospedero susceptible y en presencia de una vía de entrada.

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

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

Cepa: cultivo de microorganismos procedente de un aislamiento.

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

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

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

Sangre: el tejido hemático con todos sus elementos.

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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	16 de 155

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

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





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	17 de 155

INACTIVACIÓN DE MUESTRAS

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Normatividad

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

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

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



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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	18 de 155

Consentimiento informado.



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



Título de la Práctica: _____

Alumno responsable de la toma de muestra: _____

Fecha: _____

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

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

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

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

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

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



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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	19 de 155

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

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

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

CONSENTIMIENTO

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

Declaración del paciente o alumna (o).

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

Nombre del alumno (a). Fecha y firma

Nombre del profesor responsable de la práctica Fecha y firma



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	20 de 155

Criterios de Evaluación de la Asignatura Microbiología Laboratorio

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

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

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

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

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

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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	21 de 155

Observaciones Importantes

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	22 de 155

Rúbrica de evaluación del Reporte de Prácticas de Laboratorio de Microbiología

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



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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	23 de 155

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	24 de 155

Módulo 1. Piel y Musculo Esquelético.

Cultivo y aislamiento de *Staphylococcus* en muestra de piel.

OBJETIVO

- Identificar las características de los microorganismos del grupo de los *Staphylococcus* y su relación con su patogenia en la piel y conocer los diferentes medios de cultivo para su aislamiento.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los *Staphylococcus* son microorganismos esféricos, ligeramente menores a 1 μm de diámetro. En frotis, teñidos a partir de medios de cultivo sólidos, se agrupan característicamente en grumos o racimos de forma irregular, son grampositivos. Se clasifican de acuerdo a la producción de sus pigmentos y de acuerdo a la producción de la coagulasa.

Clasificación acuerdo a la prueba de la coagulasa:

- *Staphylococcus aureus*, que es coagulasa positiva y patógena.
- *Staphylococcus epidermidis*, que es coagulasa negativa y oportunista.

Generalmente la clasificación acorde a la prueba de coagulasa es la más utilizada, ya que tiene la ventaja de indicar si el organismo en estudio es patógeno o no.

Propiedades generales de los *Staphylococcus*

Tinción de Gram: Cocos Gram positivos dispuestos en racimos.

Afinidad al oxígeno: Son aerobios y anaerobios facultativos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	25 de 155

Exotoxinas: El estafilococo patógeno produce numerosas exotoxinas y, entre ellas, alguna variedad de hemolisinas, una leucocidina, una dermatonecrosina y una enterotoxina.

Lactosa e Indol: acorde a su especie.

Cápsula: Carecen de cápsula.

Movilidad: No son móviles Esporas: Carecen de esporas.

Cultivo

Los medios simples propician el crecimiento de los *Staphylococcus* sobre una amplia gama de temperatura (15 a 40°C) y de pH (4.8 a 9.4). Aunque *Staphylococcus aureus* es un anaerobio facultativo, suele emplearse para identificación cultivo aerobio sobre agar sangre. Las colonias grandes, lisas, frecuentemente beta hemolíticas pueden tener color amarillo dorado debido a la producción de pigmentos carotenoides. Sin embargo, la formación de pigmento es variable, siendo mayor a temperatura ambiente que a 37°C y mayor en medios aerobios. *Staphylococcus epidermidis*, que carece de pigmento, forma colonias lisas, blancas inusualmente no hemolíticas. Como los *Staphylococcus* sintetizan la catalasa, el peróxido de hidrógeno que producen en condiciones aerobias no se acumula hasta convertirse en tóxico, como en el caso de los microorganismos catalasa negativos, como los estreptococos y neumococos.

Otros medios selectivos son agar S110, para observar morfología colonial, este medio tiene altas cantidades de sal, haciéndolo altamente selectivo, agar Voguel – Jhonson, para observar reducción de teluros a teluritos, agar Sal – manitol para ver la fermentación de manitol.

Infecciones y enfermedades en el hombre

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* se caracterizan por la localización, supuración y necrosis tisular con cicatrización resultante. La lesión más frecuente, el furúnculo, actúa a menudo como fuente de diseminación hematológica de microorganismos con producción subsiguiente de bacteriemia y de enfermedades como osteomielitis y neumonía. La colonización de los estafilococos sobre los tegumentos queda restringida en condiciones normales por la antibiosis que ejercen los miembros de la flora normal. Sin embargo,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	26 de 155

después de tratamiento intensivo con antibióticos de amplio espectro, muchos miembros de la flora normal del intestino disminuyen en número, pudiendo perder su antagonismo, lo que propicia colonización extensa de *Staphylococcus aureus*. En estos casos puede producirse enterocolitis pseudomembranosa grave y, a veces mortal, que según informes a menudo depende de la presencia de cepas productoras de enterotoxina.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Papel seda.
- Microscopio.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.
- Hisopos.
- 1 caja de Petri con Agar sangre.
- 1 caja de Petri con Agar S-110.
- 1 caja de Petri con Agar sal manitol.

CEPAS

- *Staphylococcus aureus*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Por el reverso, dividir las cajas de Petri con los medios de cultivo por la mitad con un lápiz graso.
2. Respetando la técnica aséptica (generar la zona aséptica, esterilizar el asa bacteriológica y boca de tubos, antes y después de cada inoculación) sembrar en



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	27 de 155

una mitad de cada medio de cultivo la cepa de *Staphylococcus aureus* por estría cruzada o de aislamiento, identificándolo perfectamente.

3. Con un hisopo estéril, tomar una muestra de piel (del ala de la nariz, la frente o la región donde se presente lesiones o acné), oprimiendo suavemente.
4. Descargar la muestra en la otra mitad de cada medio de cultivo (Agar sangre, agar S-110 y agar sal manitol), realizando siembra por estría cruzada o de aislamiento.
5. Realizar un frotis de la cepa *Staphylococcus aureus* y otro frotis de la muestra de piel tomada (como precaución quemar el hisopo utilizado).
6. Teñir ambos frotis con tinción de Gram.
7. Observar las laminillas a 10X y 40X. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos). Desechar los frotis.
8. Etiquetar los medios de cultivo e incubarlos a 37 °C, por 24 horas.

RESULTADOS

A las 24 horas leer la morfología colonial y guardar las cajas Petri con los medios de cultivo en el refrigerador para hacer la identificación bioquímica de *Staphylococcus*, la próxima sesión.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es la razón de que el medio de agar S-110 sea específico para los estafilococos?
- 2) ¿En qué condiciones se pueden encontrar a los *Staphylococcus* como Gram negativos?
- 3) Describa las infecciones de impétigo y forunculosis.
- 4) Definir alfa y beta hemolisinas, leucocidinas, estafilocinasa, factor de difusión y enterotoxina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	28 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.

Murray R. P; Rosenthal S. K; Pfaller A. M. (2021). Microbiología médica. España: Elsevier.

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	29 de 155

Diferenciación entre cepas de *Staphylococcus* patógenas primarias de cepas oportunistas.

OBJETIVO

- Evidenciar mediante pruebas bioquímicas y especiales ciertas características propias de especie, que permitan la clara diferenciación entre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Como Género los *Staphylococcus* comparten ciertas características como su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram, el ser halófilos (la capacidad de sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de sal), el ser anaerobios facultativos (crecen aerobia y anaerobiamente), la presencia de catalasas (enzimas que catabolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso). No obstante, se conoce que el Género comprende alrededor de: *40 especies 24 Subespecies*, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades. La importancia de la correcta diferenciación de especies puede traducirse incluso en la identificación de vulnerabilidades propias de cada microorganismo, que en la práctica clínica puede significar la elección correcta de un fármaco como tratamiento y por consecuencia la pronta recuperación del estado de salud del paciente.

En el caso de los *Staphylococcus*, dos de las especies de importancia clínica que producen enfermedades que afectan a la piel y al sistema músculo-esquelético son *Staphylococcus aureus* y *epidermis*, que a nivel de laboratorio pueden ser fácilmente diferenciados por su patrón bioquímico que revela marcadas diferencias en pruebas tales como coagulasa (prueba que pone de manifiesto proteínas del microorganismo que se unen al fibrinógeno y lo convierten en fibrina insoluble) y fermentación de algunos carbohidratos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	30 de 155

Cuadro comparativo de las cepas <i>Staphylococcus</i>		
Prueba	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Pigmento de la colonia	+	-
Coagulasa	+	-
Licuefacción de gelatina (solo algunas cepas)	+ o V	-
Manitol	+	-
Glucosa en anaerobiosis	+	-
V= variable		

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Papel seda.
- Microscopio.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.
- Hisopos.
- 2 tubos con caldo manitol rojo de fenol con campana de Durham.
- 2 tubos con caldo glucosa rojo de fenol con campana de Durham.
- 2 tubos con gelatina bacteriológica (una con sello de Vas-par).
- 2 tubos con caldo de glucosa rojo de fenol con campana de Durham y sello de Vas-par.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- 3 tubos de ensayo 13 x 100.
- Peróxido de hidrógeno.

SERVICIOS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	31 de 155

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A. Tinción de Gram

1. A partir de los cultivos obtenidos de la sesión anterior revisar la morfología colonial e identificar colonia prototipo, hacer un frotis y realizar tinción de Gram y observar al microscopio a 10x y 40x (Observación a 100x solo con supervisión del profesor). Desechar los frotis.

B. Morfología Colonial

1. Sembrar los tubos con caldo a partir de los medios de agar S-110, escogiendo las colonias más típicas (pigmentadas y blancas) previamente seleccionadas y etiquetando con cuidado un juego de medios (cepa pura y muestra de piel). Respetando la técnica aséptica.
2. Incubar los tubos a 37°C, teniendo cuidado en colocar los que van con sello de Vassar en donde les corresponde y reportar resultados después de 24 horas de incubación.

C. Gelatinasa

1. Sembrar el tubo de gelatina por picadura con las mismas colonias previamente seleccionadas y dejar incubar a temperatura ambiente por 24 horas. Respetando la técnica aséptica. Observar si hay licuefacción.

D. Coagulasa

1. Obtener plasma citratado, para ello se debe obtener por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario sano (previo consentimiento por escrito), colocar 2 gotas de citrato de sodio y agitar cuidadosamente. Posteriormente centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga. Finalmente separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo nuevo.
2. Realizar la prueba de coagulasa libre (prueba en tubo) tomando una asada de microorganismos e inocularlo por suspensión en el tubo de plasma citratado (0.5 mL), incubar a 37°C durante 1- 4 horas revisando el tubo a intervalos de 30 minutos o 1 hora. Observar si hay formación de coágulo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	32 de 155

E. Catalasa

1. Realizar la prueba de catalasa tomando una asada de los microorganismos y disolviendo estos en una gota de peróxido de hidrógeno colocada previamente en un portaobjetos limpio y seco. Realizarlo de forma comparativa. La formación de burbujas indica la presencia de catalasa (catalasa positiva).
2. Verificar que no exista reacción del asa bacteriológica con el peróxido de hidrógeno realizando la prueba sin el inóculo; esto debido a que el material de fabricación de ciertas asas genera burbujeo al contacto con el peróxido.

RESULTADOS

Observar detalladamente las diferencias físicas en la morfología colonial que se desarrolló en los medios S-110 y Agar sal manitol, así como las diferencias en los resultados de las pruebas bioquímicas, para poder identificar el marcado contraste entre las especies *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* del género *Staphylococcus*. Se sugiere reportar los resultados en una tabla.

Prueba	Resultados obtenidos a partir de la cepa pura de <i>Staphylococcus aureus</i>	Resultados obtenidos a partir de los microorganismos obtenidos del hisopado de piel
Morfología microscópica y afinidad tintorial a partir de la tinción de Gram		
Morfología colonial en agar S-110		
Morfología colonial en Agar sal manitol		
Fermentación de manitol		
Fermentación de glucosa en anaerobiosis		
Licuefacción de gelatina		
Catalasa		
Coagulasa		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	33 de 155

CUESTIONARIO

- 1) Mencione tres enfermedades en piel que son ocasionadas por *Staphylococcus aureus* y su cuadro clínico característico.
- 2) Describa para que sirve la campana de Durham.
- 3) Describa cómo funciona y para qué sirve el sello de Vas-par en esta práctica.
- 4) Mencione al menos 3 indicadores de pH en pruebas bioquímicas, describiendo a que pH ocurre el viraje de color.
- 5) Mencione las toxinas producidas por estafilococos.
- 6) ¿Cuál es la importancia de realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos para estafilococos?
- 7) Mencione función e importancia de la Proteína A estafilocócica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).
- MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.
- Murray R. P; Rosenthal S. K; Pfaller A. M. (2021). Microbiología médica. España: Elsevier.
- Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	34 de 155

Micosis cutáneas o superficiales por la técnica del microcultivo.

OBJETIVOS

- Conocer la técnica para la obtención de hongos en el laboratorio (microcultivo), las ventajas y desventajas en su realización.
- Conocer las características morfológicas de los dermatofitos.
- Comprender e identificar las características generales de los hongos para integrar un diagnóstico de micosis superficiales por la técnica del microcultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La mayoría de los hongos, tanto macroscópicos como microscópicos están formados por estructuras filamentosas, por lo tanto, a su unidad funcional se le denomina Hifa o filamento, y al conjunto de ellas micelio o talo, por su origen las hifas se dividen en: hifas verdaderas y pseudohifas.

- Las hifas verdaderas son propias de los hongos y se forman a partir de la germinación de una conidia.
- Las pseudohifas son propias de las levaduras y se forman a partir de gemaciones.

Las micosis superficiales corresponden al grupo de micosis exclusivamente tegumentarias y son un grupo de enfermedades de la piel y sus anexos causadas por dermatofitos, y también por levaduras y hongos diferentes a los dermatofitos.

En la actualidad se reconocen por lo menos 37 especies de dermatofitos clasificados en tres géneros en su estado imperfecto con base en el tipo de esporas que producen: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*.

Tiña de la cabeza



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	35 de 155

Es una dermatofitosis que afecta al cuero cabelludo, cejas y pestañas. El hongo que se aísla en primer lugar es *Epidermophyton floccosum*, siguiendo en orden de frecuencia *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Tiña de los pies “pie de atleta”

Ésta dermatofitosis afecta dedos de los pies, pliegues interdigitales y plantas. Las especies que participan con más frecuencia son: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*.

Tiña de las uñas

Se incluyen bajo este rubro los casos de infecciones de las uñas por dermatofitos y se diferencian de las onicomycosis en las que son causadas por hongos no dermatofitos y levaduras. Los agentes causales son *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*.

Tiña del cuerpo o de la piel lampiña

Es una dermatofitosis superficial causada generalmente por algunas especies de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*.

Diagnóstico de laboratorio

Las muestras clínicas se toman de los fragmentos y bordes activos de las lesiones, del pelo y escamas, para ello es necesario realizar raspado, las muestras se colocan en caja de Petri estériles.

Siembra de microcultivo

Se usan cajas de Petri estériles con dos portaobjetos y triángulo de vidrio cada uno. Medio de cultivo en caja de Petri (sabouraud, PZ o papa dextrosa agar).

Las muestras se procesan con KOH al 10% o 20% para lograr digestión de la lo cual permite observar los elementos formados de los dermatofitos por microscopía simple, de contraste de fase o fluorescencia, para facilitar la observación se utiliza blanco de calcoflúor. Los elementos que se observan son hifas, arthroconidias y esporas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	36 de 155

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Caja de Petri con medio de cultivo [Sabouraud o papa dextrosa agar (PDA)].
- Bisturí.
- Mango de Bisturí.
- Pinzas de disección.
- 1 caja de Petri 100 x 20 con triangulo de vidrio, porta y cubre objetos.
- Glicerol al 10 %.
- Pipeta Graduada de vidrio de 5 mL estéril.

Para la observación del dermatofito en la siguiente sesión.

- Pinzas de disección.
- Pipeta Graduada de vidrio de 5 mL estéril.
- Formaldehido al 10%.
- Vaso de precipitados
- Colorante: Lactofenol azul de algodón.
- Microscopio.
- Porta y cubre objetos.

CEPAS

- Dermatofito (*Trichophyton terrestre*).

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	37 de 155

PROCEDIMIENTO

A. Cultivo del dermatofito

1. Respetando la técnica aséptica. Cortar el medio de cultivo contenido en la caja Petri (Sabouraud o PDA), con ayuda del bisturí en forma de cuadrícula de un centímetro de lado, quedando así los bloques de cultivo donde se sembrarán los hongos. Recordando que el bisturí y las pinzas solo se flamean.
2. Colocar con mucho cuidado el cuadro de agar en la caja de Petri, sobre el portaobjetos. Tener precaución para evitar contaminantes.
3. Con el asa bacteriológica recta y doblada en ángulo recto, sembrar los hongos tomando una pequeña porción de la cepa, recordando sembrar por picadura en cada uno de los lados del agar (solicitar instrucciones al profesor).
4. Con las pinzas flameadas, coloque el cubreobjetos sobre el agar y revisar que el conjunto quede perfectamente sobre el triángulo de vidrio.
5. Adicionar al fondo de la caja de Petri el glicerol al 10% (5-10 mL) en la caja de Petri, procurando no mojar el microcultivo y tapar.
6. Etiquetar la caja y incubar a temperatura ambiente, por 7 días, teniendo cuidado de que siempre tenga glicerol al 10%.

B. Observación del dermatofito.

1. Transcurrido el tiempo de incubación (la siguiente sesión), se observarán al microscopio las preparaciones fijas de hongos. Para ello, en presencia del mechero se debe extraer con una pipeta todo el glicerol al 10% (colocándolo en un vaso de precipitado adecuado) e inactivar el microcultivo 30 minutos antes de la lectura colocando formaldehído al 10% a la caja del microcultivo. Con ayuda de las pinzas de disección, separar la laminilla cubreobjetos del microcultivo.
2. Colocar una gota de azul de algodón sobre un portaobjetos limpio y colocar sobre la gota del colorante el cubreobjetos con la muestra del hongo. Observar a 10x y 40x e identificar las estructuras reproductivas del hongo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	38 de 155

3. Se debe desechar el glicerol al 10% y la caja del Petri del microcultivo con el medio de PDA conforme a las instrucciones del profesor.

RESULTADOS

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

CUESTIONARIO

- 1) ¿A qué se le denomina querion de Celso?
- 2) Mencione 4 agentes etiológicos de la onicomicosis y manifestaciones clínicas.
- 3) Menciona otros 3 métodos para el diagnóstico de dermatofitosis.
- 4) Mencione 3 tinciones para el diagnóstico de dermatofitosis.
- 5) ¿Para qué sirve el glicerol al 10% y cual es la finalidad de agregar formaldehido al 10%?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonifaz, J.A. (2020). Micología médica básica (6ª ed.) McGraw Hill.
- Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).
- Kumate Rodriguez, J; Trujillo G. G; Hernández O. M. (2016). Infectología clínica. México: Méndez editores.
- Murray R. P; Rosenthal S. K; Pfaller A. M. (2021). Microbiología médica. España: Elsevier.
- Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.
- Walker T.S. (2006). Microbiología (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	39 de 155

Toma de muestra y aislamiento de heridas infectadas.

OBJETIVO

- Conocer y realizar las técnicas de toma de muestra de heridas infectadas e identificar a las bacterias implicadas en la génesis de las heridas infectadas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Infección de heridas

La infección localizada se manifiesta a menudo con los signos y síntomas clásicos de la inflamación (dolor, calor, tumefacción, rubor e impotencia funcional). Sin embargo, y en especial en las heridas crónicas, las bacterias pueden causar problemas, como por ejemplo un retraso (o detención) de la cicatrización.

El diagnóstico de infección de una herida se basa principalmente en criterios clínicos. La valoración debe comprender la evaluación del paciente, de los tejidos que rodean la herida y de la propia herida en busca de signos y síntomas de infección, así como de factores que probablemente aumenten el riesgo y la gravedad de la infección. La incorporación de la evaluación de una posible infección al cuidado habitual de las heridas facilitará la detección precoz y el consiguiente tratamiento.

Riesgo de infección

El riesgo de infección de una herida aumenta en presencia de cualquier factor que debilite al paciente, altere su resistencia inmunitaria o disminuya la perfusión tisular.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	40 de 155

Factores que incrementan el riesgo de infección de una herida		
Enfermedades concomitantes	Medicación	Factores psicosociales
Diabetes mellitus, inmunosupresión, hipoxia/hipoperfusión tisular secundaria anemia o enfermedad arterial/cardíaca/respiratoria, insuficiencia renal, cáncer, artritis reumatoide, obesidad, desnutrición.	Corticoesteroides Citotóxicos Inmunodepresores	Hospitalización Escasa higiene personal Hábitos insalubres

Microorganismos más comunes en una herida infectada.

Entre las especies bacterianas que frecuentemente se pueden encontrar en lesiones de piel se encuentran:

1. Estafilococos produciendo necrosis rápida y supuración con gran cantidad de pus amarillo cremoso.
2. Estreptococos beta hemolíticos del grupo A tienden a diseminarse rápidamente causando edema intenso y eritema, poca necrosis y exudados de escasa consistencia con aspecto de suero.
3. Bacterias anaerobias producen necrosis y pus abundante, de color pardo y olor fétido.

Los *Staphylococcus* coagulasa negativos son *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. El primero es parte de la flora normal de la piel, aparato respiratorio y gastrointestinal, pero produce infecciones nosocomiales, de prótesis, de catéteres, bacteriemias, endocarditis, infección de heridas quirúrgicas y del tracto urinario, infecciones del sistema nervioso central, oftalmológicas y de tejidos blandos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	41 de 155

Staphylococcus saprophyticus produce infecciones de vías urinarias como uretritis y prostatitis e infecciones de heridas.

Diagnóstico

El cultivo se hace en agar sangre de carnero, agar *Staphylococcus* 110 (S-110), agar nutritivo, agar manitol sal, caldo nutritivo, caldo con infusión de cerebro y de corazón, etc. De estos, preferimos el agar sangre de carnero, el agar *Staphylococcus* 110 y el agar manitol sal.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.
- Peróxido de hidrógeno.
- Caja de Agar sangre.
- Caja de Agar MacConkey.
- Caja de Agar sal manitol.
- Caja de Agar cefrimida (1 por grupo).

CEPAS

- *Staphylococcus aureus*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Clostridium spp.* (en caldo tioglicolato).
- *Bacteroides spp.* (en caldo tioglicolato).

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	42 de 155

PROCEDIMIENTO

1. Por el reverso, dividir las cajas con los medios de cultivo por la mitad con un lápiz grasoso el medio de agar sangre.
2. Respetando la técnica aséptica, sembrar por la técnica de estría cruzada o de aislamiento las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* en la caja de agar sangre.
3. Sembrar por la técnica de estría cruzada o de aislamiento la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en el medio MacConkey.
4. Se sembrar por la técnica de estría cruzada o de aislamiento la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en la caja de agar cetramida (1 por grupo).
4. Realizar frotis y tinción de Gram de cada una de las diferentes cepas y observar al microscopio a 10x y 40x.
5. Realizar la prueba de coagulasa y catalasa con la cepa de *Staphylococcus aureus*.
6. Etiquetar las cajas e incubar a 37°C por 24 horas y leer resultados.

RESULTADOS

Reportar la morfología colonial y microscópica de los diferentes cultivos, reportar el resultado de las pruebas.

CUESTIONARIO

- 1) Menciona 5 bacterias que puedan infectar una herida
- 2) Menciona el fundamento de los medios de cultivo utilizados en esta práctica.
- 3) ¿Cuáles son los desinfectantes y antisépticos útiles para el aislamiento y cultivo de microorganismos que infectan una herida?
- 4) ¿Cuál es el procedimiento a seguir en caso de encontrar una herida infectada?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	43 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brooks Geo F; Carroll K C; Butel J S; Morse S A; Mietzner T. (2011). Microbiología Médica. España: McGraw-Hill.

Jawetz, Melnick y Adelberg. (2016). Microbiología médica. España: McGraw.Hill.

Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.

Rubio Póo, C; Skromne Kadlunik, D; Kravsov Jinich, J. (2010). Farmacología modular. España: McGraw-Hill.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	44 de 155

Observación de *Leishmania mexicana* y otras especies.

OBJETIVOS

- Describir las características morfológicas de las formas del género *Leishmania* en su ciclo biológico e identificación microscópica.
- Identificar los procedimientos para el diagnóstico microbiológico de acuerdo a las formas clínicas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los agentes etiológicos de las leishmaniasis son protozoarios hemoflagelados intracelulares obligados de familia Trypanosomatidae del género *Leishmania*, morfológicamente idénticos entre sí, pero al utilizar técnicas de biología molecular se clasifican en:

- a) Complejo *Leishmania donovani* con 3 especies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* y *Leishmania chagasi* estas causan Leishmaniasis Visceral (LV) sinónimos Kala azar, fiebre negra, fiebre Dum Dum.
- b) Complejo *Leishmania mexicana* con dos especies *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* causan Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) ó “úlceras de los chicheros” y se relaciona con Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) o Espúndia o Uta y con Leishmaniasis cutánea difusa (LCD) o Leishmanoide cutáneo o Leishmaniasis anérgica.
- c) *Leishmania tropica*, *Leishmania major* y *Leishmania aethiopica* causantes de LC ó “Botón de Oriente”.
- d) Subgénero *Viannia* (V) con 4 especies *Leishmania* (V) *braziliensis*, *Leishmania* (V) *guyanensis*, *Leishmania* (V) *panamensis* y *Leishmania* (V) *peruviana* causan LMC. La identificación de todas estas especies se basa en isoenzimas, antígenos y ácidos nucleicos.

Las especies causantes de Leishmaniasis en México son *Leishmania* (L) *mexicana*, *Leishmania* (V) *braziliensis* causantes de LC forma localizada (LCL) mas frecuente en



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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	45 de 155

México 99%, *Leishmania infantum* causa LV y *Leishmania* (V) *braziliensis*, *Leishmania* (V) *panamensis*, *Leishmania* (V) *guyanensis*, *Leishmania* (V) *peruviana* causa LMC, abundan en norte, centro, sureste de República Mexicana, América central y América del sur. La OMS considera a Leishmaniasis como zoonosis endémica y una de las 6 enfermedades tropicales de mayor importancia.

Se observa fase de amastigote en tejidos a nivel de macrófagos, células endoteliales y leucocitos polimorfonucleares y vísceras de huésped y mamíferos reservorios en América roedores y cánidos, marsupiales. La fase de promastigote se encuentra en medios de cultivo como NNN, Snekjie y RPMI 1640 así como en el tubo digestivo de insectos vectores mosco hembra hematófago antropofílico *Phlebotomus ssp.* en Europa y en América Lutzomyia.

Método diagnóstico	LCL	LCD	LMC	LV
Impronta	++	++++	++	NR
Biopsia	++	++++	++	++++
Extendido de medula ósea	NR	NR	NR	+++
Aislamiento en animales y medios de cultivo	+++	++++	++	++
Serología	++	++++	++	++++
Intradermorreacción	++++	Negativo	+++	Negativo

NR = no se realiza; ++ = sensibilidad del 50 - 60 %, +++ = sensibilidad del 60 – 90 %, +++++ = sensibilidad del 90 -100 % (valor diagnóstico importante).

Fuente: Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. INDRE. (2019) Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la leishmaniasis. México, 2019. Pag. 35. En:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487575/LVL_Leishmania_2019_4T.pdf



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	46 de 155

MATERIAL Y REACTIVOS

- Microscopio.
- Papel seda.
- Aceite de inmersión.
- Preparaciones fijas de bazo con amastigotes de *Leishmania donovani*.
- Preparaciones fijas de frotis sanguíneo para la búsqueda de promastigotes.

SERVICIOS

- Agua y Luz.

PROCEDIMIENTO

1. Observar las preparaciones al microscopio a 4x, 10x y 40x una vez localizado el campo de interés se podrá observar a 100x usando el aceite de inmersión (solo con supervisión del profesor).
2. Limpiar el lente 100x con el papel seda cuidadosamente para no dejar ningún residuo. Si es necesario limpiar la preparación fija con papel seda para quitarle el aceite de inmersión.

RESULTADOS

Se sugiere reportar los resultados observados mediante el cuadro que se muestra a continuación. Explique detalladamente la importancia de conocer la fase infecciosa y fase de réplica (causa cuadro clínico) de la Leishmaniasis, así como el ciclo biológico del huésped definitivo y del huésped intermediario De acuerdo a las formas clínicas de Leishmaniasis: Visceral, mucocutánea, cutánea localizada y diseminada esquematice ruta de diagnóstico microbiológico.

Tipo de laminilla	Observación microscópica	Esquema
Tejido	Describir las características de la fase parasitaria	Señale con flechas las características observadas.
Frotis	Describir las características de la fase parasitaria	Señale con flechas las características observadas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	47 de 155

CUESTIONARIO

- 1) Mencione el cuadro clínico de la úlcera de los chicleros.
- 2) Describa aspectos morfológicos del amastigote y promastigote de *Leishmania*.
- 3) Explique detalladamente el ciclo biológico del parásito.
- 4) Menciones los métodos de diagnóstico directos e indirectos para leishmaniasis.
- 5) ¿En qué consiste la prueba de Leishmanina y en qué tipo clínico de leishmaniasis es útil?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Becerril Flores, M. A. (2014). Parasitología médica. España: McGraw.Hill.

Hernández-Rivera, M. P., Hernández-Montes, O., Chiñas-Pérez, A., Batiza-Avelar, J. M., Sánchez-Tejeda, G., Wong-Ramírez, C., Monroy-Ostria, A. (2015). Study of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche (Yucatan Peninsula), Mexico, over a period of two years. *Salud Pública de México*, 57(1), 58-65. Recuperado en 12 de marzo de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342015000100009&lng=es&tlng=en.

Prats Pastor, G. (2013). Microbiología y parasitología médica. Argentina: Médica Panamericana.

Rodríguez Pérez, E. G. (2013). Parasitología médica. Colombia: Manual moderno.

Secretaría de Salud (2014) . Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. NOM-032-SSA2-2014. En: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/NOM_032_SSA_2_2014.pdf

Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. INDRE. (2019) Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la leishmaniasis. México, 2019. En: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487575/LVL_Leishmania_2019_4_T.pdf



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	48 de 155

Módulo 2. Respiratorio.

Identificación de *Streptococcus* y *Neumococcus* en el aparato respiratorio.

OBJETIVO

- Conocer de manera general las características del género *Streptococcus* y diferenciar entre las especies *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* a través de los patrones de hemólisis obtenidos en cultivos en agar sangre y el empleo de otras pruebas como la identificación de cápsula.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las infecciones respiratorias agudas tienen una incidencia muy elevada en todas las edades, constituyen el principal motivo de consulta en todos los países y en todos los estratos socioeconómicos. Entre las bacterias que causan infecciones respiratorias agudas de forma primaria, se reconoce al género *Streptococcus*, en especial al grupo A como el más frecuente en rinofaringitis y faringoamigdalitis purulenta.

Como género, estos microorganismos, se caracterizan por tener una forma redondeada, que oscila entre 0.5 a 1 micra de diámetro, se pueden encontrar como cocos aislados, en pares o formando cadenas, se distinguen por ser anaerobios facultativos y catalasa negativos.

La gran mayoría de los *Streptococcus*, se distinguen por la producción de una gran variedad de toxinas y enzimas extracelulares, siendo un rasgo distintivo la producción de hemolisinas con las que efectúan reacciones hemolíticas (hemólisis a,b, o g) en cultivos enriquecidos con sangre.

Algunos microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* pueden presentar cápsulas polisacáridas que le confieren un aspecto mucoso a las colonias que se desarrollan sobre el agar, y son lisados con facilidad por agentes tensoactivos, por ejemplo, las sales biliares.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	49 de 155

Parte de las características antes mencionadas pueden emplearse como fundamentos para una clasificación; sin embargo, la agrupación de las diferentes especies en los grupos actualmente conocidos, fue establecida en 1930 por Rebeca Lancefield, quien emplea antígenos específicos de la pared celular como base para dicha clasificación.

Nombre	Grupo Lancefield	Hemólisis
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	Beta
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	Beta
<i>Enterococcus faecalis</i> y otros	D	Ninguna Alfa
<i>Streptococcus bovis</i>	D	Ninguna Alfa
<i>Streptococcus anginosus</i>	No tipificable A (C, F, G)	Alfa Beta
<i>Streptococcus viridans</i> multiples especies	Intipificable	Alfa
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ninguna	Alfa
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	Ninguna	Alfa

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.
- Tinta china
- 2 cajas de Agar sangre.
- 2 tubos de caldo latosa + rojo de fenol.
- 2 tubos de caldo sorbitol + rojo de fenol.
- 2 tubos de caldo inulina + rojo de fenol.
- 2 tubos de caldo glucosa + rojo de fenol.
- 1 tubo con desoxicolato de sodio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	50 de 155

CEPAS

- *Streptococcus pyogenes*.
- *Streptococcus pneumoniae*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, sembrar por estría cruzada o de aislamiento la cepa *Streptococcus pyogenes*, en un medio de cultivo Agar sangre.
2. Respetando la técnica aséptica, sembrar por estría cruzada o de aislamiento la cepa *Streptococcus pneumoniae*, en un medio de cultivo Agar sangre.
3. Respetando la técnica aséptica, tomar una asada de la cepa de *Streptococcus pyogenes* y sembrar por agitación en el medio líquido que contiene lactosa con rojo de fenol.
4. Tomar una asada de la cepa de *Streptococcus pyogenes* y sembrar por agitación en el medio líquido que contiene sorbitol con rojo de fenol.
5. Tomar una asada de la cepa de *Streptococcus pyogenes* y sembrar por agitación en el medio líquido que contiene glucosa con rojo de fenol.
6. Seguir el mismo procedimiento con la cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
7. Tomar una asada de la cepa de *Streptococcus pneumoniae* e inocular el tubo con desoxicolato sódico.
8. Etiquetar las cajas y los tubos e incubar a 37 °C durante 24 hrs.
9. Realizar frotis y tinción de Gram para cada cepa y observar al microscopio a 10x y 40x (Observación a 100x solo con supervisión del profesor). Desechar los frotis.
10. Realizar tinción de tinta china para *Streptococcus pneumoniae* con la finalidad de observar la cápsula.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	51 de 155

RESULTADOS

Observar y describir cuidadosamente la morfología colonial y microscópica de los diferentes cultivos, reportar el resultado de las pruebas bioquímicas.

CUESTIONARIO

- 1) Explique la importancia de la proteína M para el género *Streptococcus*.
- 2) Explique la importancia que tienen los cultivos en agar sangre en la clasificación del género *Streptococcus*.
- 3) ¿Cuáles son y qué efecto que tienen las estreptolisinas en los tejidos del hombre?
- 4) ¿Cuál es la importancia clínica de la identificación de *Streptococcus pneumoniae*?
- 5) Mencione otras técnicas de tinción para demostración de cápsula.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).
- MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.
- Murray R. P; Rosenthal S. K; Pfaller A. M. (2021). Microbiología médica. España: Elsevier.
- Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.
- Walker T.S. (2006). Microbiología (2ª ed.). McGrawHill Interamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	52 de 155

Exudado faríngeo y nasal.

OBJETIVO

- Identificar los microorganismos causantes de las infecciones respiratorias mas comunes de tipo bacteriano mediante el empleo de la técnica de laboratorio conocida como exudado faríngeo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El estudio del exudado faríngeo es importante para el diagnóstico de ciertas infecciones del aparato respiratorio, no obstante el aislamiento e identificación de microorganismos patógenos en estas regiones suele presentar algunos problemas debido a la existencia de una flora normal abundante que incluye aproximadamente 200 especies, muchas de ellas consideradas oportunistas con potencial patógeno e incluso patógenos definidos; por lo que el esquema de aislamiento debe incluir tanto microorganismos gramnegativos como grampositivos, además de hongos.

Para la obtención de buenos resultados, es recomendable la toma de muestra antes del inicio del tratamiento antimicrobiano y es de vital importancia la adecuada toma de la misma, para lo cual se recomienda sea de los sitios que tengan mayor afectación como los que presentan enrojecimiento o pus (en el caso de la orofaringe), tomando precauciones como la de no contaminar la muestra tocando lengua, labios u otro anexo de la cavidad bucal.

La toma de muestra deberá realizarse en el laboratorio, pero si no fuera posible, entonces deben emplearse medios de transporte como el medio Stuart, que aseguran la viabilidad de los microorganismos hasta que sea posible la siembra en los medios adecuados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	53 de 155

Microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia en la faringe de personas sanas

Streptococcus beta hemolítico del tipo A.

Streptococcus alfa hemolítico.

Branhamella catarrhalis.

Neisserias.

Staphylococcus epidermidis.

Staphylococcus aureus.

Haemophilus haemolyticus.

Haemophilus influenzae.

Diplococcus pneumoniae.

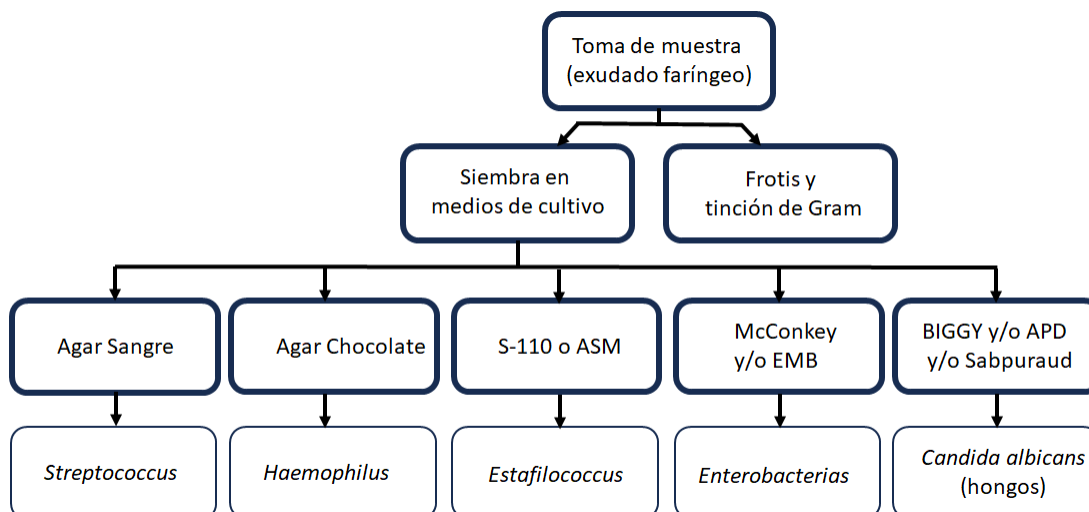
Bacilos difteroides.

Bacilos coliformes (Gram -).

Levaduras (Cándida albicans).

Debe tenerse presente que la importancia de los microorganismos como responsables de una infección está relacionada con su abundancia en el exudado que se estudia.

Medios de cultivos mas comunes utilizados en exudado faríngeo





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	54 de 155

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Abatelenguas.
- Hisopos estériles.
- Caja de Agar sangre.
- Caja de Agar S-110
- Caja de Agar MacConkey.
- Tubo con Agar Biggy.
- Tubo con caldo Cerebro corazón infusión agar (B.H.I.)
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Humedecer dos hisopos estériles en caldo cerebro corazón y pedir al paciente que abra la boca.
2. Deprimir la lengua con un abatelenguas estéril.
3. Juntando ambos hisopos, proceder a la toma de muestra, realizando un raspado suave de cualquier área que manifieste signos de inflamación (exudados o úlceras) procurando no tocar la lengua, labios ni los otros anexos de la cavidad bucal del paciente (Figura 1).
4. Con uno de los hisopos, realizar un frotis y proceder a teñirlo con la técnica de Gram y observar al microscopio a 10x y 40x (Observación a 100x solo con supervisión del profesor). Desechar los frotis.
5. Con el otro hisopo, realizar la descarga del inóculo en los diferentes medios de cultivo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	55 de 155

6. Con ayuda de un asa bacteriológica, realizar la distribución del inóculo empleando la técnica de estría cruzada o estría de aislamiento. Recordando respetando la técnica aséptica.
7. Incubar los diferentes medios por un periodo comprendido entre 24 y 48 horas a 37 °C. Es importante que las placas de agar sangre se observen a las 24 horas para observar los patrones de hemólisis.

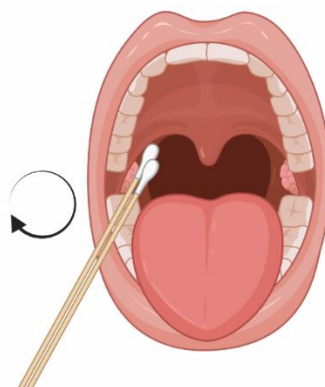


Figura 1. Toma de muestra para exudado faríngeo.

RESULTADOS

Reportar la morfología colonial, el tipo de hemólisis de los diferentes cultivos y la morfología microscópica. Importante guardar los cultivos en refrigeración para la siguiente sesión.

CUESTIONARIO

- 1) Describa el procedimiento para la toma de la muestra del exudado faríngeo.
- 2) Mencione a los virus y bacterias que ocasionan rinofaringoamigdalitis.
- 3) Explique la importancia de realizar los frotis y tinciones de la muestra.
- 4) Explique el método de siembra para aislamiento en placas.
- 5) Explique el procedimiento para la toma de la muestra en el caso de los géneros *Haemophilus* o *Bordetella*.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	56 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.

SCIELO. (2002). Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Venezuela: Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Recuperado el 15 Enero de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	57 de 155

Identificación de microorganismo del exudado faríngeo.

OBJETIVO

- Identificar mediante pruebas bioquímicas y especiales, el género y especie de los microorganismos aislados en los cultivos procedentes del exudado faríngeo de la sesión anterior.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Tanto para la confirmación de género como para la identificación de las principales especies de importancia clínica, resulta de vital importancia el estudio de las características metabólicas en los microorganismos a estudiar, lo cual es llamado con frecuencia estudio bioquímico o pruebas bioquímicas. Estas pruebas se realizan generalmente en tubo y se eligen a partir de las características del microorganismo que se han obtenido de los cultivos en placa y de las tinciones realizadas de colonias aisladas; comprenden una amplia gama, dentro de las cuales destacan las que se emplearán en esta sesión: TSI, SIM, prueba de fermentación de carbohidratos, citrato de Simmons y caldo urea.

Adicional a las pruebas bioquímicas, suelen emplearse las llamadas pruebas especiales, que son todas aquellas pruebas que no necesariamente arrojan información sobre el metabolismo del microorganismo, sino que también pueden distinguir un aspecto morfológico o estructural. Un ejemplo de estas lo constituye la tumefacción de la cápsula, mejor conocida como prueba de Quellung; sin embargo, su función principal junto con las tinciones es brindar una visión más completa que abarque aspectos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que orienten al profesional a una buena identificación de los microorganismos.

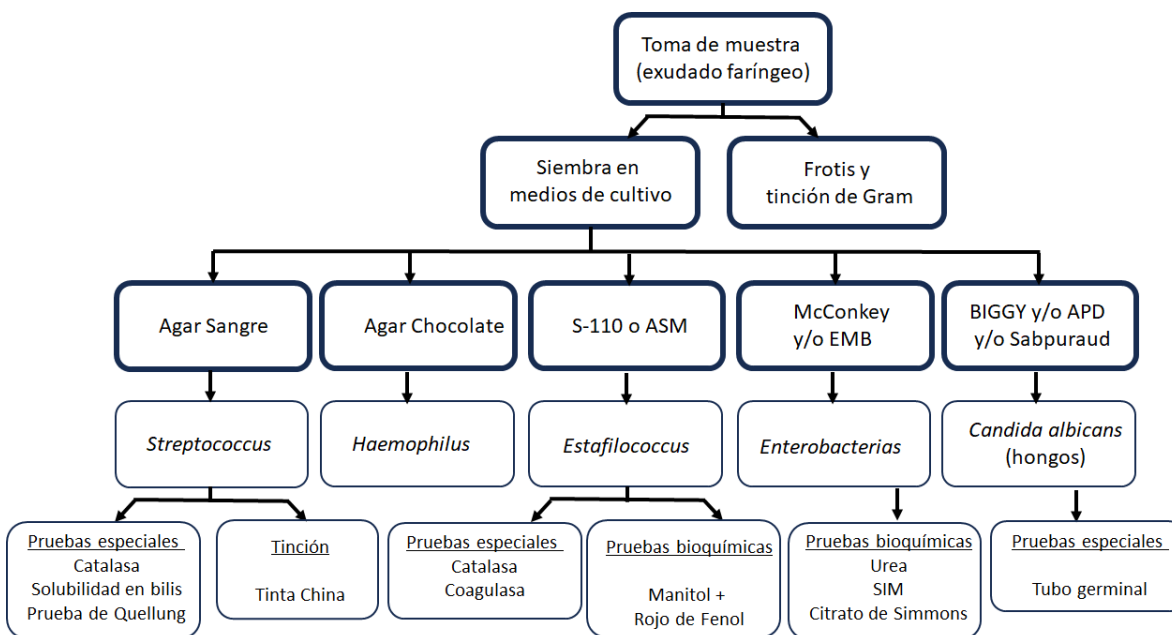
Una vez establecida la identidad del microorganismo causal de la enfermedad, es importante realizar pruebas de susceptibilidad a los diferentes antibióticos, para así poder brindar al paciente el tratamiento adecuado y evitar que se propague aún más la resistencia



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	58 de 155

microbiana que ya constituye un serio problema de salud. Para esta evaluación, se utilizan discos de papel impregnados con los fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos Gram positivos y Gram negativos, que tras ser colocados en medios inoculados masivamente con la cepa en cuestión permiten observar en pocas horas (24 – 48 horas) la acción de los fármacos por la formación de los llamados halos de inhibición (espacios sin crecimiento bacteriano), en los que dependiendo del diámetro se observa la eficacia del fármaco.

Pruebas bioquímicas y especiales a partir de los cultivos



Nota: Se recomienda realizar tinción de Gram después de obtener desarrollo en las placas de agar, pues esto ayudará a la elección de las pruebas bioquímicas y especiales.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Sensidiscos impregnados con antibióticos para Gram positivo y para Gram negativo.
- Porta y cubre objetos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	59 de 155

- Microscopio.
- Tinta china.
- Tubo con medio SIM.
- Tubo con caldo manitol rojo de fenol.
- Tubo con caldo urea.
- Tubo con Citrato de Simmons.
- Caja de agar cerebro corazón.
- Tubo de ensaye para obtener plasma citratado.
- Caja de agar cerebro corazón.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Alcohol ácido, Fucsina de Ziehl y Azul de metileno.
- Cultivos de la sesión anterior.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

- A. A partir de los cultivos obtenidos de la sesión anterior revisar la morfología colonial e identificar colonia prototipo.
- B. En caso de crecimiento en los medios de cultivo S110 o Agar Sal Manitol (selectivos para Staphylococcus).
 1. Tomar una asada partiendo de una colonia aislada identificada, realizar un frotis y teñir con coloración de Gram, y observar al microscopio a 10x y 40x (Observación a 100x solo con supervisión del profesor). Desechar los frotis.
 2. Tomar otra asada y realizar prueba de catalasa en portaobjetos.
 3. Tomar otra asada y realizar prueba de coagulasa libre en el plasma citratado. (Leer resultados cada 4 horas por 24 horas y reportar los resultados obtenidos).
 4. Del medio con Agar Sangre, reportar la observación realizada a las 24 horas de incubación, las características morfológicas de las colonias, así como el tipo de hemólisis.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	60 de 155

C. En caso de existir crecimiento de colonias EMB y MacConkey (selectivos para enterobacterias).

1. Tomar una asada partiendo de una colonia aislada identificada e inocular por agitación en el medio líquido caldo urea.
2. Tomar una asada partiendo de una colonia aislada identificada y sembrar por picadura en el medio de SIM con un asa recta, teniendo la precaución de no tocar el fondo del tubo.
3. Tomar una asada partiendo de una colonia aislada identificada e inocular por estría y picadura el medio TSI.
4. Tomar una asada partiendo de una colonia aislada identificada e inocular la prueba de citrato de Simmons solo con estría el pico de flauta.

D. Prueba de sensibilidad a antibióticos

1. De una de las cajas con medio de cultivo en donde hubo desarrollo de colonias aisladas, tomar una asada y realizar una siembra masiva el medio Agar cerebro corazón o Mueller Hinton.
2. Colocar los discos impregnados con antibióticos para Gram positivos o negativos.

E. Etiquetar todas las cajas y los tubos e incubar los cultivos a 37 °C durante 48 horas.

RESULTADOS

Reportar la morfología colonial obtenida en cada cultivo, reportar los resultados obtenidos en la tinción de Gram, las pruebas especiales y las pruebas bioquímicas. Reportar los resultados indicando la inhibición (sensibilidad) o de resistencia de cada uno de los antibióticos.

CUESTIONARIO

- 1) Mencione las características morfológicas, de tinción, cultivo y pruebas específicas para la identificación del Género *Streptococcus*.
- 2) Mencione Las características morfológicas de tinción y de crecimiento para la identificación de *Haemophylos influenzae*.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	61 de 155

- 3) Mencione dos medios de cultivo selectivos y dos diferenciales para el crecimiento e identificación de enterobacterias.
- 4) Explique en qué consiste la prueba del Indol en el medio SIM y en que momento se considera positiva.
- 5) Explique en qué consiste la prueba de la Urea y cuando se considera positiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).
- MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.
- Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.
- SCIELO. (2002). Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Venezuela: Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Recuperado el 15 enero de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	62 de 155

Identificación de *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVO

- Identificar las principales características morfológicas y de tinción del género *Mycobacterium* a través de la realización de la técnica de tinción de Ziehl Neelsen y la siembra en medios de cultivo para el aislamiento del género.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La tuberculosis es una enfermedad causada por una bacteria (micobacteria) del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* que suele afectar pulmones y hasta en un 33% de los casos otros órganos.

El miembro causante de la tuberculosis, pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*; es una bacteria aerobia, no esporógena, bacilar que mide 0.5 por 3 mm. Se distingue por no captar con facilidad los colorantes, pero una vez teñidos, resisten la decoloración con alcohol ácido, razón por la cual reciben el nombre de bacilos ácido alcohol resistentes. La resistencia a la decoloración es debida a los lípidos estructurales de las membranas que forman la pared de estos microorganismos.

Respecto a su crecimiento, las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* generalmente aparecen en medio de huevo coagulado después de 2 a 3 semanas de incubación a 35°C, no ocurre crecimiento a 25 o 45 °C. Al principio el crecimiento aparece como colonias pequeñas (1 a 3 mm), secas, friables, rugosas, con color ante. Después de varias semanas incrementan su tamaño logrando alcanzar hasta 8 mm y las colonias presentan bordes irregulares aplanados y un centro en forma de coliflor.

En el año 2021 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporto que un total de 1, 6 millones de personas murieron de (todas las formas, pulmonar y extrapulmonar) en ese año. Además 10,6 millones de personas (6 millones de hombres y 3,4 millones de mujeres) enfermaron de tuberculosis en 2021.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	63 de 155

El mecanismo fundamental de transmisión de la tuberculosis es por vía respiratoria ya que el bacilo de la tuberculosis se transmite mediante pequeñas partículas de menos de 10 micras emitidas al estornudar, hablar o toser. Con la tos pueden emitirse unas 3.000 partículas potencialmente infecciosas, igual número puede eliminarse al hablar 5 minutos y muchas más al estornudar.

Cada una de estas partículas infecciosas suele contener una o pocas bacterias que pueden permanecer viables suspendidas en el aire durante varios minutos, permitiendo que el contagio se realice incluso en ausencia del individuo fuente de la infección, especialmente si la habitación donde estuvo ha permanecido cerrada y sin luz solar, ya que *Mycobacterium tuberculosis* es sensible a la acción de la luz ultravioleta. La mayoría de los pacientes tuberculosos excretan pocos bacilos, por lo que generalmente se requiere un contacto continuo y fundamentalmente la convivencia domiciliaria, para infectarse.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Aceite de inmersión.
- Tinta china.
- Colorantes para tinción de Ziehl-Neelsen: Alcohol ácido, Fucsina de Ziehl y Azul de metileno.
- Peróxido de hidrógeno.
- Tripie.
- Pinzas de disección.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	64 de 155

CEPAS

- *Mycobacterium spp.*

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, observar la morfología colonial e identificarla, tomar una asada de la cepa *Mycobacterium spp.* y hacer un frotis.
2. Realizar una tinción con la técnica de Ziehl Neelsen y observar al microscopio a 4x, 10x y 40x una vez localizado el campo de interés se podrá observar a 100x usando el aceite de inmersión (solo con supervisión del profesor).
3. Respetando la técnica aséptica, tomar una asada de la cepa *Mycobacterium spp.* y realizar la prueba de la catalasa.

RESULTADOS

Reportar la morfología observada en la tinción de Ziehl Neelsen, los resultados de las pruebas especiales (catalasa).

CUESTIONARIO

- 1) Describa las características morfológicas del género *Mycobacterium* complejo tuberculosis.
- 2) Mencione dos medios de cultivo, así como su contenido, para el aislamiento del Género *Mycobacterium* complejo tuberculosis.
- 3) Describa una técnica para la toma de la muestra bronquial.
- 4) Describa la técnica de tinción de Ziehl Neelsen.
- 5) Describa el fundamento de las tinciones fluorescentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koneman, E. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. (5ª edición).
- MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	65 de 155

Prats Pastor, G. (2013). Microbiología y parasitología médica. Argentina: Médica Panamericana.

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	66 de 155

Módulo 3. Cardiovascular, Linfático y Hematopoyético.

Observación de preparación de *Plasmodium*.

OBJETIVOS

- Conocer los diferentes estadios del género *Plasmodium* e identificarlos a través de preparaciones fijas.
- Identificar y comprender los elementos importantes para el diagnóstico de paludismo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El paludismo es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo y, con excepción de la tuberculosis, es la que más decesos provoca cada año. El microorganismo que produce el paludismo es un protozooario del género *Plasmodium* perteneciente al phylum Apicomplexa. La característica que lo distingue es la compleja disposición de estructuras apicales conocidas como roptrias y micronemas, las cuales participan en la entrada del parásito a su célula blanco y desaparecen en las etapas que no son invasivas. Hasta la fecha se conocen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan a mamíferos, aves y réptiles.

Ciclo biológico

El paludismo, enfermedad que afecta al hombre, se debe a cuatro especies del género *Plasmodium*: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium falciparum*, esta última causante de las formas más graves de la enfermedad. Este parásito tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre dos huéspedes: un vertebrado (hombre), donde se observan dos tipos de ciclos asexuales; y un mosquito (hembra, del género *Anopheles*), en donde se lleva cabo el ciclo sexual. Tras la picadura de un individuo infectado con *Plasmodium* se continúa su desarrollo en el intestino y glándulas salivales del mosquito, hasta que se preparan para infectar al siguiente huésped. El paludismo también se puede transmitir por medio de transfusiones de sangre y jeringas infectadas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	67 de 155

Manifestaciones clínicas

Las infecciones por *Plasmodium* pueden inducir desde parasitemias asintomáticas hasta enfermedades con resultados fatales, vinculada a *Plasmodium falciparum*. Las manifestaciones clínicas de paludismo son los síntomas típicos de un resfriado, acompañados de fiebre y escalofrío que ocurren cada 48 horas. Esto ocurre como consecuencia de una lisis de los eritrocitos infectados al final del ciclo eritrocítico. Entre las complicaciones mayores de la enfermedad se encuentran anemia grave, paludismo cerebral, complicaciones metabólicas, insuficiencia renal, edema pulmonar y paludismo maternal.

Diagnóstico

La forma más utilizada para el diagnóstico del paludismo es la técnica del frotis de sangre, teñido con Giemsa y se observa al microscopio. Mediante el análisis morfológico de los parásitos presentes en las muestras se puede diagnosticar la especie.

Para mejorar la detección del parásito en un frotis se añaden colorantes fluorescentes como el naranja de acridina y la purina de benzocarboxilo, que tienen afinidad por los ácidos nucleicos. Otras técnicas utilizadas recientemente son la reacción en cadena de la polimerasa, tira reactiva (Dipstick), inmunocromatografías ICT-Malaria, OptiMAL y Determine. Estos métodos son muy efectivos sólo para *Plasmodium falciparum*.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Aceite de inmersión.
- Preparaciones fijas de *Plasmodium spp.*
- Papel seda.

SERVICIOS

- Agua y Luz.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	68 de 155

PROCEDIMIENTO

1. Observar las preparaciones al microscopio a 4x, 10x y 40x una vez localizado el campo de interés se podrá observar a 100x usando el aceite de inmersión (solo con supervisión del profesor).
2. Limpiar el lente 100x con el papel seda cuidadosamente para no dejar ningún residuo. Si es necesario limpiar la preparación fija con papel seda para quitarle el aceite de inmersión.

RESULTADOS

Realizar un registro de los estadios identificados y hacer descripción morfológica de lo observado, además de esquemas.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuáles son las características generales del agente causal?
- 2) ¿Cómo es su ciclo biológico?
- 3) ¿Cuáles son las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad? ¿Cuál es la especie de parásito que produce las formas más graves de paludismo y por qué?
- 4) ¿Cuál es el medicamento suministrado para eliminar las formas hepáticas de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*?
- 5) ¿Qué medidas profilácticas podrían aplicarse en México para eliminar los casos de paludismo?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Becerril Flores, M. A. (2014). Parasitología médica. España: McGraw.Hill.
- Bonifaz, J.A. (2020). Micología médica básica (6ª ed.) McGraw Hill.
- Jawetz, Melnick y Adelberg. (2016). Microbiología médica. España: McGraw.Hill.
- Mims C. A; Playfair J. H. L; Kobayashi G. S; Thompson J. H. (2013). Microbiología médica. Países Bajos: Elsevier.
- Murray R. P; Rosenthal S. K; Pfaller A. M. (2021). Microbiología médica. España: Elsevier.



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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	69 de 155

Prats Pastor, G. (2013). Microbiología y parasitología médica. Argentina: Médica Panamericana.

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.

Tay Zavala, J; Gutierrez M; Lara R; Velasco O. (2010). Parasitología médica. México: Méndez editores.

Tortora G. J; Funke B. R; Case C. L. (2017). Introducción a la microbiología. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	70 de 155

Observación de *Trypanosoma*.

OBJETIVOS

- Identificar microscópicamente los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* mediante la observación al microscopio de preparaciones fijas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La enfermedad conocida como tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, constituye un gran problema de salud en casi todo el continente americano, en donde existen de 16 a 18 millones de personas infectadas, se estima que alrededor de 100 millones están en riesgo de contraer la afección.

Carlos Chagas aisló por primera vez el agente causal en un paciente humano y en 1909 describió el cuadro clínico del trastorno, denominado en su honor como enfermedad de Chagas.

En México existen varios centros de investigación que siguen detectando casos humanos de la enfermedad, así como reservorios infectados y transmisión por transfusiones sanguíneas. Se considera como probable área endémica todo territorio que se encuentre entre cero y 1800 metros sobre el nivel del mar, es decir, que más de las tres cuartas partes del territorio nacional son endémicas.

El *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad, es un protozooario flagelado de la clase Zoomastigophora. Posee un ciclo complejo que incluye tres fases morfológicas comprendidas en dos huéspedes: el vector invertebrado y el huésped mamífero. Entre los estadios básicos se definen otros intermedios que aumentan la complejidad del ciclo. Los estadios se definen por su forma y disposición del cinetoplasto respecto del núcleo y la región por donde emerge el flagelo: promastigote, epimastigote, amastigote y tripomastigote (metacíclico o sanguíneo).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	71 de 155

Ciclo biológico

El ciclo biológico del parásito se inicia cuando el triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes sanguíneos; éstas se transforman y se multiplican. Cuando el vector infectado se alimenta, puede ingerir varias veces su peso corporal en sangre y defecarla en la piel o mucosas del mamífero, de esta manera arrastra su excremento e introduce tripomastigotes metacíclicos infectantes.

También es posible que el mismo huésped se infecte al llevar las deyecciones a una solución de continuidad en la piel, mucosa o conjunto ocular. Luego, se transforman en amastigotes, se multiplican por fisión binaria y alcanzan la circulación sanguínea causando la muerte celular. El ciclo se completa cuando el triatomino se alimenta de un mamífero infectado. La transmisión de la enfermedad puede ocurrir por transfusión sanguínea, congénita o trasplantes.

Cuadro clínico

Durante la fase aguda se puede presentar chagoma de inoculación, caracterizado por un proceso inflamatorio agudo localizado en el sitio de la infección, y que produce una induración dolorosa y eritematosa o edema unilateral biparpebral con adenitis retroauricular, que se conoce como signo de Romaña. También se presenta malestar general, fiebre continua e intermitente, linfadenitis generalizada, dolores musculares, escalofrío, hepatoesplenomegalia y esplenomegalia, astenia y adinamia. La enfermedad puede evolucionar a una fase subclínica, donde empeoran los síntomas, o a una fase crónica.

Diagnóstico

Las técnicas se basan en la utilización de una muestra de sangre (frotis). También se puede realizar inoculación de sangre del paciente en animales de experimentación, en medios de cultivo como NNN y LIT, y el xenodiagnóstico.

Para las fases subclínica o crónica se pueden aplicar hemaglutinación indirecta, ELISA, inmunofluorescencia y Western blot.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	72 de 155

MATERIAL Y REACTIVOS

- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Aceite de inmersión.
- Preparaciones fijas de *Trypanosomas*.
- Papel seda.

SERVICIOS

- Agua y Luz.

PROCEDIMIENTO

1. Observar las preparaciones al microscopio a 4x, 10x y 40x una vez localizado el campo de interés se podrá observar a 100x usando el aceite de inmersión (solo con supervisión del profesor).
2. Limpiar el lente 100x con el papel seda cuidadosamente para no dejar ningún residuo. Si es necesario limpiar la preparación fija con papel seda para quitarle el aceite de inmersión.

RESULTADOS

Realizar un registro y una descripción morfológica de lo observado, además de esquemas.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es la fase replicativa extracelular de *Trypanosoma cruzi*?
- 2) ¿Cuál es el ciclo completo de *Trypanosoma cruzi*?
- 3) ¿Cuáles son los mecanismos de patogenicidad en las infecciones por *Trypanosoma cruzi*?
- 4) ¿Quién es el transmisor en la enfermedad de Chagas?
- 5) ¿Cuál es el fundamento del xenodiagnóstico?
- 6) ¿Cuáles son las características morfológicas de los estadios básicos por los que atraviesa el parásito?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	73 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Becerril Flores, M. A. (2014). Parasitología médica. España: McGraw.Hill.

Jawetz, Melnick y Adelberg. (2016). Microbiología médica. España: McGraw.Hill.

Mims C. A; Playfair J. H. L; Kobayashi G. S; Thompson J. H. (2013). Microbiología médica. Países Bajos: Elsevier.

Murray R. P; Rosenthal S. K; Pfaller A. M. (2021). Microbiología médica. España: Elsevier.

Prats Pastor, G. (2013). Microbiología y parasitología médica. Argentina: Médica Panamericana.

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.

Tay Zavala, J; Gutierrez M; Lara R; Velasco O. (2010). Parasitología médica. México: Méndez editores.

Tortora G. J; Funke B. R; Case C. L. (2017). Introducción a la microbiología. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	74 de 155

Hemocultivo.

OBJETIVO

- Conocer y realizar la técnica aséptica para la toma de muestra.
- Realizar la técnica de hemocultivo.
- Aprender a interpretar hemocultivos positivos y negativos.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacteriemias y fungemias se diagnostican por hemocultivo, que consiste en el cultivo de una muestra de sangre en medios adecuados para recuperar las bacterias y los hongos que son capaces de crecer en medios artificiales.

Para realizar un hemocultivo en un adulto se extrae al paciente entre 10 y 20 mL de sangre. La extracción de sangre debe hacerse mediante una técnica rigurosamente aséptica para evitar contaminaciones.

Es recomendable practicar dos o tres hemocultivos mediante extracciones separadas y de puntos de venopunción diferentes. El intervalo depende de la enfermedad que se sospeche y la evolución de la enfermedad. En niños la cantidad de sangre a sembrar es entre 1 y 5 mL. Un volumen insuficiente de sangre es causa de hemocultivo negativo.

La realización de varios hemocultivos permite la confirmación de una sepsis y descartar una contaminación por microorganismos de la flora normal de la piel.

Técnica

Cabe destacar el sistema bifásico de Ruíz-Castañeda consistente en frascos que tienen en su interior dos fases, una sólida de agar adosada a la pared y otra líquida. Este sistema se ideó para el diagnóstico de la brucelosis ya que la bacteria responsable de esta infección es de crecimiento lento y tiene una elevada virulencia. Con este sistema puede observarse el crecimiento en el medio sólido sin necesidad de abrir el frasco con lo que se evita tanto el riesgo de contaminar el medio como contraer esta infección en el laboratorio.

Seguimiento



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	75 de 155

Una vez inoculados los frascos se incuban a 37°C durante siete a diez días con lectura diaria. Se debe detectar enturbiamiento, hemólisis, gas o presencia de colonias en el medio de Castañeda.

Cuando se detecta un hemocultivo positivo se practica una tinción de Gram y posteriormente se resiembra. Para su posterior aislamiento e identificación. En los hemocultivos visualmente negativos se recomienda un subcultivo transcurridas las primeras 48 horas antes de desecharlos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asa bacteriológica.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- Medio Ruiz-Castañeda de la sesión anterior.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, con el uso de guantes desechables y cubrebocas, trabajando cerca del mechero, obtener por punción venosa 3 mL de sangre de un voluntario, previo consentimiento del mismo.
2. Introducir la sangre en el frasco del medio Ruíz-Castañeda y etiquetar el frasco.
3. Agitar suavemente por unos segundos y mantener el frasco en posición horizontal durante 30 minutos para permitir que la sangre haga contacto con la fase sólida.
4. Cambiar a la posición vertical e incubar a 37 °C.
5. Observar cada 24 horas y registrar observaciones.
6. Guardar el medio Ruíz-Castañeda para la resiembra.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	76 de 155

RESULTADOS

Registrar si hay crecimiento de colonias en la fase sólida y/o turbiedad o hemolisis en la fase líquida. La presencia de gas se detectará hasta realizar la resiembra (próxima sesión). Guardar el medio para aislamiento de microcultivos la próxima semana.

Para interpretar correctamente un hemocultivo positivo es necesario conocer la situación clínica del paciente, su enfermedad base, la presencia de factores predisponentes, así como el tratamiento antimicrobiano previo recibido. La valoración viene facilitada no solo por la clínica del paciente sino también por el número de hemocultivos positivos al mismo microorganismo.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es la definición de los siguientes conceptos: bacteriemia, septicemia, fungemia y piemia?
- 2) ¿Qué microorganismos se pueden aislar a partir de un hemocultivo?
- 3) ¿Qué enfermedades se pueden diagnosticar?
- 4) ¿Cuál es la composición química del medio Ruíz-Castañeda?
- 5) ¿Qué microorganismos se pueden considerar contaminantes?
- 6) ¿En qué situaciones se manda realizar un hemocultivo?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.

Prats Pastor, G. (2013). Microbiología y parasitología médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	77 de 155

Resiembra en medios selectivos

OBJETIVOS

- Reconocer los medios de cultivo usados frecuentemente para aislar microorganismos a partir de un hemocultivo, así como sus principales características.
- Aprender a seleccionar medios de cultivo adecuados, a partir del conocimiento previo de las características de los posibles microorganismos a identificar.
- Comprender el uso de los medios de cultivo como herramientas en la identificación de “género” dentro de una marcha de identificación de microorganismos.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Debido a que los microorganismos presentes en sangre circulante, ya sea en forma continua, intermitente o transitoria, representan una amenaza para cada órgano del cuerpo y pueden llegar a traducirse en consecuencias graves como shock, insuficiencia de múltiples órganos, coagulación intravascular diseminada y muerte; es muy importante el correcto aislamiento e identificación de los microorganismos que llegan a desarrollar en un hemocultivo, del cual es posible aislar patógenos pertenecientes a los cuatro grupos principales de microorganismo (bacterias, hongos, parásitos y virus).

Por motivo de lo anteriormente mencionado, los frascos de hemocultivo deben examinarse de manera visual por lo menos una vez por día en búsqueda de cualquier indicativo de crecimiento como puede ser la hemólisis de los eritrocitos, la presencia de burbujas de gas en el medio, turbidez o la aparición de pequeñas acumulaciones de desarrollo bacteriano o micótico en el caldo, sobre la superficie de la capa de eritrocitos sedimentados o, algunas veces a lo largo de las paredes del frasco. En caso de desarrollo o de la existencia de evidencias sugerentes del mismo, es necesario proceder a realizar tinción de Gram para iniciar la identificación.

Si no se observa microorganismo alguno en el examen microscópico de un frasco aparentemente “positivo”, la resiembra debe efectuarse de todas maneras.



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

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	78 de 155

Como se mencionó anteriormente, es posible aislar patógenos pertenecientes a los cuatro grupos principales de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos y virus), de ahí que los medios seleccionados para la resiembra deban incluir medios para grampositivos, gramnegativos, hongos y levaduras. Cabe destacar que la elección de cada medio puede ser orientada mediante el conocimiento previo de cuáles son los microorganismos aislados con mayor frecuencia. De este modo, una posible elección básica puede incluir medios como Agar Sangre al 5%, Agar Chocolate, Agar S-110, Agar Sal Manitol, Agar EMB o Agar Mac Conkey, Agar Sabouraud y Agar BIGGY.

También es recomendable incluir medios especiales para microorganismos aislados frecuentemente pero que tienen diferentes exigencias nutricionales, requieren de condiciones especiales para su desarrollo o sencillamente necesitan mayor tiempo de vigilancia porque su crecimiento es lento. Un ejemplo es *Brucella spp.* que debe incubarse en un ambiente de 37 °C con 10% de CO₂ por lo menos tres semanas, realizando subcultivos a los 4 días y después una vez por semana.

Cabe destacar que en la práctica, el médico juega un papel importante en la notificación al laboratorio de algunos datos, hallazgos clínicos o "posibles sospechas" que puedan apoyar la elección de algún medio especial.

Bacterias aisladas frecuentemente en hemocultivos
<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus viridans</i>
Algunas especies de <i>Enterococcus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
Bacterias entericas (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonellas</i> y <i>Brucellas</i>)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	79 de 155

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asa bacteriológica.
- Medio Ruiz-Castañeda de la sesión anterior.
- 1 caja de Agar sangre.
- 1 caja de Agar chocolate.
- 1 caja de Agar S-110.
- 1 caja de agar EMB o MacConkey
- Aceite de inmersión.
- Papel seda.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, tomar inóculo con el asa bacteriológica tanto del medio líquido como del sólido (es importante observar la posible aparición de pequeñas acumulaciones de desarrollo bacteriano o micótico en el caldo, sobre la superficie de la capa de eritrocitos sedimentados o, algunas veces a lo largo de las paredes del frasco) y sembrar por estría cruzada o de aislamiento en cada uno de los medios.
2. Tomar nuevamente muestra procedente del medio Ruiz Castañeda y realizar un frotis y tinción de Gram.
3. Etiquetar todos los medios e incubar las placas de agar a 37°C por 24 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	80 de 155

4. Observar resultados y guardar los medios en refrigeración para usarlos la siguiente práctica.

RESULTADOS

Reportar la morfología colonial de cada medio de cultivo y guardarlos en refrigerador para utilizar en la siguiente práctica. El agar sangre puede ser “picado” en las zonas de inoculación con asa recta sin llegar al fondo de la placa para permitir la mejor visualización de hemólisis, esto debido a la existencia de hemolisinas lábiles y resistentes al oxígeno. A partir de los resultados los alumnos reconocerán los medios usados frecuentemente en los subcultivos del hemocultivo, así como sus principales características y los principales microorganismos que pueden crecer en ellos. Asociando estos medios de cultivo como herramientas en la identificación de géneros y de los microorganismos.

Medios de cultivo	Aspectos de la morfología colonial	Resultado
Agar Sangre	Tipo de hemólisis	
	Tamaño	
	Borde (redondeado, ondulado, espiculado, etc)	
	Color	
	Aspecto (mate o brillante)	
	Elevación (concavo o convexo)	
	Mucoide (si o no)	
Agar Chocolate	Tamaño	
	Borde (redondeado, ondulado, espiculado, etc)	
	Color	
	Aspecto (mate o brillante)	
	Elevación (concavo o convexo)	
	Mucoide (si o no)	
	Otras características	
S-110	Tamaño	
	Borde (redondeado, ondulado, espiculado, etc)	
	Color	
	Aspecto (mate o brillante)	
	Elevación (concavo o convexo)	
	Mucoide (si o no)	
	Otras características	
MacConkey o EMB	Tamaño	
	Borde (redondeado, ondulado, espiculado, etc)	



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	81 de 155
	Color		
	Aspecto (mate o brillante)		
	Elevación (concavo o convexo)		
	Mucoide (si o no)		
	Otras características		

CUESTIONARIO

- 1) ¿Qué microorganismo esperarías encontrar en Agar Sangre y por qué es importante leer en este medio a las 24 horas?
- 2) ¿Qué microorganismos esperarías encontrar en Agar chocolate y qué tipo de medios es?
- 3) ¿Cuál es la etiología de la presencia de microorganismos en sangre?
- 4) ¿Después de cuánto tiempo debe darse como negativo un hemocultivo y por qué?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.

Romero Cabello, R. (2018). Microbiología y parasitología humana. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	82 de 155

Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas.

OBJETIVO

- Reconocer a las pruebas bioquímicas como herramientas en la identificación de especie, comprendiendo y diferenciando sus fundamentos, modo de inoculación, interpretación de resultados y tiempo de lectura de los mismos.
- Evidenciar mediante pruebas bioquímicas las características propias de especie que permitan la identificación de los microorganismos obtenidos en los cultivos selectivos realizados a partir del hemocultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

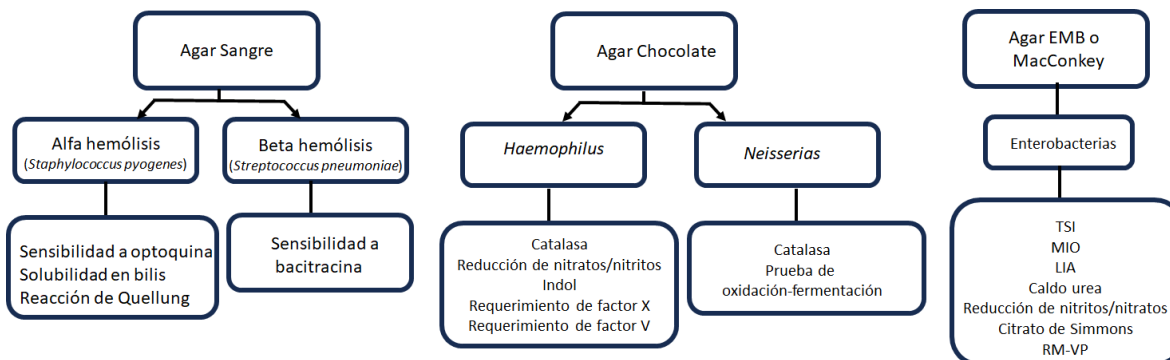
Aunque es posible identificar de forma específica a muchos microorganismos con diversas técnicas, el procedimiento más frecuente que se realiza en los laboratorios diagnósticos es el de identificación a través de cultivos y pruebas bioquímicas, siendo estas últimas la etapa que pone de manifiesto características muy particulares de cada microorganismo, razón por la cual en general se utilizan para confirmación de género como es el caso de pruebas como catalasa (para distinguir *Streptococcus* de *Staphylococcus*) o bien identificación de especie .

Debido a que los microorganismos difieren en características metabólicas, producción de enzimas (lecitinasas, coagulasas, etc.), susceptibilidad a ciertas sustancias o fármacos, la elección de las pruebas bioquímicas dependerá del conocimiento previo del tipo de microorganismo que puede cultivarse en cada medio y de sus características.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	83 de 155

Ejemplos de pruebas bioquímicas elegidas según el microorganismo



MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asa bacteriológica.
- Porta y cubre objetos.
- Peróxido de hidrógeno.
- Tubo con TSI.
- Tubo con LIA.
- Tubo con Citrato de Simmons.
- Tubo con Caldo urea.
- Tubo con MIO.
- Aceite de inmersión.
- Papel seda.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	84 de 155

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, realizar pruebas de catalasa y coagulasa a partir de colonias del medio S-110 (y puede solicitarse la prueba roja de fenol con el carbohidrato manitol).
2. Realizar prueba de catalasa y tinción de Gram en caso de crecimiento en agar chocolate.
3. En caso de desarrollo en los medios EMB o Mac Conkey proceder a la inoculación de las pruebas TSI, SIM, LIA, MIO, Citrato de Simmons y Caldo Urea.
4. Etiquetar los tubos y leer los resultados a las 24 horas a excepción de TSI que deberá leerse a las 18 horas.
5. Reportar género y especie del microorganismo identificado.

RESULTADOS

Reportar los resultados de las pruebas bioquímicas, interpretando cada una para lograr la identificación la de especie de diversos microorganismos, además de comprender sus fundamentos y diferenciar a dichas pruebas de los medios de cultivo. Finalmente reportar el género y especie del microorganismo identificado.

Medios de cultivo	Prueba	Resultado
Agar Chocolate	Catalasa	
	Tinción de Gram	
S-110	Catalasa	
	Coagulasa	
Agar MacConkey o EMB	TSI	
	SIM	
	LIA	
	MIO	
	Citrato de Simmons	
	Caldo urea	



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	85 de 155

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es el fundamento y la técnica de siembra en el medio TSI?.
- 2) ¿Cuál es el fundamento y la técnica de siembra en el medio de SIM?
- 3) ¿Qué pruebas utilizaría para confirmar la especie de *Streptococo pneumoniae*?
- 4) ¿Cuál es el fundamento de la prueba Citrato de Simons?
- 5) ¿Cuál es el fundamento de la prueba MIO?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica panamericana.

Engleberg N. C. (2013). Mecanismos de las enfermedades microbianas. España: Wolters Kluwer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	86 de 155

Reacciones febriles.

OBJETIVOS

- Conocer el método de laboratorio de Reacciones febriles para el diagnóstico y seguimiento de Fiebre tifoidea y paratifoidea, Brucelosis y Rickettsiosis.
- Interpretación de las Reacciones febriles.
- Conocer otros métodos de diagnóstico presuntivo de laboratorio que se utilizan para Fiebre tifoidea y paratifoidea, Brucelosis y Rickettsiosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las reacciones febriles representan un conjunto de pruebas de laboratorio serológicas (reacciones de aglutinación) útiles en países en vías desarrollo como México donde se siguen usando por ser pruebas baratas, rápidas y ampliamente conocidas pero con limitaciones por sus reacciones cruzadas con otras bacterias y falsos positivos incluso en proceso autoinmunes o falsos negativos por uso temprano de antibióticos, corticoesteroides, medición temprana de anticuerpos (en la 1ª. Semana de enfermedad), inmunodeficiencias adquiridas o congénitas, portadores crónicos de *Salmonella typhi* y problemas con la estandarización de la prueba. A pesar de lo anterior siguen siendo útiles para el diagnóstico presuntivo y seguimiento de ciertas infecciones con síndrome febril, causadas por *Salmonellas typhi* y *paratyphi*, *Brucellas* y *Rickettsias* (usa antígenos de *Proteus OX19* por su reacción cruzada). Estas reacciones se basan en el hecho de que cuando el organismo humano es invadido por agentes bacterianos estos generan antígenos presentes en el suero del paciente y el huésped responde produciendo anticuerpos aglutinantes contra ellos, los cuales se ponen de manifiesto al entrar en contacto el anticuerpo con el antígeno específico de las bacterias. Para la detección de los anticuerpos se usa el suero del enfermo y antígenos purificados. El título de anticuerpos depende del tipo y curso de la enfermedad. Para que los resultados tengan valor diagnóstico el título de ellos debe aumentar consecutivamente y se requieren 2 muestra tomadas en periodo de 2-4 semanas de intervalo. Estas pruebas pueden efectuarse de dos maneras diferentes:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	87 de 155

1. Aglutinación en placa (como prueba tamiz cuando se tienen que examinar numerosas muestras). Esta prueba es muy fácil de efectuarse y si se hace cuidadosamente, sirve como prueba de aglutinación completa: sin embargo se sugiere que se tome como complemento de la aglutinación macroscópica en tubo. Las reacciones francamente negativas deben ser reportadas como tales. Las dudosas deben repetirse con la aglutinación en tubo.

2. Aglutinación en tubo. Está técnica de aglutinación es más segura que la de aglutinación en placa, además las reacciones cruzadas son menos frecuentes y pueden ser detectadas las reacciones zonales. Estos son los microorganismos representantes típicos de los padecimientos con acceso febril, por lo tanto, el grupo de antígenos febriles se presenta con las siguientes suspensiones:

Salmonella typhi Antígeno somático O

Salmonella typhi Antígeno flagelar H

Salmonella paratyphi Antígeno flagelar A

Salmonella paratyphi Antígeno flagelar B

Brucella abortus Antígeno somático

Proteus OX19 Antígeno somático

Cuatro serotipos de salmonella que causan fiebre entérica se identifican en el laboratorio clínico mediante análisis bioquímico y serológico: *Salmonella paratyphi* A (serogrupo A) , *Salmonella paratyphi* B (serogrupo B), *Salmolla choleraesuis* (serogrupo C1) y *Salmonella typhi* (serogrupo D). *Salmonella typhi* causa Fiebre Tifoidea, vía oral llegan a células M de intestino delgado, entran a linfáticos donde proliferan en macrófagos, folículos linfáticos de intestino y circulación sanguínea para diseminarse, se excretan por heces y bilis; posterior a 10-14 días de incubación se presenta fiebre elevada, malestar general, cefalea, estreñimiento, mialgias, bradicardia, hepato y esplenomegalia. *Salmonella typhi* puede causar enterocolitis y septicemia. En Fiebre Tifoidea las aglutininas aumentan de manera



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	88 de 155

brusca en 2da. Y 3^a. Semana de infección y el ensayo de aglutinación de Widal o Reacción de Widal se basa en la detección de anticuerpos en el suero de los pacientes a los antígenos O (LPS) y H (flagelar). Se requieren 2 muestras de suero con intervalo 7-10 días para mostrar elevación del título de anticuerpos. Los criterios de interpretación debido a su falta de especificidad (pobladores sanos de áreas endémicas presentan títulos ó concentraciones altas de anticuerpos) debe ser interpretado en el contexto clínico del paciente se debe conocer la prevalencia de la enfermedad en el área geográfica, se considera positivo un título contra antígeno O de 1: 320 en zona no endémica y en zona endémica como México antígeno O y H de 1: 160 indica una gran probabilidad de enfermedad activa, mientras tanto los estudios complementarios deberán confirmar el diagnóstico y reorientar el tratamiento. Otros métodos diagnósticos en Fiebre Tifoidea Biometría hemática 1^a semana leucopenia con eosinopenia y linfocitosis relativa, hemocultivo finales 1^a y en 2^a semana positivo da un diagnóstico definitivo; 2da. Semana cultivo de médula ósea, orina y heces positivos, Pruebas de función hepática con transaminasas elevadas.

Brucelosis (Fiebre de malta, fiebre ondulante, Fiebre de Bang o Fiebre del mediterráneo) es una zoonosis causada por género *Brucella* en el ser humano los más frecuentes *Brucella mellintensis* en 98% y *Brucella abortus* en 2 % se transmite por ingesta de leche y derivados no pasteurizados presenta cuadro clínico agudo con síndrome febril e invasión hígado, bazo y ganglios linfáticos y forma crónica. Métodos serológicos para el diagnóstico probable aglutinación positiva con antígeno Rosa de Bengala, confirmación con prueba de aglutinación estándar y en presencia de 2- mercaptoetanol y posibilidad o no a hemocultivo. La reacción de Huddleson dentro de las reacciones febriles aportan sólo un diagnóstico presuntivo con la aglutinación rápida en placa para *Brucella*, se utiliza una suspensión de Ag de *Brucella abortus* para buscar anticuerpos. La interpretación en zona endémica títulos de seropositividad de 1: 160 o superiores en fases iniciales de la enfermedad.

Las Rickettsiosis son enfermedades como el Grupo de Fiebres manchadas agente *Rickettsia rickettsi* y Grupo de Fiebres Tíficas agente *Rickettsia prowazekki*, son consideradas zoonosis transmitida por picadura o contaminación de picadura con heces de vectores como pulgas, garrapatas y piojos estos últimos causan Tifus epidémico. Cuadro



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	89 de 155

clínico sx febril, hepato- esplenomegalia. La reacción de Weil Felix se basa en la capacidad del suero del paciente infectado por *Rickettsias* para aglutinar cepa de Proteus OX-19 por reacción cruzada, es decir es un antígeno común entre Proteus OX 19 y *Rickettsias* por lo que es poco sensible y específica y deben realizarse pruebas para un diagnóstico

confirmatorio como fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia directa e indirecta.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Pipeta Pasteur.
- Bulbo para Pipeta Pasteur.
- Aplicadores de madera.
- Centrifuga.
- Tubos de ensaye 13 x 100.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- Kit de reacciones febriles.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, obtener por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario (previo consentimiento por escrito), dejar que coagule y retirar el coagulo con un aplicador de madera.
2. Centrifugar (2500-3000 rpm por 5 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrifuga.
3. Finalmente separar mediante una pipeta Pasteur el suero en un tubo nuevo.
4. Realizar la técnica de aglutinación rápida en placa.
5. Utilizando de preferencia una placa de vidrio marcada con 2 hileras de 3 cuadros.
6. Agregar una gota de suero y una gota de antígeno, procurando anotar el antígeno que le corresponde a cada serie.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	90 de 155

7. Mezclar con un aplicador limpio, comenzando con la última dilución de la derecha y siguiendo con las restantes de la izquierda (utilizar un aplicador por cada serie).
8. Agitar suavemente la placa por rotación (120 rpm) durante 2 a 3 minutos.
9. Leer con luz indirecta.

RESULTADO

Para el método de aglutinación rápida en placa se realiza la lectura con fuente de luz directa y se observa si hay aglutinación macroscópica (se recomienda incluir controles positivo y negativo). Se valoran los resultados de forma cualitativa como positivo si hay presencia de aglutinación y negativo si hay ausencia o grado aglutinación de la siguiente forma:

% Aglutinación	Cruces
100 %	++++
75 %	+++
50 %	++
25 %	+
1	-

La interpretación de resultados cualitativos de acuerdo el porcentaje de aglutinación en correlación con los antígenos colocados en cada ovalo de la placa de vidrio discuta sus resultados en caso de positividad o negatividad, su correlación con presentar o no cuadro clínico, posibilidad de falsos positivos o negativos y resultados por memoria inmunológica, confiabilidad de resultados y alternativas de otras pruebas diagnósticas y secuencia en tiempo para repetir la prueba diagnóstica.

Si se hiciera un prueba cuantitativa (si se hicieran diluciones) la interpretación de resultados:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	91 de 155

Suero (mL)	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
Aglutinación	++++	++++	+++	++	+
Título correspondiente	1/20	1/40	1/80	1/60	1/320

Se sugiere al alumno reportar los resultados en un cuadro, como el siguiente:

Antígenos / Resultados de aglutinación	Positivo	Negativo	Interpretación
<i>Salmonella typhi</i> Antígeno somático O			
<i>Salmonella typhi</i> Antígeno somático H			
<i>Salmonella paratyphi</i> Antígeno flagelar A			
<i>Salmonella paratyphi</i> Antígeno flagelar A			
<i>Salmonella paratyphi</i> Antígeno flagelar B			
<i>Brucella abortus</i> Antígeno somático			
Proetus OX19 Antígeno somático			

CUESTIONARIO

1. ¿Cuándo está indicado solicitar realizar Reacciones Febriles?
2. ¿Cuántas técnicas existen para determinación de las reacciones febriles, descríbalas?
3. ¿Cuáles son los antígenos detectables en las Reacciones Febriles?
4. ¿Porqué se utiliza el antígeno Proteus OX19 para el diagnóstico de Rickettsiosis?
5. ¿Qué muestras biológicas son de utilidad para el diagnóstico de Fiebre tifoidea, Brucelosis y Rickettsiosis?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	92 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jawetz, Melnick y Adelberg. (2016). Microbiología médica. España: McGraw.Hill.
- Espinoza RVH. Reacciones febriles. Infectología Pediátrica 2010-2014. En:
http://www.infectologiapediatrica.com/main/page_new_folder_reacciones_febriles.html
- Calva E. Salmonella typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. En:
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. Guía de Práctica Clínica. Guía de Referencia rápida Diagnóstico y Tratamiento para la Fiebre Tifoidea. Número de Registro: IMSS-259-10 (Actualización 2016).
<https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/259GRR.pdf>
- Uribarren BT. UNAM Departamento de Microbiología y Parasitología. Recursos en bacteriología.Salmonelosis.2015.<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/salmonelosis.html>
- SSA. Dirección General de Epidemiología. Subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis. México 2012. En:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/03_2012_Manual_Brucelosis_vFinal_13nov12.pdf
- Montes I. Control de Calidad EIMC. Servicio de Microbiología. Hospital Virgen del Puerto. Diagnóstico de Brucelosis. Consultado en:
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/diagbruce.pdf>
- SSA. Dirección General de Epidemiología.Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de brucelosis. Laboratorio de brucelosis. En:
http://www.indre.salud.gob.mx/interior/lab_brucelosis.html



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	93 de 155

Módulo 4. Digestivo.

Cultivo de enterobacterias.

OBJETIVOS

- Conocer las principales características morfo-fisiológicas de las enterobacterias patógenas que invaden el tracto digestivo.
- Realizar el aislamiento en cuatro de los principales medios de cultivo selectivos y diferenciales para enterobacterias y realizar la interpretación de su análisis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por bacilos gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos que fermentan la glucosa, son oxidasa negativa y crecen en medios usuales. Habitan como comensales en el tubo digestivo (flora normal) como *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*. Algunas especies son patógenas, como algunos serotipos de *Salmonella* entérica y *Shigella* que causan gastroenteritis, y los serotipos Typhi y Paratyphi A, B y C, que causan sepsis. Habitualmente, las enterobacterias se identifican a nivel de especie mediante un mínimo de 10 a 20 pruebas metabólicas.

Escherichia coli

Es la enterobacteria más estudiada. Es móvil, fermenta la lactosa a partir del triptófano. Los principales serotipos de *Escherichia coli* son: entero-toxigénica, entero-patógena, entero-hemorrágica, entero-invasiva y entero-agregativa. Algunas pueden producir enfermedades graves causadas por diarrea, en otros casos causa insuficiencia renal. También pueden generar infecciones del sistema excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y hasta la muerte.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	94 de 155

Proteus

Es un género que incluye patógenos responsables de infecciones de vías urinarias, existen especies oportunistas para el hombre como *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*. Generan cálculos y lesiones celulares del epitelio renal, enteritis principalmente en niños; abscesos hepáticos, meningitis, otitis media y neumonía con o sin empiema. Es frecuente en quemaduras y heridas, así como en infecciones nosocomiales.

Salmonella

Existen más de 2000 serotipos de esta especie. En el grupo D se encuentra *Salmonella typhi*, causante de la fiebre tifoidea. Esta enfermedad se caracteriza por fiebre progresiva asociada a estreñimiento o diarrea profusa.

Shigella

Shigella es responsable de la disentería bacilar, es un cuadro muy parecido al generado por cepas enterohemorrágicas o enteroinvasivas. La infección se produce a través de vegetales contaminados.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.
- 2 cajas de Agar Salmonella-Shigella (SS).
- 2 cajas de Agar Sulfito de bismuto.
- 2 cajas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB).
- 2 cajas de Agar Verde brillante.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	95 de 155

CEPAS

- *Salmonella spp.*
- *Shigella spp.*
- *Proteus spp.*
- *Escherichia coli.*

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, realizar un frotis de cada una de las cepas, hacer tinción de Gram y observar al microscopio a 10X y 40X. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor y usando el cubreobjetos). Desechar los frotis.
2. Por el reverso, dividir las cajas de Petri con los medios de cultivo por la mitad con un lápiz graso.
3. Respetando la técnica aséptica sembrar por estría simple de aislamiento las diferentes cepas (seguir las indicaciones del profesor).
4. Incubar durante 48 horas a 37 °C.
5. Leer los resultados y guardar los medios de cultivo en refrigeración para realizar pruebas bioquímicas.

RESULTADOS

Observar y describir cuidadosamente la morfología colonial y microscópica de los diferentes cultivos.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuáles son los principales medios de cultivo diferenciales y selectivos para enterobacterias?
- 2) ¿Cuál es el componente que caracteriza a cada uno de los medios de cultivo utilizados en la práctica?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	96 de 155

- 3) ¿Cuáles son los principales factores de patogenicidad de las enterobacterias estudiadas en la práctica?
- 4) ¿Por qué razones *Escherichia coli* se vuelve patógena en el tracto digestivo?
- 5) ¿Cuál es la morfología colonial de *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* y *Proteus*?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carroll K.C., Hobden J.A., Miller S., Morse S.A., Mietzner T.A., Detrick B., Mitchell T.G., McKerrow J.H., Sakanari J.A. (2016). Microbiología médica de Jawetz, Melnick & Adelberg (27ª ed.). McGrawHill.

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

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	97 de 155

Identificación de bacterias a partir del coprocultivo.

OBJETIVO

- Distinguir las características bioquímicas esenciales para la identificación de las enterobacterias cultivadas a partir del coprocultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La familia de las enterobacterias son bacilos Gram negativos y se denominan así por que habitan en el tracto intestinal. Casi todas las enterobacterias son fermentadoras de la glucosa y de otros hidratos de carbono. Dada su importancia clínica hay muchas técnicas para aislarlas e identificarlas.

La utilización de pruebas bioquímicas sencillas realizadas con medios y métodos convencionales preparados en el laboratorio y de calidad, ayudan a la identificación de las bacterias aisladas con mayor frecuencia del tracto digestivo.

Algunas de las características metabólicas fundamentales que se pueden observar son la movilidad, la fermentación de azúcares, la producción de ácido sulfhídrico, la presencia de ureasa, la descarboxilación y la desaminación de la lisina, ornitina y arginina, la producción de indol y la utilización del citrato. Estas se harán evidentes con los medios TSI, LIA, citrato de Simmons, caldo Urea, SIM y cal manitol rojo de fenol.

El principal objetivo es identificar el agente causal de la infección en el tracto digestivo, descartando aquellas bacterias propias de la flora normal. Esto se llevará a cabo mediante la siembra en medios de identificación convencionales.

La existencia en el mercado de paneles miniaturizados para los estudios de las pruebas metabólicas ha significado un adelanto para la identificación bacteriana. Estas pruebas son procesadas por instrumentos que efectúan la inoculación, la incubación y la lectura de modo automatizado, evaluando los resultados una computadora que efectúa la identificación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	98 de 155

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Cajas de medio de cultivo de la practica anterior.
- Hisopos estériles.
- 2 tubos con TSI.
- 2 tubos con LIA.
- 2 tubos con Citrato de Simmons.
- 2 tubos de medio SIM.
- 2 tubos de caldo urea.
- 2 tubos de caldo manitol rojo de fenol.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

A partir de los cultivos obtenidos de la sesión anterior revisar la morfología colonial e identificar colonia prototipo de Samonella, tomar una muestra y sembrar por agitación en los medios caldo urea y manitol rojo de fenol.

Tomar una muestra de Salmonella y sembrar en el medio SIM por picadura.

Tomar una muestra de Salmonella y sembrar en los medios: TSI, LIA y Citrato de Simmons, ya sea por estría simple o por picadura (seguir las instrucciones del profesor).

Repetir el mismo procedimiento para sembrar las pruebas bioquímicas del medio de cultivo de *Proteus*, *Shigella* y *Escherichia coli*.

Etiquetar cada tubo e incubar durante 24 a 48 horas a 37 °C.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	99 de 155

RESULTADOS

Reportar los resultados de cada cepa como morfología colonial en el caso de los cultivos y los resultados en cada tubo si fueron positivas o negativas, reportar de preferencia en un cuadro. Para el medio SIM la movilidad se revisa a las 24 horas, para la producción de indol (se revisa a las 24 horas) se debe adicionar 1 o 2 gotas del reactivo de Kovac o de Erlich y finalmente para la producción de sulfuro de hidrogeno se debe revisar a las 48 horas.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es el fundamento bioquímico de los medios TSI, SIM, LIA, caldo Urea, citrato de Simmons y caldo manitol rojo de fenol?
- 2) ¿Cómo se interpretan los resultados en cada uno de los medios?
- 3) ¿Cuál es la finalidad de utilizar el reactivo de Kovac o Erlich?
- 4) ¿Cuál es la utilidad de realizar pruebas bioquímicas?
- 5) ¿De qué depende la confiabilidad de los resultados?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Romero C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana. 4ª edición. 2018.
- MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.
- Salvatella Agrello, R., Eirale, C. (1996). Examen coproparasitario: metodología y empleo. Revisión técnico metodológica / Coproparasitary examination: methodology and utilization. Rev. méd. Urug ; 12: 215-23.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	100 de 155

Coprocultivo.

OBJETIVO

- Efectuar la técnica de coprocultivo y conocer su importancia médica.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El coprocultivo se utiliza para el aislamiento de las bacterias enteropatógenas. Los medios de cultivo utilizados son medios selectivos y de enriquecimiento que permiten el crecimiento de las bacterias que se desea aislar inhibiendo el resto de la flora.

La mayoría de las enteritis bacterianas son causadas por salmonelas y campilobacter, por lo que deben emplearse medios de cultivo selectivos. Los más comunes son el agar MacConkey, el agar xilosa-lisina-deoxicolato y el agar Salmonella-Shigella también son útiles para *Escherichia coli* enteropatógena, *Shigella* y *Yersinia*.

Las salmonelas pueden enriquecerse sembrando previamente las heces en un medio líquido como el caldo selenito F y el caldo de tetratoato de sodio incubados a 35°C (8-12 horas). Después de incubados, estos medios líquidos de enriquecimiento deben sembrarse en los respectivos medios selectivos sólidos.

A pesar del empleo de los medios de enriquecimiento y selectivo- diferenciales para enterobacterias enteropatógenas, siempre crecen en las placas de aislamiento una mezcla heterogénea de colonias; por tanto, las colonias sospechosas deben sembrarse en medios de identificación rápida como el agar Kligler (KIA) y el agar lisina hierro (LIA) que permiten identificar estos microorganismos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Hisopos estériles.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	101 de 155

- Muestra de heces en un frasco estéril.
- 1 tubo de caldo Tetrionato.
- 1 tubo de caldo Selenito.
- 1 caja de Agar Salmonella-Shigella (SS).
- 1 cajas de Agar Sulfito de bismuto.
- 1 cajas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB).

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Tomar una muestra de heces con el hisopo estéril y colocarlo en el medio de Tetrionato.
2. Tomar otra muestra y colocarla en el medio de Selenito. Incubar durante 24 horas a 37 °C, previo a la práctica.
3. Por el reverso, dividir las cajas de Petri con los medios de cultivo por la mitad con un lapiz graso.
4. Descargar la muestra de heces con el hisopo, en un extremo de la caja del medio de cultivo, a partir del medio Tetrionato.
5. Descargar la muestra de heces con el hisopo, en el otro extremo de la caja del medio de cultivo, a partir del medio Selenito.
6. Quemar los hisopos comenzando por el algodón y desecharlos correctamente.
7. Sembrar con el asa bacteriológica, por estría de aislamiento simple, en ambas secciones del medio de cultivo.
8. Seguir el mismo procedimiento para cada uno de los medios de cultivo. Incubar durante 24 a 48 horas a 37 °C y leer los resultados.

RESULTADOS

Observar y describir cuidadosamente la morfología colonial de cada cultivo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	102 de 155

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es el objetivo de utilizar los medios de Tetratonato y Selenito para realizar el coprocultivo?
- 2) ¿Por qué se pide la muestra en un frasco estéril?
- 3) ¿Cuáles son las principales infecciones intestinales y cuál es el agente causal?
- 4) ¿De qué otra manera se podría hacer el diagnóstico de infección por *Salmonella*?
- 5) ¿Cuáles son las principales enterotoxinas que causan problemas a nivel intestinal?
¿Cuál es su mecanismo de acción? y ¿Quién las produce?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.

Solís-Cuesta, Rodríguez-López, Ibarra-González, Lacasa-Díaz. (2002). Indicaciones y valoración clínica del coprocultivo, Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, Volume 8, Issue 61. ISSN 0304-5412, [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70609-4](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70609-4).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	103 de 155

Coproparasitoscópico por concentración (cualitativo).

OBJETIVOS

- Realizar un estudio coproparasitoscópico cualitativo para el diagnóstico de parasitosis.
- Conocer los diferentes tipos de análisis coproparasitoscópicos que se realizan y sus indicaciones.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El examen coproparasitoscópico es el estudio de la materia fecal para la búsqueda e identificación de formas parasitarias con fines diagnósticos

El examen directo de las heces frescas o fijadas es muchas veces insuficiente para la observación de protozoos y particularmente de huevos de helmintos, sobre todo cuando se hallan en número escaso. Por ello se recurre normalmente a métodos de concentración. Las técnicas de concentración se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos físicos y físico-químicos (difásicos).

Los métodos físicos se basan únicamente en la diferencia de densidad entre los elementos parasitarios y el resto de materiales contenidos en las heces. A grandes rasgos, estos métodos consisten en mezclar una porción de heces con un líquido de densidad adecuada, de tal manera que los elementos parasitarios se separen del resto de los materiales, bien por flotación, bien por sedimentación, según la técnica. Entre los más utilizados está el método de flotación que emplea sulfato de zinc (técnica de Faust).

En los métodos físico-químicos se asocia la acción disolvente de los reactivos empleados, que forman dos fases no miscibles, en una de las cuales se localizan preferentemente los parásitos, y en la otra los restos fecales. De entre ellos, el más universal es el método formol-éter (técnica de Ritchie), que puede utilizarse tanto en heces frescas como fijadas en formol. Básicamente se trata de diluir las heces directamente en formol al 10%, tamizar



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	104 de 155

y agregar unos mililitros de éter etílico, emulsionar por agitación vigorosa y examinar, tras centrifugación, el sedimento donde se concentran los quistes de protozoos y los huevos de helminto.

Para las heces fijadas con MIF (Solución colorante y preservante que contiene entre sus componentes Merthiolate, Lugol y Formalina), se puede utilizar la técnica de concentración de Blagg (MIF concentración). Es muy parecida a la técnica de Ritchie, y su principal diferencia radica en que, en lugar de éter etílico, se utiliza éter sulfúrico.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- 4 tubos de 13 x 100 con tapón.
- 2 pipetas Pasteur.
- Bulbo para Pipeta Pasteur.
- Varilla de vidrio.
- Abatelenguas.
- Gasas.
- Porta y cubreobjetos.
- Microscopio.
- Guantes.
- Lugol.
- Solución de $ZnSO_4$
- Éter sulfúrico.
- Solución de formalina.
- Solución salina isotónica.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	105 de 155

PROCEDIMIENTO

A. Técnica de Faust

1. Poner con un aplicador (abatelenguas) aproximadamente 1g de materia fecal en un vaso de precipitados y agregar 10 mL de solución salina isotónica.
2. Filtrar las heces bien homogeneizadas a través de una gasa colocada en un embudo y recoger la suspensión en un tubo de centrifuga.
3. Centrifugar durante 45-60 segundos a 2500 rpm.
4. Decantar el sobrenadante y añadir 2 a 3 mL de agua al sedimento, agitar y añadir agua hasta llenar el tubo.
5. Repetir los pasos 5 y 6 tres o cuatro veces, hasta que el sobrenadante se torne claro. Tirar el sobrenadante.
6. Agregar 8-9 mL de solución de sulfato de zinc ($ZnSO_4$)(densidad 1:18). Agitar para homogeneizar y llenar el tubo con la misma solución.
7. Centrifugar durante 45-60 segundos a 2500 rpm.
8. Tomar con un asa bacteriológica la película superficial del líquido del tubo y colocarlo en un portaobjetos.
9. Añadir una gota de Lugol, homogeneizar la muestra y colocar un cubreobjetos. Observar al microscopio a 10x y 40x. Desechar los porta objetos en la bandeja de inactivación con cloro.

B. Técnica de Ritchie

1. Poner con un aplicador aproximadamente 1g de materia fecal en un vaso de precipitados y agregar 10 mL de solución salina isotónica.
2. Filtrar las heces bien homogeneizadas a través de una gasa colocada en un embudo. Recoger la suspensión en un tubo de centrifuga.
3. Centrifugar durante 45-60 segundos a 2000 rpm y desechar el sobrenadante.
4. Tirar el sobrenadante y añadir 2 a 3 mL de agua al sedimento, agitar y añadir agua hasta llenar el tubo.
5. Repetir los pasos 4, 5 y 6 tres o cuatro veces, hasta que el sobrenadante se torne claro y tirar el sobrenadante.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	106 de 155

6. Agregar 10 mL de formalina al 10% y dejar en reposo la suspensión durante 10 minutos (fijación). Agregar 5 mL de éter, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos.
7. Centrifugar a 1500 rpm durante 1 minuto, se debe observar que se formarán cuatro capas: éter, restos fecales, formol y sedimento.
8. Introducir una pipeta Pasteur y extraer cuidadosamente el sedimento.
9. Colocar una gota del sedimento en un portaobjetos.
10. Añadir una gota de Lugol, homogeneizar la muestra y colocar un cubreobjetos. Observar al microscopio a 10x y 40x. Desechar los porta objetos en la bandeja de inactivación con cloro.

RESULTADOS

Describir y elaborar esquemas de lo observado, tratando de identificar formas infectantes.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es el fundamento de las técnicas de Faust y Ritchie?
- 2) ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de los métodos de flotación?
- 3) ¿Qué otros métodos coproparasitoscópicos se utilizan para el diagnóstico de parasitosis?
- 4) ¿Qué técnicas se pueden utilizar en zonas rurales?
- 5) ¿Qué es el MIF en parasitología?
- 6) ¿Por qué es necesario usar colorantes para teñir a los protozoarios parásitos?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Romero C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana (4ª ed.). Editorial Panamericana. 4ª edición. 2018.
- MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	107 de 155

Diagnóstico de Amibiasis.

OBJETIVOS

- Comprender y explicar el ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.
- Identificar microscópicamente trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.
- Conocer los medios de cultivo apropiados para la ameba.
- Analizar las diferentes técnicas para el diagnóstico de amibiasis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La amebiasis es una infección humana producida por el protozooario *Entamoeba histolytica* y afecta sobre todo al intestino grueso. Su nombre significa intestino, ameba, tejido y lisis lo cual explica la naturaleza de la enfermedad que provoca. El protozooario se denomina ameba, pero se ha utilizado el término amiba de manera inapropiada. En la actualidad se ha propuesto el concepto entamoebosis, amebiosis o amebiasis para la enfermedad, por la raíz del nombre del agente causal.

Las dos fases más importantes del parásito son: el trofozoíto, que es la fase móvil, en la que se reproduce y durante la cual se ocasiona el daño al huésped; y el quiste, que es la fase de resistencia, infectante y el parásito permanece inmóvil.

El mecanismo de transmisión es el fecalismo, por lo que se contaminan alimentos, bebidas o fómites con materia fecal de individuos que eliminan los quistes.

Ciclo biológico

Los quistes entran por vía oral y avanzan al tubo digestivo hasta llegar al estómago. El pH del jugo gástrico y las enzimas hidrolíticas destruyen la pared del quiste. Pasan al duodeno como trofozoítos con cuatro núcleos, se divide cada núcleo y se forman trofozoítos con ocho núcleos, cada núcleo se separa y da lugar a ocho trofozoítos uninucleados (metaquiste). Migran por la luz del intestino hasta llegar al intestino grueso. Aquí comienza la transformación de trofozoíto a quiste. Los quistes abandonan el organismo junto con las heces en fase de quiste tetranucleado, binucleado o uninucleado. La transmisión también



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	108 de 155

puede ser por arrastre mecánico de quistes por transmisores biológicos (moscas) y actividad sexual anal.

Cuadro clínico

Los trofozoítos causan necrosis del epitelio intestinal, penetran la mucosa, y provocan una úlcera. Basado en los mecanismos patógenos, la amebiasis es variable en relación con los síntomas que causa en el ser humano. Los parásitos pueden establecerse sólo en el intestino grueso (ciego, sigmoide y recto), pero las cepas más patógenas son capaces de invadir otros órganos a través de vasos sanguíneos. Esto significa que la amebiasis puede ser intestinal o extraintestinal. Dentro de las complicaciones puede presentarse perforaciones del intestino, peritonitis, abscesos hepáticos, extenderse hasta el pulmón y cerebro.

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en hallazgos clínicos, pruebas de laboratorio y estudios de gabinete. Es importante considerar que los síntomas se pueden confundir con los de otras enfermedades por lo que debe realizarse diagnóstico diferencial.

En casos de amebiasis cutánea presente en recién nacidos se recomienda la “ameba en fresco”, mediante el empleo de cucharilla rectal, la muestra se observa directo en fresco en un portaobjetos y cubreobjetos bajo el microscopio a 40x.

La amebiasis intestinal se diagnostica con exámenes coproparasitoscópicos: estudio directo en fresco si la muestra es líquida, con revisión de moco y sangre. Se puede confirmar con rectosigmoidoscopia. Si la muestra es pastosa se recomienda una técnica de concentración.

Cultivo en medios axénicos, monoaxénicos y plurixénicos. Raspado de úlceras, biopsia de úlceras con estudio histopatológico, técnicas de tinción tricrómica o con hematoxilina férrica.

En casos de sospecha de amebiasis extraintestinal se pueden realizar pruebas serológicas como: contrainmunolectroforesis, inmunofluorescencia, ELISA, reacción de floculación, inhibición de hemaglutinación indirecta, precipitación en agar, fijación de complemento,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	109 de 155

inmovilización de trofozoítos, intradermorreacción con la histolicina. Se puede valorar el daño con placa radiográfica, colonoscopia, colon por enema, gammagrafía, centellografía, ultrasonografía, tomografía axial computada, resonancia magnética.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Microscopio.
- Papel seda.
- Preparaciones fijas de *Entamoeba histolytica*.
- Preparaciones fijas de *Entamoeba coli*.

SERVICIOS

- Agua y Luz.

PROCEDIMIENTO

1. Observar las preparaciones al microscopio a 4x, 10x y 40x una vez localizado el campo de interés se podrá observar a 100x usando el aceite de inmersión (solo con supervisión del profesor).
2. Limpiar el lente 100x con el papel seda cuidadosamente para no dejar ningún residuo. Si es necesario limpiar la preparación fija con papel seda para quitarle el aceite de inmersión.

RESULTADOS

Se sugiere reportar los resultados observados mediante esquema del ciclo biológico, dibujos de lo observado en el microscopio poniendo atención en identificar las fases infecciosas.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cómo es el ciclo de vida de la *Entamoeba histolytica*?
- 2) ¿Qué son los medios de cultivo axénicos, monoaxénicos y plurixénicos para aislar a las amebas?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	110 de 155

- 3) ¿Cuál es el cuadro clínico de la Amebosis intestinal?
- 4) ¿Qué otros tipos de amebosis se pueden presentar?
- 5) ¿Cuáles son las principales medidas higiénico-dietéticas para la prevención de la amebosis?
- 6) ¿En qué difiere la disentería amebiana de la disentería bacilar?
- 7) ¿La progresión de una úlcera típica producida por *Entamoeba histolytica* podría poner en peligro la vida del paciente?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	111 de 155

Módulo 5. Urogenital.

Diagnóstico de Sífilis.

OBJETIVO

- Conocer los estudios de laboratorio útiles en el diagnóstico de Sífilis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La Sífilis en el hombre es una enfermedad causada por el microorganismo *Treponema pallidum* que es un bacilo de forma espiral que mide alrededor de 0,2 μ de ancho y 5 a 15 μ de largo, es patógeno para el hombre y nunca ha sido cultivado en medios artificiales. Se desconocen los antígenos del *Treponema pallidum*, en el humano las espiroquetas estimulan la producción de anticuerpos capaces de teñir al *Treponema* por inmunofluorescencia directa, las espiroquetas causan también la producción de sustancias similares a un anticuerpo, la reagina, que da resultados positivos en las pruebas de fijación de complemento y de floculación. Tanto la reagina como los anticuerpos antitreponémicos pueden ser usados en el diagnóstico de Sífilis.

La infección con *Treponema* es exclusiva del hombre, ésta se transmite por contacto sexual y la lesión infecciosa se localiza en la piel o mucosas de los órganos genitales. Las espiroquetas se multiplican localmente en el sitio de entrada y algunas se diseminan a los ganglios linfáticos locales y alcanzan la corriente sanguínea, de 2 a 10 semanas después de la infección aparece la pápula en el sitio de entrada y se desintegra para formar una úlcera de base limpia y dura (chancro duro), la inflamación se caracteriza por el predominio de linfocitos y células plasmáticas.

La Sífilis pasa por periodos clínicos relativamente bien definidos: etapa primaria, secundaria, terciaria y latente. Las lesiones primarias y secundarias son ricas en espiroquetas y son muy infecciosas, en las lesiones terciarias los treponemas son muy raros



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	112 de 155

y la exagerada respuesta del tejido se atribuye a la hipersensibilidad, ocasionalmente se pueden encontrar treponemas en ojos o sistema nervioso central, en la Sífilis tardía.

En el diagnóstico de la Sífilis existen dos tipos de pruebas serológicas:

Inespecíficas (No treponémicas). Incluyen las pruebas de floculación como las de Khan, Mazzini, Kline, la prueba rápida de reagina. Las pruebas no treponémicas detectan anticuerpos IgG e IgM frente a cardiolipinas, colesterol y lecitina producidas por tejidos dañados por la treponema o por otras enfermedades. Por esta razón no son pruebas específicas para *Treponema pallidum* y RPR, que han demostrado ser muy útiles para el diagnóstico temprano de Sífilis se utilizan como tamizaje.

Específicas (Treponémicas). Detectan anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de *Treponema pallidum*. Las más comunes son FTA-AB'S y la TPHA, ELISA. La FTA-AB'S IgM es una prueba más específica, utiliza inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos séricos contra las espiroquetas, se efectúa en suero en Sífilis primaria y secundaria. Existen otras pruebas como TPI Ab (Anticuerpo Inmovilizante de *Treponema pallidum*).

Prueba de VDRL- Esta prueba usa una mezcla cuidadosamente balanceada de cardiolipina, lecitina y colesterol como antígeno de floculación. Es una sencilla prueba que se utiliza sobre un portaobjetos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Gradilla.
- Porta objetos.
- Microscopio.
- Material para venopunción (campo estéril, Jeringa de 5 mL estéril, ligadura, torundas con alcohol).
- 4 pipetas Pasteur.
- Bulbo para Pipeta Pasteur.
- Cuatro tubos de ensaye de 13 x 100.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	113 de 155

- 3 aplicadores de madera.
- Ag VDRL.
- Control Positivo.
- Control Negativo.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, obtener por punción venosa 5 mL de sangre de un voluntario sano, previo consentimiento del mismo.
2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100, dejar coagular a temperatura ambiente, se sugiere dejar en la estufa de 5 a 10 minutos para acelerar el proceso.
3. Retirar el coagulo con un aplicador de manera.
4. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
5. Como paso opcional se puede colocar el tubo con suero a baño maría a 60°C durante 1 minuto con la finalidad de inactivar una posible muestra peligrosa.
6. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo de ensaye nuevo.
7. Respetando la técnica aséptica, tomar un inculo (muestra) de *Staphylococcus aureus* con el asa bacteriológica estéril y suspenderla en el tubo que contiene plasma, incubar a 37°C por 90 minutos. Como paso opcional, se puede diluir 1:5 en solución salina el *Staphylococcus aureus* antes de inocular en el plasma (pregunte a su profesor).
8. En un porta objeto se colocará una gota del suero, en otro una gota de control positivo y en otro una gota de control negativo, ahí mismo agregar una gota del Ag VDRL a cada uno, teniendo precaución de no contaminar el reactivo.
9. Se hará la mezcla con un aplicador de madera y se "leerá" en el microscopio la presencia de aglutinación (formación de grumos). Si existe, la prueba será "positiva", de lo contrario será negativa.
10. Realizar la comparación de la muestra con suero con el control positivo y negativo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	114 de 155

RESULTADO

Leer al microscopio la presencia de aglutinación que se verá como la formación de grupos o una red, comparando la muestra con suero con los controles, para analizar correctamente los resultados como positivo fuerte (formación de agregados), positivo débil (agregados finos) y negativo (sin agregados).

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuáles son las características morfológicas de *Treponema pallidum*?
- 2) ¿Cuál es el mecanismo de transmisión de Sífilis?
- 3) ¿Cuáles son las etapas clínicas de la Sífilis?
- 4) ¿Qué pruebas inespecíficas conoce para el diagnóstico de Sífilis?
- 5) ¿Cuál es el agente causal de chancro blando, cuadro clínico y forma de diagnóstico?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	115 de 155

Urocultivo

OBJETIVOS

- Conocer género y especie de las bacterias que con mayor frecuencia ocasionan Infecciones del tracto urinario.
- Conocer indicaciones médicas para la toma de un urocultivo.
- Conocer los medios de cultivo, técnica de siembra y técnicas para el diagnóstico de las Infecciones urinarias.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La infección del tracto urinario (ITU) es la enfermedad más frecuente del aparato urinario que afecta principalmente a mujeres. Las infecciones de tracto urinario se definen como la presencia y proliferación de gérmenes en el tracto urinario. Habitualmente son bacterias raramente es micótica o vírica. Se pone en evidencia mediante el cultivo de orina en medios de crecimientos apropiados. Si hay bacterias crecerán formando colonias que pueden ser contadas como unidades formadoras de colonias por milímetro (UFC/m²).

Los factores que tienen influencia sobre el crecimiento de bacterias en la orina incluyen pH, osmolaridad, glucosuria, proteinuria, hematuria y el contenido de urea estas son de gran importancia en el crecimiento bacteriano.

Las bacterias que con mayor frecuencia ocasionan infecciones urinarias son: *Escherichia coli*, que causa el 80% de los casos, *Proteus mirabilis* (niños), *Klebsiella spp*, *Staphylococcus*.

El diagnóstico de las infecciones urinarias se hace demostrando bacteriuria por medio del cultivo. El urocultivo cuantitativo permite distinguir la bacteriuria significativa de la simple contaminación de la muestra.

Se utilizan diferentes técnicas para el urocultivo:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	116 de 155

Cuenta de leucocitos. El número de leucocitos se determina en el sedimento urinario, en una gota de orina que se deposita en un portaobjetos. Se observa el número de leucocitos por campo.

Cuenta de bacterias. Método con asa calibrada, el método cuantitativo que se utiliza de rutina es este y se utiliza un asa de 0.01 mL de capacidad. Se toma una asada de orina sin centrifugar y se hace una siembra por estría en toda la superficie de la placa, se utilizan medios de cultivo para Gram. positivos (agar Sangre, agar Chocolate, agar S110) y para Gram. negativos (EMB, Mac Conkey). En estas placas, la orina debe sembrarse e incubarse a 37 °C de 24 a 48 horas. Se multiplica por 100 el número de colonias que aparecen en la placa para determinar el número de bacterias que existen en un mililitro de orina.

Se utiliza también el método de papel absorbente en el cual se atrapan las bacterias en el poro de este y se coloca en los medios de cultivo ya mencionados. Se procede al conteo de las colonias en estos medios de cultivo. En general, las cuentas de menos de 10 000 bacterias por milímetro de orina indican contaminación. Cuando el número está entre 10 000 y 100 000 se sospecha de infección, y si es mayor a 100 000 UFC/ml se confirma la sospecha.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas calibradas 0.01 ó 0.001 mL.
- 1 caja de Agar sangre.
- 1 caja de Agar chocolate.
- 1 caja de Agar S110.
- 1 caja de Agar EMB o MacConkey.
- 1 caja de Agar Biggy.
- Muestra de orina (no más de 12 horas).

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	117 de 155

PROCEDIMIENTO

1. Coloque la muestra de orina cerca del mechero.
2. Agite suavemente la muestra y destápela (un alumno con guantes es quien debe abrir el frasco, mientras que el alumno que realiza la siembra no debe traer guantes).
3. Respetando la técnica aséptica, tomar una asada de orina y sembrar por estría simple en cada medio de cultivo proporcionado.
4. Incubar a 37 °C por 24 ó 48 horas y leer resultados.

RESULTADOS

Leer contando cada una de las colonias desarrolladas y multiplicar según el asa utilizada. Guardar los cultivos para efectuar la identificación en la siguiente clase.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuáles son los agentes causales más frecuentes de las infecciones urinarias?
- 2) ¿A qué pacientes indicaría un urocultivo?
- 3) ¿Cuál es la técnica para la toma de muestra de orina en mujeres?
- 4) ¿Si sospechara de infección por *Haemophilus*, en que medio sembraría y por qué?
- 5) ¿Es conveniente realizar un examen general de orina junto con el urocultivo, por qué?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	118 de 155

Observación de sedimento urinario.

OBJETIVOS

- Identificar con base en sus características químicas y fisiológicas los géneros y especies de los agentes causales de las infecciones en vías urinarias.
- Conocer el fundamento bioquímico de las pruebas utilizadas para la identificación de los géneros y especies de los microorganismos encontrados en los medios de cultivo.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La identificación de las bacterias empieza con la tinción de Gram, así como el crecimiento de las colonias en los medios de cultivo selectivos y diferenciales y por sus características morfológicas.

El empleo de pruebas bioquímicas es de gran ayuda para dar un resultado confiable y poder diferenciar el género y la especie causantes de dichas infecciones y poder establecer el diagnóstico y tratamiento oportuno.

La observación mas rápida para la identificación de bacterias por pruebas bioquímicas se relaciona con la utilización de carbohidratos, la motilidad bacteriana conferida por los flagelos en algunas bacterias, la producción de indol como parte de su metabolismo, producción de sulfuro ferroso, la capacidad de descomponer la urea y algunas otras características de cada uno de los componentes de cada bacteria.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	119 de 155

- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Tubos de ensaye de 18 x 150.
- Centrífuga.
- Tiras reactivas uroanálisis.
- Muestra de orina.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

- A. Observar la orina y reportar color, olor, aspecto, turbidez, densidad y cantidad.
- B. Examen químico.
 1. Sumergir la tira reactiva en orina bien mezclada y sin centrifugar, retirar la tira sin tocar las áreas reactivas con los dedos, en la orilla del frasco eliminar el exceso de orina.
 2. Verificar en el envase el tiempo para la lectura de resultados.
 3. Comparar el color de las áreas reactivas con la tabla de colores del envase, la lectura debe de realizarse con buena iluminación y en el tiempo requerido.
 4. Reportar por cruces, la densidad en valor numérico y cuando la tira marca leucocitos verificar con la observación microscópica.
- C. Examen de microscópico (sedimento urinario).
 1. Homogenizar la muestra en el frasco de recolección.
 2. Separar 10 mL en el tubo de ensaye (3/4 partes del tubo).
 3. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.
 4. Eliminar el sobrenadante decantando, dejando solo el sedimento y resuspender el sedimento.
 5. Colocar una gota pequeña en un portaobjeto bien limpio, de preferencia nuevo, colocar un cubreobjetos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	120 de 155

6. Observar al microscopio con poca luz o luz amortiguada (se logra cerrando parcialmente el iris del diafragma y ajustando el condensador hacia abajo hasta lograr el contraste óptimo) para lograr el mayor contraste que facilite no pasar por alto elementos como los cilindros y algunos cristales.
7. Enfocar primero a 10x y luego a 40x. Deben observarse por lo menos 15 campos y promediar para reportar los resultados.

RESULTADOS

Reportar los resultados en forma subjetiva las bacterias o cristales (escasos, regular cantidad, abundante, etc.), las células y cilindros en número por campo, las Trichomonas sólo como positivo, etc. Realizar el análisis e interpretación de los resultados.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es el fundamento de la prueba TSI y cómo reportaría esta prueba en caso de encontrar *Proteus* y *Escherichia coli*?
- 2) ¿Cuántos aspectos se pueden determinar en el medio SIM?
- 3) ¿Si encontramos crecimiento en el medio S110, qué pruebas utilizaría para la identificación de especie?
- 4) ¿Cuál es el fundamento de la prueba Caldo urea?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	121 de 155

Identificación de bacteria en orina

OBJETIVO

- Realizar la identificación de bacterias en orina e interpretar los resultados usándolos como herramienta diagnóstica.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Desde la antigüedad se ha reconocido que el examen de la orina constituye uno de los indicadores más importantes del estado de salud. Por ello es que el análisis de orina en la mayoría de los casos permite dar un diagnóstico e incluso orientar a un tratamiento, así como la detección de afecciones del metabolismo o sistémicas que no tiene relación directa con el sistema urinario, infecciones de vías urinarias como un estudio previo a la realización de un urocultivo.

La composición de la orina depende, entre otras causas, del estado nutricional del paciente, así como la situación metabólica y la capacidad funcional del riñón. Esta compleja constitución alberga numerosos elementos en cantidades totalmente distintas como lo son urea, cloruros, ácido úrico, creatinina, aminoácidos, metabolitos intermedios como ácido oxálico o pirúvico, ácidos grasos libres, indicios de colesterol, hormonas, vitaminas, vestigios de metales y componentes celulares entre otros componentes. Lo que nos indica que su análisis es algo complicado.

Para que el análisis de la orina sea confiable deberá ser la primera micción matutina colectada a chorro intermedio en un frasco de boca ancha bien limpio y seco, la muestra tendrá un volumen no mayor de la mitad de la capacidad del frasco para que permita mezclarla (alrededor de 40 mL), el análisis deberá efectuarse en las 3 primeras horas de emitida la muestra, aunque para pruebas muy específicas estas indicaciones pueden variar pudiéndose refrigerar por unas horas si el análisis no puede efectuarse al momento y hasta agregar conservadores.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	122 de 155

El análisis se estudia normalmente desde un triple punto de vista:

Examen físico. Que incluye color, aspecto, turbidez (una orina recién emitida es límpida o ligeramente turbia, pero puede enturbiarse debido a la refrigeración por precipitación de uratos amorfos) y densidad (anteriormente se utilizaban un urinómetro o un refractómetro ahora este análisis está dentro de los parámetros que mide la tira reactiva).

Examen químico. Antiguamente se basaba en reacciones químicas que ponían de manifiesto los compuestos químicos que se deseaba analizar y necesitando para ello todo un laboratorio de química analítica, en la actualidad este estudio se ha simplificado por el uso de tiras reactivas simples o múltiples por lo que ahora es un estudio sensible y rápido con el que se puede analizar hasta 9 pruebas diferentes en 60 segundos. Incluye determinaciones de densidad, pH, proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta, bilirubinas, urobilinógeno, reducción de nitritos, etc.

Examen microscópico. Este examen constituye una parte vital del análisis urinario, es una herramienta diagnóstica muy valiosa para la detección y evaluación de trastornos renales y del tracto urinario así como de otras enfermedades sistémicas, la mejor muestra es la primera de la mañana que está más concentrada y debe de observarse lo antes posible para evitar degeneración de células y cristales, si no es posible puede refrigerarse unas horas, aunque en orinas alcalinas y baja densidad pueden disolverse los cilindros o lisarse los eritrocitos, en ocasiones pueden utilizarse colorantes pero pueden enmascarar otras estructuras. En este análisis se incluye la observación de células (leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, etc), cristales, cilindros, microorganismos (bacterias, parásitos, hongos, etc), estructuras diversas (espermatozoides, filamentos de moco, gotas de grasa), artefactos (cristales de almidón, talco, vidrio, fibras, cabello, polen, etc.).

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	123 de 155

- Microscopio.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.
- 1 tubo TSI.
- 1 tubo SIM.
- 1 tubo Caldo manitol rojo de fenol.
- 1 tubo Caldo urea.
- 1 tubo Citrato de Simmons.
- Cultivos de la sesión anterior.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. A partir de los cultivos obtenidos de la sesión anterior revisar la morfología colonial e identificar colonia prototipo.
2. Respetando la técnica aséptica, tomar una asada de una colonia seleccionada del medio de cultivo EMB o Mac Conkey y sembrar en cada uno de los medios proporcionados.
3. Respetando la técnica aséptica, realizar un frotis de la misma colonia seleccionada y realizar la tinción de Gram, observar al microscopio a 10x y 40x. Desechar el porta objetos en la bandeja de inactivación con cloro.
4. Etiquetar e incubar los tubos con los medios inoculados a 37°C por 24 horas y leer los resultados.

RESULTADOS

Observar y reportar detalladamente las diferencias físicas en la morfología colonial que se desarrolló en los diferentes medios de cultivo, la morfología microscópica observada en la tinción de Gram y los resultados de las pruebas bioquímicas; a partir de estos resultados proponer un diagnóstico.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	124 de 155

CUESTIONARIO

- 1) ¿Describe que factores pueden modificar la flora vaginal?
- 2) ¿Si encontramos un número importante de bacterias, qué otros aspectos se deben considerar para diagnosticar una infección?
- 3) ¿Si encontramos un pH ácido que tipo de cristales esperamos encontrar?
- 4) ¿Qué tipo de cilindros podemos encontrar en una pielonefritis?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	125 de 155

Cultivo de secreciones uretrales y vaginales.

OBJETIVO

- Conocer la importancia de la toma de muestra de secreciones uretrales y vaginales para identificar así el agente causal.
- Conocer los medios de cultivo útiles en la siembra de estas secreciones para así identificar el agente causal.
- Conocer la técnica de Gram para identificar si son Gram positivos o negativos, hacer observación directa para ver si encontramos Trichomonas, leucocitos, etc.
- Establecer un diagnóstico confirmatorio y establecer la terapéutica indicada a partir de la técnica utilizada.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En el exudado cérvico vaginal y uretral implica la investigación tanto de componentes de la flora normal como de la patógena. Los patógenos son generalmente de transmisión sexual y las principales especies patógenas son: *Nesisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* y *Haemophylus ducrey*, producen infecciones en la uretra, cérvix y vagina en la mujer y en el hombre en la uretra y la próstata, es común que la mujer sufra también infecciones en el recto.

Los componentes de la flora normal generalmente son Lactobacilos (bacilos de Döderlein) y Estreptococos alfa hemolíticos cuyas alteraciones pueden indicar infecciones o cambios funcionales del aparato genital femenino. La presencia de bacterias, levaduras y protozoarios como microorganismos importantes nos exige el empleo de una amplia utilización de métodos de estudio, como sería microscopia y medios de cultivo para poder identificar que produce esta infección.

En las infecciones crónicas con manifestaciones clínicas o sin ellas, es muy difícil tanto en hombres como en mujeres encontrar *Nesisseria gonorrhoeae*, por microscopía y se vuelve



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	126 de 155

más difícil en mujeres asintomáticas, en este caso los cultivos bacteriológicos dan resultados positivos.

Toma de muestra en mujeres.

Cérvix: es el mejor sitio para tomar una muestra. Es importante tener en cuenta que el diagnóstico de las infecciones genitales se establece mediante: la historia clínica, la exploración física y los estudios de laboratorio indicados para confirmar el agente causal del cual sospechamos (microscopia y medios de cultivo).

Para la toma de muestra se debe usar el espejo vaginal y dos hisopos estériles, es conveniente el uso de hisopos de alginato, humedecidos en agua destilada o solución salina. Se debe introducir el espejo vaginal y con un primer hisopo limpiar el moco que recubre el cérvix, mientras que con un segundo hisopo se realiza el exudado endocervical. Se debe sembrar con cada uno de ellos en los medios de cultivo indicados. También se recomienda con un tercer hisopo hacer frotis y observación microscópica en fresco para buscar *Trichomonas*, levaduras, leucocitos, células epiteliales, etc.

Recto: De este sitio se pueden obtener cultivos positivos cuando el cultivo de cérvix es negativo. Para la toma de muestra, se debe limpiar perfectamente la zona perianal, introducir en el recto como a unos 2.5 cm de profundidad el número necesario de hisopos hasta que salga limpio de materia fecal visible. Se debe introducir un hisopo humedecido presionar las paredes del recto (criptas) para recolectar la muestra y sembrar en los medios de cultivos indicados.

Vagina: Se debe tomar la muestra de las paredes del fondo de saco y de las paredes laterales profundas de la vulva (glándulas de Bartolini) sembrar en los medios de cultivo indicados, hacer microscopia en fresco para observar (*Trichomonas*, leucocitos, etc.) y frotis con Gram.

Uretra: Se debe limpiar la zona del meato urinario, introducir un centímetro de hisopo húmedo y comprimir las paredes de la uretra (glándulas de Skene), sembrar en los medios adecuados, hacer microscopia, incubar y seguir la metodología descrita.

Toma de muestra en hombres.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	127 de 155

Uretra: el sitio más común de la infección gonocócica. Se debe tomar la muestra en las primeras horas de la mañana antes de que el paciente orine, hacer un aseo escrupuloso previo con agua y jabón, en el laboratorio indicar al paciente que se exprima el pene si hay exudado suficiente tomar la muestra directa y sembrarlo en los medios de cultivo indicados, tomar muestra para un exudado en fresco si no es suficiente introducir el hisopo 2 cm sembrar en los medios de cultivo y observar si hay (Trichomonas, leucocitos, etc.), hacer frotis con Gram.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- 1 caja de Agar Biggy.
- 1 caja con Agar Harina de maíz.
- 1 caja con Agar chocolate.
- Preparaciones fijas de frotis exudados vaginales y uretrales.
- Microscopio.
- Papel seda.

CEPAS

- *Neisseria gonorrhoeae*.
- *Candida albicans*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	128 de 155

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, realizar un frotis con las cepas proporcionadas y realizar la tinción de Gram, observar al microscopio a 10x y 40x. Desechar el portaobjetos en la bandeja de inactivación con cloro.
2. Respetando la técnica aséptica, sembrar en los medios de harina de maíz y Biggy la cepa de *Candida albicans*.
3. Respetando la técnica aséptica, sembrar en agar chocolate la cepa de *Neisseria gonorrhoeae*.
4. Etiquetar los medios e incubar por 24 horas a 37 °C y leer resultados.
5. Observar las preparaciones fijas de frotis exudados vaginales y uretrales al microscopio a 4x, 10x y 40x una vez localizado el campo de interés se podrá observar a 100x usando el aceite de inmersión (solo con supervisión del profesor).
6. Limpiar el lente 100x con el papel seda cuidadosamente para no dejar ningún residuo. Si es necesario limpiar la preparación fija con papel seda para quitarle el aceite de inmersión.

RESULTADOS

Reportar los resultados de cada cepa como morfología colonial en el caso de los cultivos y la morfología microscópica observada en la tinción de Gram. Describir lo observado en las preparaciones fijas poniendo atención en estructuras que coincidan con lo observado en las cepas.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Mencione los agentes causales más frecuentes de las vulvovaginitis?
- 2) ¿Mencione los medios de cultivo indicados en las infecciones genitales?
- 3) ¿Describa las características morfológicas de la *Trichomonas vaginalis*?
- 4) ¿Mencione las tinciones indicadas en las infecciones genitales?
- 5) Modulo sistema nervioso y órgano de los sentidos.



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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	129 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de
importancia médica. Argentina: Médica panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	130 de 155

Módulo 6. Sistema nervioso y órganos de los sentidos.

Meningitis bacteriana

OBJETIVO

- Identificar los agentes causales de meningitis bacteriana y los estudios para su diagnóstico.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La meningitis bacteriana se define como un proceso inflamatorio producido por la infección bacteriana de la piamadre, aracnoides vascular, líquido cefalorraquídeo, ventrículos cerebrales, plexo coroideo y otros órganos del sistema nervioso, convirtiéndose en una infección cerebroespinal. Dentro de los agentes causales, *Haemophilus influenzae* es la causa más frecuente de muerte, seguido de *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*.

Cuadro clínico

Los signos clínicos de meningitis bacteriana varían de acuerdo al grupo de edad en que se presente. En el periodo neonatal los signos clínicos son inespecíficos e insidiosos y habitualmente se manifiestan como un evento de sepsis temprana y que puede incluir: inestabilidad en la temperatura corporal, rechazo al alimento, apnea, bradicardia, mala coloración tegumentaria, ictericia, irritabilidad, fontanela abombada que se observa en una tercera parte de los casos, llanto agudo, letargia, crisis convulsivas que ocurren en un 40%, sin embargo, no hay signos específicos.

En el periodo de 1 a 3 meses el lactante aun no muestra signos específicos de irritación meníngea y puede exhibir solamente signos de irritabilidad, somnolencia, fontanela abombada, rechazo al alimento y fiebre de bajo grado. Si el lactante esta séptico, presentara



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	131 de 155

datos de choque e hipotensión, pobre perfusión periférica con retardo en el llenado capilar (>2 segundo), taquicardia, taquipnea y cianosis.

En el lactante de 3 a 18 meses los signos cardinales de irritación meníngea son gradualmente más evidentes conforme avanza la edad, presentando los signos de Kerning y/o Brudzinski, la cefalea es común en el escolar y niño mayor, crisis convulsivas, rigidez de nuca, vómitos, fiebre, puede haber fotofobia, papiledema y parálisis de nervios craneales.

Se debe considerar un evento de meningitis en todo recién nacido con proceso de sepsis, y en los diferentes grupos etarios en quienes exista la presencia de fiebre y que a la exploración física se encuentren datos de letargia, somnolencia, rigidez de nuca, crisis convulsivas y datos de irritación meníngea; en todos estos casos es prioritario realizar una punción lumbar, la cual continua siendo la prueba más importante para diagnóstico temprano de meningitis bacteriana, mediante el análisis cuidadoso del líquido cefalorraquídeo.

Diagnóstico

El diagnóstico se sospecha principalmente en padecimientos agudos febriles que se acompañan de anormalidades neurológicas y se confirma mediante el examen de LCR. La punción lumbar para la obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR) constituye el procedimiento diagnóstico más importante. Los resultados de este estudio permiten orientar o, incluso, establecer el diagnóstico. El diferencial se debe realizar entre meningocelulitis viral y bacteriana. Los parámetros que orientan a etiología bacteriana son 5:

- 1) El aspecto macroscópico turbio o incluso purulento (dado por el mayor contenido de células y proteínas).
- 2) El número de células: en la mayoría de los casos el número de leucocitos polimorfonucleares es superior a 500 mm^3 .
- 3) Predominio de leucocitos polimorfonucleares (mayor al 50%).
- 4) Hipoglucorraquia (<50% de la glucemia central o glucorraquia <40 mg/dl).
- 5) Hiperproteinorraquia moderada (entre 200 y 500 mg/dl).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	132 de 155

Tabla 1. Diagnóstico diferencial de las meningitis por el estudio del LCR

	Presión	Aspecto	Células	Proteínas	Glucosa
LCR normal	8-20 cmH ₂ O	Claro	<5/mm ³	15-45 mg%	65-80% de la glucemia
M. bacteriana	alta	turbio	1000-20000 pmn	100-1000	muy baja
M. vírica	normal/alta	claro	<300 mn	40-100	normal
M. tuberculosa	alta	opalescente	50-300 mn	60-700	baja
M. fúngica	alta	opalescente	50-500 mn	100-700	baja
M. carcinomatosa	alta	claro/turbio	20-300 mn y tumorales	60-200	baja

LCR: líquido cefalorraquídeo. M: meningitis. mn: mononucleares. pmn: polimorfonucleares

Fuente: secretaria de salud. guía de práctica clínica. (2010). Diagnóstico, tratamiento y prevención de la meningitis aguda bacteriana adquirida en la comunidad en pacientes adultos inmunocompetentes, México. Pag.51. Disponible en: <http://evaluacion.ssm.gob.mx/pdf/gpc/eyr/SS-310-10.pdf>

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Porta y cubre objetos.
- Microscopio.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.
- 1 caja de Agar sangre
- 1 caja con Agar chocolate.
- 1 caja de Agar EMB.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	133 de 155

CEPAS

- *Escherichia coli*.
- *Neisseria spp.*
- *Streptococcus pneumoniae*.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, tomar una asada de la cepa de *Escherichia coli*, realizar un frotis, la tinción de Gram y observar al microscopio a 10x y 40x. (Observación a 100x solo con supervisión del profesor). Desechar el porta objetos en la bandeja de inactivación con cloro.
2. Hacer lo mismo con las demás cepas.
3. Respetando la técnica aséptica, sembrar por estría cruzada o de aislamiento las cepas en los medios indicados.
4. Etiquetar los medios e incubar durante 48 horas a 37 °C y leer resultados

RESULTADOS

Reportar y realizar esquemas sobre características microscópicas y morfología colonial.

CUESTIONARIO

- 1) Menciona el fundamento de los medios de cultivo utilizados en la práctica.
- 2) Menciona 5 bacterias que pueden producir meningitis.
- 3) Menciona otros 3 métodos para el diagnóstico de meningitis.
- 4) ¿Qué factores influyen en la presentación de la enfermedad?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	134 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kumate Rodriguez, J; Trujillo G. G; Hernández O. M. (2016). Infectología clínica. México: Méndez editores.

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica panamericana.

Mason Robert, J. (2015). Microbiología médica. Países Bajos: Elsevier.

Secretaría de salud. Guía de práctica clínica. (2010). Diagnóstico, tratamiento y prevención de la meningitis aguda bacteriana adquirida en la comunidad en pacientes adultos inmunocompetentes, México. Pag.51. Disponible en: <http://evaluacion.ssm.gob.mx/pdf/gpc/eyr/SS-310-10.pdf>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	135 de 155

Meningitis viral.

OBJETIVO

- Identificar las principales características biológicas de los métodos de cultivo e identificación de los principales agentes causantes de meningitis viral.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La meningitis viral o meningitis aséptica (Meningitis linfocitaria), es una infección aguda que afecta a órganos del Sistema Nervioso Central y del Sistema Nervioso Periférico, por lo que también es conocida como meningoencefalitis. Muchos aspectos clínicos de estas enfermedades dependen de los órganos afectados, si la infección se limita fundamentalmente a las meninges (meningitis) o si se extiende hasta el parénquima cerebral (encefalitis), a la médula espinal (mielitis), o ambas estructuras (mielo-meningo-encefalitis).

Actualmente se han identificado un gran número de virus como agentes causales de meningitis, sin embargo, solo en el 50% al 70 % de los casos de meningitis linfocitarias agudas o meningitis aséptica se identifica al agente causal.

En la familia o grupo de los Enterovirus, se encuentran especialmente los subgrupos Coxsackie virus A y B y los ECHO virus como agentes causantes de meningitis y encefalitis.

El virus de la parotiditis es también uno de los más frecuentes, aunque va en disminución, debido a la vacunación, estos virus son responsables del 80 % de las meningitis en las que se identifica al agente. Le siguen el virus herpes, simple (tipo II), el virus de la coriomeningitis linfocitaria y los adenovirus.

El inicio de los síntomas suele ser brusco, con fiebre, malestar general y cefaleas. La cefalea asociada a la meningitis viral es de localización frontal o retroorbitaria y a menudo se asocia a fotofobia y dolor con el movimiento ocular, puede haber náuseas con vómito en proyectil.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	136 de 155

El examen del LCR es un aspecto importante y con frecuencia fundamental en la valoración de los pacientes con una infección del SNC. En estas situaciones es esencial la práctica de una técnica correcta y de un estudio meticuloso del LCR.

SERVICIOS

- Luz.

PROCEDIMIENTO

Presentación de Seminario.

RESULTADO

Cada mesa de trabajo realizará un análisis de la información presentada y realizará las conclusiones mas importantes al respecto.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Qué aspectos incluye el análisis del LCR?
- 2) ¿Qué indica el aumento de leucocitos entre 100 y 200 por mm³ en una muestra de LCR?
- 3) ¿Qué alteraciones se pueden encontrar en el examen físico del LCR en el caso de meningitis viral?
- 4) ¿Qué alteraciones se pueden encontrar en el examen citológico del LCR en el caso de meningitis viral?
- 5) ¿Qué alteraciones se pueden encontrar en el examen químico del LCR en el caso de meningitis viral?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mason Robert, J. (2015). Microbiología médica. Países Bajos: Elsevier.

Kumate Rodríguez, J; Trujillo G. G; Hernández O. M. (2016). Infectología clínica. México: Méndez editores.

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica panamericana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	137 de 155

Observación de *Cysticercus cellulosae*.

OBJETIVO

- Reconocer e identificar las características morfológicas macroscópica y microscópica de *Taenia solium*.
- Enfatizarlas características de la fase larvaria (*Cysticercus cellulosae*).
- Describir el ciclo de vida de *Taenia solium*.
- Identificar los métodos de diagnóstico de laboratorio de teniasis y cisticercosis.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La taeniasis-cisticercosis es una zoonosis, enfermedad emergente en países industrializados por la migración de zonas endémicas, México se cataloga como zona endémica y esta parasitosis prevalece en áreas rurales con marginación donde el cerdo se alimenta con materia fecal contaminada con huevos de *Taenia solium*.

Ciclo biológico, *Taenia solium* es un helminto gusano plano segmentado clasificado como cestodo hermafrodita cuyo hospedero definitivo es el hombre que alberga en su intestino delgado la forma adulta de *Taenia solium* y hospedero intermediario el cerdo que alberga forma larvaria o cisticercosis.

La teniasis se adquiere por ingesta de carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida con fase larvaria de *Taenia solium* enquistada llamada *Cysticercus cellulosae* o metacéstodo, está dentro de una vesícula blanca-amarillenta ovalada o redonda de 0.5 a 1.5 cm de diámetro, dentro se ve el cisticerco como esferas o gránulos blanquecinos suspendidas en un líquido, tiene compartimiento interno que se invagina formando el escólex visible, compartimiento externo líquido vesicular, y cubierta externa, el exocólex se invagina en estómago e intestino y al alcanzar duodeno se fija con sus ventosas y ganchos, crece hasta



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	138 de 155

forma adulta de *Taenia solium* que mide 2-7 m de longitud, extremo anterior con excolex (1 mm diámetro) 4 ventosas, un róstelo con doble cadena de 25-30 ganchos, cuello y estróbilo con 1000 segmentos o proglótides, los más lejanos al cuello son maduros o grávidos con ramas uterinas (7-13 a cada lado del útero) y alojan huevos (> 50 000), los proglótides se desprenden periódicamente y salen al exterior durante la defecación, así llegan al suelo y pueden contaminar agua y verduras, o bien tras medidas higiénicas deficientes (ausencia o mal lavado de manos) contaminar alimentos y su consumo tanto por cerdos y humanos causa cisticercosis pues se ingieren fase de huevos de *Taenia solium* que son esféricos y de 47-77 μm , cubiertos por la membrana de la oncoesfera y el embrióforo les confiere gran resistencia en estómago e intestino delgado, eclosionan los embriones hexacanto u oncosferas mediante sus proteasas y ganchos penetran intestino delgado, perforan vasos sanguíneos e ingresan a torrente sanguíneo migrando a musculo estriado, corazón, cerebro, ojo y tejido subcutáneo, en su destino se establecen, se desarrollan y crecen, adquieren estructura vesiculosa y se forma el escólex en la pared interna de la vesícula; después de 8 semanas completan su desarrollo y alcanzan su fase de larvaria ó cisticerco.

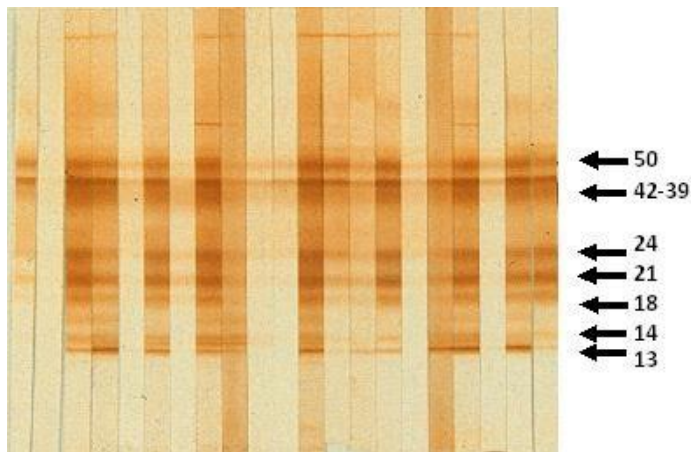
Cuando los cisticercos se localizan en el Sistema Nervioso central causan Neurocisticercosis (NCC) con cisticercos viables (estado vesicular), cisticercos no viables (estados coloidales, nodular-granular y calcificado) cuyas manifestaciones se deben al efecto de masa, intensidad de respuesta inflamatoria perilesional u obstrucción de los orificios encefálicos y sistemas ventriculares. Los datos neurológicos son variados e inespecíficos y son determinados en gran parte por el estadio, número, localización y modulación de respuesta inmune de los cisticercos además de la edad, sexo y tipo de reacción inmunológica que establece el huésped. En área endémica mas del 50% de epilepsias se deben a NCC.

El diagnóstico de teniasis por demostración de huevos o proglotidos en heces en coproparasitoscópicos de concentración, coproantígenos por ELISA. NCC pruebas inmunológicas ELISA, e inmunotransferencia con antígenos del metacéstodo y pruebas serológicas por Western- blot principalmente con anticuerpos monoclonales en LCR o suero



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	139 de 155

del paciente encontrando IgG como inmunoglobulina predominante en la respuesta humoral.



Test Inmunoblot de la CDC con antígenos purificados de cisticerco de *Taenia solium* (Disponible en USA). Anticuerpos específicos para cisticercos reaccionan con glicoproteínas de cisticerco de *Taenia solium*. La masa molecular de 7 glicoproteínas diagnósticas se expresa en KDaltons y se marcan con flechas. Un resultado positivo es una reacción con alguno de estos 7 antígenos glicoproteínas específicas de cisticerco. Tomado: Diagnostico de laboratorio cisticercosis en <http://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/index.html>

MATERIAL Y REACTIVOS

- Papel seda.
- Microscopio.
- Preparaciones fijas de huevos de *Taenia solium*.
- Preparaciones fijas con proglotidos grávidos de *Taenia solium* y *Taenia saginata*.
- Preparaciones fijas de cisticerco cellulosa de *Taenia solium* en cortes de cerebro humano.
- Cisticercos de *Taenia saginata* conservados en formol.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	140 de 155

SERVICIOS

- Agua y Luz.

PROCEDIMIENTO

1. Observar las preparaciones fijas al microscopio a 4x, 10x y 40x una vez localizado el campo de interés se podrá observar a 100x usando el aceite de inmersión (solo con supervisión del profesor).
2. Limpiar el lente 100x con el papel seda cuidadosamente para no dejar ningún residuo. Si es necesario limpiar la preparación fija con papel seda para quitarle el aceite de inmersión.

RESULTADOS

Realizar el registro de lo observado en el microscopio mediante diagramas, poniendo atención a las formas infectantes (importante diferenciar la fase larvaria y las fases de huevo de *Taenia solium* y *Taenia saginata*).

Tipo de laminilla o muestra	Observación microscópica (Describir características morfológicas)	Esquema (Dibujar y señalar con flechas las características observadas)
Huevos de <i>Taenia solium</i>		
Proglótidos grávidos de Taenias		
<i>Cisticerco cellulosa</i> en cerebro		
Cysticercus en formol		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	141 de 155

CUESTIONARIO

- 1) Explicando el ciclo biológico del huésped definitivo e intermediario, fase infectiva en teniasis y cisticercosis.
- 2) Explique la trascendencia de teniasis sobre neurocisticercosis y las pruebas de diagnóstico de laboratorio pertinentes
- 3) Elabore un esquema grafico con las técnicas para diagnóstico de laboratorio de neurocisticercosis
- 4) Describa el ciclo biológico de *Taenia solium* especificando las derivaciones en teniasis y cisticercosis.
- 5) ¿Qué relación tiene la oncosfera con la inmunidad del hospedero?
- 6) ¿Cuáles son los productos biológicos a utilizar para el diagnóstico de teniasis y cisticercosis?
- 7) ¿Cuáles son las técnicas de laboratorio indicadas para el diagnóstico de la neurocisticercosis?
- 8) ¿Cuáles son las técnicas de laboratorio indicadas para el diagnóstico de Teniasis?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Becerril Flores, M. A. (2014). Parasitología médica. España: McGraw.Hill.

Rodríguez Pérez, E. G. (2013). Parasitología médica. Colombia: Manual moderno.

De Aluja A.S., Suarez M.R., Sciutto C.E., et. al. (2014) Evaluación del impacto de un programa de control de la teniasis-cisticercosis (*Taenia solium*), Salud Pública de México. 2014. 53(3):
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342014000300011&lng=es&nrm=iso

Del Brutto, Oscar H. (2013). Cisticercosis humana y su diagnóstico inmunológico. Acta Neurológica Colombiana, 29(2), 69-70. Retrieved July 22, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87482013000200001&lng=en&tlng=es.



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

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	142 de 155

Polanco N.A. (2016). Caso clínico Neurocisticercosis en enfermedad renal crónica. Rev Med. Int Mex. 2016. 32(2): 249-255.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2016/mim162m.pdf>

Tuero I., Palma S., Cabeza F., et. al. (2015) A Comparative Study of Peripheral Immune Responses to *Taenia solium* in Individuals with Parenchymal and Subarachnoid Neurocysticercosis. PLoS Negl Trop Dis, 2015; 9(10): e0004143.
doi:10.1371/journal.pntd.0004143

CDC. Diagnóstico de laboratorio cisticercosis en
<http://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/index.html>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	143 de 155

Cultivo de *Clostridium*.

OBJETIVO

- Conocer las características morfológicas, de tinción y condiciones de cultivo del género *Clostridium*.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias de género *Clostridium* son bacilos anaerobios grandes que miden hasta 4 micras de longitud por una micra de ancho, son grampositivos dotados de motilidad. Muchos descomponen las proteínas o forman toxinas y algunos hacen ambas cosas. Su hábitat natural es el suelo o el conducto intestinal de animales y humanos, donde viven como saprofitos. Las especies de importancia médica del género *Clostridium* son cuatro y son los microorganismos causantes de la gangrena gaseosa, de la colitis pseudomembranosa, del tétanos y del botulismo, siendo estos dos últimos los causantes de las afecciones en el SNC.

Clostridium botulinum

Los subtipos de *Clostridium botulinum* son bacterias Gram positivas, hemolíticas, anaerobias estrictas, que miden hasta 4 micras de longitud por una micra de ancho, son móviles por poseer flagelos peritricos. Las esporas son subterminales muy resistentes al calor, resisten 100oC al menos 3 a 5 horas. Los subtipos de *Clostridium botulinum* se distinguen por el tipo antigénico de la toxina que producen, aunque todas actúan de forma similar. La resistencia al calor de la toxina, disminuye en pH ácido o en una concentración alta de sal. En agar sangre producen colonias redondas de 3 milímetros de diámetro, semitransparentes, convexas, con una zona de hemólisis alrededor. El *Clostridium botulinum*, es el causante del botulismo, la bacteria se distribuye en todo el mundo; se encuentra en el suelo y a veces en las heces de los animales.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	144 de 155

Clostridium tetani

Clostridium tetani es el agente causal del tétanos; se trata de microorganismos grampositivos, anaerobios estrictos, que miden hasta 4 micras de longitud por una micra de diámetro, tienen forma de palillo de tambor con esporas terminales esféricas. En agar sangre las colonias son puntiformes, translúcidas, con aspecto granular, de bordes irregulares en inicio presentan hemólisis alfa y finalmente hemólisis beta. *Clostridium tetani* es de distribución mundial, se encuentra en el suelo, en las heces de caballos y de otros animales. Se pueden distinguir varios tipos mediante antígenos flagelares específicos. Todos comparten un antígeno O común (somático), a veces enmascarado y todos producen el mismo tipo antigénico de neurotoxina, la tetanospasmina.

Género	Toxina	Fisiología
<i>Clostridium botulinum</i> (Botulismo)	Toxina botulinica (siete variedades (A-G) A, B y E (ocasiones F) principales enfermedades en el ser humano. A y B se vincula con los alimentos. C causa botulismo en aves. D causa botulismo en mamíferos E principalmente en alimentos de pesca.	La toxina se absorbe en el intestino, pasa a torrente sanguíneo y a ganglios uniéndose a receptores de membrana presináptica en neuronas motoras del SNP y pares craneales. Inhibiendo la liberación de Acetil colina dando como resultado la ausencia y la presencia de parálisis.
<i>Clostridium tetani</i>	Toxina tetanospasmina	Se fija a receptores de membrana degradando a la sinaptobrevina (proteína necesaria para la aproximación de vesículas neurotransmisoras a la membrana presináptica), bloqueando la liberación de glicina y ácido γ -aminobutírico pero no inhibe las neuronas motoras. Esto da como resultado hiperreflexia, espasmos musculares y parálisis espástica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	145 de 155

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- 1 caja de Agar sangre
- 1 tubo de caldo Tioglicolato.
- Colorantes para tinción de esporas: Verde de malaquita, Safranina.
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, Alcohol acetona, Safranina.

CEPAS

- *Clostridium spp.*

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

1. Respetando la técnica aséptica, tomar un inóculo liviano y sembrar la placa de agar sangre por la técnica de estría cruzada o de aislamiento.
2. Respetando la técnica aséptica, tomar un inóculo liviano y sembrar en el caldo de tioglicolato por la técnica de agitación.
3. Respetando la técnica aséptica, realizar dos frotis en uno realizar la tinción de Gram y en otra la técnica de Shaeffer-Fulton.
4. Etiquetar los medios y tubos e incubar por 24 horas a 37 °C, para leer resultados.

RESULTADOS

Reportar y realizar esquemas sobre características microscópicas y morfología colonial. Recordando que en la técnica de Shaeffer-Fulton las esporas se tiñen de color verde y el citoplasma de color rojo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	146 de 155

CUESTIONARIO

- 1) Explique de manera breve dos técnicas empleadas en el laboratorio para generar anaerobiosis.
- 2) ¿Cuál es el mecanismo de acción de las principales toxinas tetánicas?
- 3) ¿Cuál es el mecanismo de acción de la toxina botulínica?
- 4) Mencione dos medios de cultivo para Clostridium.
- 5) ¿Qué condiciones favorecen la generación de potenciales bajos de oxido-reducción?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kumate Rodríguez, J; Trujillo G. G; Hernández O. M. (2016). Infectología clínica. México: Méndez editores.

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	147 de 155

Identificación del género *Clostridium*.

OBJETIVO

Conocer las principales pruebas para la diferenciación de las especies de *Clostridium* que afectan al Sistema Nervioso Central.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Tanto para la confirmación de género como para la identificación de las principales especies de importancia clínica, resulta de vital importancia el estudio de las características metabólicas de los microorganismos a estudiar, lo cual es llamado con frecuencia estudio bioquímico o pruebas bioquímicas. Estas pruebas se realizan generalmente en tubo y se eligen a partir de las características del microorganismo que se han obtenido de los cultivos en placa y de las tinciones realizadas de colonias aisladas.

Los bacilos del género *Clostridium* pueden identificarse por una serie de pruebas bioquímicas en las que se puede considerar la fermentación de azúcares como la glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, reducción de nitratos a nitritos y fermentación de la leche.

Adicional a las pruebas bioquímicas, suelen emplearse las llamadas pruebas especiales, que son todas aquellas pruebas que no necesariamente arrojan información sobre el metabolismo del microorganismo, sino que también pueden distinguir un aspecto morfológico o estructural; sin embargo su función principal junto con las tinciones es brindar una visión más completa que abarque aspectos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que orienten al profesional a una buena identificación de los microorganismos. En el caso del género *Clostridium* es común el empleo de la prueba de la catalasa.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mechero.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	148 de 155

- 1 tubo de caldo glucosado.
- 1 tubo de leche tornasol.
- 1 tubo de SIM.
- Cultivo de *Clostridium* de la practica anterior.

SERVICIOS

- Agua, Luz y Gas.

PROCEDIMIENTO

Respetando la técnica aséptica, tomar un inculo y sembrar en cada prueba bioquímica.

Etiquetar los tubos e incubar a 37 °C por 24 a 48 horas (dependiendo del caso) y leer resultados.

RESULTADO

Reportar los resultados de cada prueba bioquímica como positivo o negativo. Para el medio SIM la movilidad se revisa a las 24 horas, para la producción de indol (se revisa a las 24 horas) se debe adicionar 1 o 2 gotas del reactivo de Kovac o de Erlich y finalmente para la producción de sulfuro de hidrogeno se debe revisar a las 48 horas.

CUESTIONARIO

- 1) ¿Cuál es el fundamento de la prueba de catalasa?
- 2) ¿Qué resultados se obtienen en el caso del género *Clostridium*?
- 3) ¿Qué función desempeña el sello en los caldos glucosados?
- 4) Explique de manera detallada el fundamento de la formación de un precipitado negro en la prueba de SIM.
- 5) Explique de manera detallada el fundamento de la formación de indol en la prueba de SIM.
- 6) ¿Qué diferencia hay entre coagulo y coajo en la prueba de leche tornasol?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	149 de 155

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kumate Rodríguez, J; Trujillo G. G; Hernández O. M. (2016). Infectología clínica. México: Méndez editores.

MacFaddin F. J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica. Argentina: Médica Panamericana.

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	150 de 155

ANEXO

Reporte de practica

En la práctica médica el reporte de cualquier hallazgo en el paciente o en sus estudios de laboratorio y gabinete, se hace por medio de la nota médica en el expediente clínico, el cual debe cumplir los requisitos establecidos en la NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012. En el caso de la actividad en el laboratorio todos los hallazgos se reportan a través de un reporte de practica y la mayoría de los laboratorios hace el registro en bitácoras de resultados.

De manera general un reporte de práctica consta de:

1. Caratula o Portada. La cual sirve para identificar la universidad, la carrera, la disciplina/materia, el grupo y la mesa de trabajo (equipo) al que se pertenece, así como el nombre de los integrantes que realizaron la práctica en orden alfabético e iniciando por apellidos.
2. Introducción. Sirve para proporcionar la base teórica que fundamenta el trabajo a realizar, es decir, los aspectos conocidos del tema (como conceptos y definiciones). Debe incluir una revisión sintetizada de la literatura científica existente sobre el tema, en un lenguaje claro y concreto del tema; por lo que debe incluir referencias bibliográficas. Para citar a las referencias deberá utilizar números colocados entre paréntesis.
3. Objetivos. Son los mencionados en el manual de práctica de laboratorio.
4. Métodos y materiales. En esta sección se describen materiales biológicos utilizados (cepa, origen, etc.) y materiales físicos (brevemente).

Importante describir los métodos (metodología/técnicas) utilizados de manera muy detallada, y dependiendo del caso usar un diagrama de flujo. En ocasiones el desarrollo de la práctica varía un poco con respecto al manual, por lo que se debe explicar la metodología que se utilizó al realizar la práctica o las adecuaciones que se realizaron. En esta sección los verbos siempre van en pasado, por ejemplo: se realizó, se observó, etc. Los nombres científicos deberán ser escritos en cursiva, sin subrayar; las sustancias químicas podrán ser mencionadas por su nombre o su fórmula condensada, sólo uno de los dos. Si se



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	151 de 155

mencionan unidades deberán usarse aquellas del sistema internacional o toleradas por éste y conforme a la NOM-008-SCFI-2000.

8. Resultados. Es una de las secciones más importantes del reporte, en esta sección los resultados obtenidos se describen y explican de manera clara; se pueden utilizar las figuras y cuadros que considere convenientes, procurando que no sean excesivos. Las figuras o imágenes deben incluir un texto que describa lo que se está observando. En caso de ser necesario se pueden utilizar cuadros o tablas, los cuales deben ser breves y no deben estar saturados de información.

En esta sección es importante señalar que, para llevar un registro adecuado de los resultados obtenidos, se puede hacer uso de una bitácora de resultados, que es una libreta foliada en la cual se escribe todo lo que se hizo en la práctica (cualquier detalle durante la metodología que pudiera alterar el resultado esperado) y lo más importante, se registra todos los resultados obtenidos (qué fue lo que se observó, qué coloración se obtuvo, la descripción de una imagen observada al microscopio, o si alguna fotografía es la indicada para presentar los resultados, etc) esta bitácora se escribe preferentemente con tinta y por lo regular se designa a un responsable por práctica para que anote todo. Será preferencia del equipo y decisión del profesor titular de la mesa si se utiliza o no.

6. Discusión y Análisis de resultados. En esta sección se analizan y discuten los resultados obtenidos, es decir, se tratan de comparar los resultados obtenidos en la práctica, con los reportados en la literatura científica sobre el mismo tema. En esta sección de discusión también puede llevar bibliografía.

7. Conclusiones. Se deberá concluir con respecto a los objetivos de su trabajo y la importancia y novedad de sus resultados. La información de resultados y discusión NO debe repetirse en las conclusiones. Las conclusiones suelen ir numeradas y en un máximo de 5 o pueden ir integradas en un solo párrafo (el profesor responsable de la mesa de trabajo puede sugerir cual sería la conveniente o sugerir un estilo propio).

8. Cuestionario. Se debe responder el cuestionario correspondiente a la práctica en esta sección y deberá llevar bibliografía, en caso de que la práctica lleve cuestionario.

9. Referencias bibliográficas. En esta sección se deben listar todas las referencias citadas en el reporte; esto puede hacerse en orden alfabético o en el orden en que aparecen en el reporte.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	152 de 155

Para redactar el reporte es recomendable consultar al menos cuatro fuentes bibliográficas (libros), para artículos y fuentes de divulgación en formato electrónico no hay límite. La bibliografía debe seguir el formato APA o Vancouver actualizado. Algunos ejemplos:

- Libros: Apellido(s), Inicial del nombre del autor. Año de publicación. Título del libro. Subtítulo. Editor(es): mismo orden que el autor.
- Artículos de revistas de divulgación científica: Apellido(s), Inicial del nombre del autor. Año de publicación. Título del artículo. Nombre de la Publicación. Número de volumen: páginas consultadas.

Páginas en internet: Apellido(s), A. A. (Fecha). Título de la página. Lugar de publicación: Nombre de la página web. Dirección de donde se extrajo el documento (URL).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	153 de 155

Técnicas.

Técnica de coloración de Gram.

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

Técnica de coloración de Ziehl – Neelsen.

1. Generar zona aséptica y tener precaución de esterilizar el asa y boca de tubos, antes y después de cada paso.
2. Preparar un frotis con cultivo de *Mycobacterium phlei*.
3. Cubrirlo con Fucsina de Ziehl y dejar reposar durante 30 segundos.
4. Colocar en el tripie y la rejilla de asbesto, un vaso de precipitados con agua y calentar hasta que hierva, colocar la preparación con cuidado encima del vaso de precipitado hasta la emisión de vapores durante 4-6 minutos.
5. Cuidar que el colorante no se seque, y no hierva, agregando más colorante.
6. Dejar enfriar y lavar con agua a chorro indirecto.
7. Decolorar con Alcohol Ácido.
8. Lavar con agua a chorro indirecto.
9. Cubrir la preparación con azul de metileno, durante 1-3 minutos.
10. Lavar con agua a chorro indirecto, dejar secar.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	154 de 155

Demostración de endosporas (Método técnica de Scheffer – Futton).

1. Preparar un frotis con la cepa a analizar.
2. Dejar secar y fijar al calor.
3. Cubrir la preparación con verde de malaquita.
4. Calentar con pases sobre la flama del mechero, hasta que se formen vapores, durante un minuto.
5. Lavar con agua (sin que pegue directamente en la muestra).
6. Agregar safranina durante medio minuto.
7. Lavar con agua (sin que pegue directamente en la muestra) y dejar secar.

Coagulasa.

1. Tomar una asada (inoculo) del microorganismo e inocularlo por suspensión en el tubo de plasma citratado (0.5 mL), incubar a 37°C durante 1- 4 horas revisando el tubo a intervalos de 30 minutos o 1 hora. Observar si hay formación de coágulo.

Catalasa.

1. Tomar una asada de los microorganismos y disolverlos en una gota de peróxido de hidrógeno colocada previamente en un portaobjetos limpio y seco. Realizarlo de forma comparativa. La formación de burbujas indica la presencia de catalasa (catalasa positiva).
2. Verificar que no exista reacción del asa bacteriológica con el peróxido de hidrógeno realizando la prueba sin el inóculo; esto debido a que el material de fabricación de ciertas asas genera burbujeo al contacto con el peróxido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-MC-ML04	03 agosto 2023	01	155 de 155

Obtención de plasma citratado.

1. Respetando la técnica aséptica, obtener por punción venosa 3 a 5 mL de sangre de un voluntario sano, previo consentimiento del mismo.
2. Colocar en tubo de ensaye 13 x 100, con 2 a 3 gotas de citrato de sodio (anticoagulante) y agitar suavemente.
3. Centrifugar (2500-3000 rpm por 3 minutos), asegurarse de tener equilibrada la centrífuga.
4. Separar mediante una pipeta Pasteur el plasma en un tubo de ensaye nuevo.
5. Utilizar el plasma en las pruebas necesarias.