



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Química Farmacéutico Biológica

Séptimo Semestre

Manual de Microbiología General II

Fecha de aprobación: 04 de septiembre de 2024

Vigencia: 04 de septiembre de 2027

Listado de Profesores participantes

- ***DR. José Luis Mora Guevara***
- ***QFB. Patricia Vidal Millán***
- ***QFB. Martha Patricia Orozco Gómez***
- ***QFB. María Galia Martínez Flores***
- ***QFB. Alicia Cabrera Aguilar***
- ***QFB. José Oscar González Moreno***
- ***QFB. Manuel Orduña Sánchez***
- ***QFB. Carolina Jiménez López***
- ***QFB. Ana Lilia Gutiérrez Romero***
- ***QFB. Gildardo Herrera Quiroz***

Índice

PARASITOLOGÍA

1. PROTOZOARIOS Y HELMINTOS DE VIDA LIBRE Y PARASITARIA	Pag. 18
2. TRANSMISORES, VECTORES Y ECTOPARASITOS	Pag. 31
3. TÉCNICAS DE COLECTA Y TINCION DE PARASITOS	Pag. 39
4. HEMOPARASITOS	Pag. 48
5. COPROPARASITOSCOPICO	Pag. 58

MICOLOGIA

1. OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS	Pag. 68
2. AISLAMIENTO DE HONGOS DE DIFERENTES FUENTES	Pag. 75
3. CARACTERÍSTICAS TINTORIALES DE LOS HONGOS	Pag. 85
4. MICROCULTIVO (SEMINARIO PRACTICA 5)	Pag. 91
5. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE LOS HONGOS	Pag. 98
6. FISIOLÓGÍA DE LAS LEVADURAS	Pag. 106

VIROLOGÍA

7. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS	Pag. 118
8. ESTRUCTURAS DEL EMBRIÓN DE POLLO Y SUS VIAS DE INOCULACIÓN	Pag. 127

Introducción:

La Parasitología, la Micología y la Virología son parte complementaria de la microbiología junto con la bacteriología.

Existen miles de microorganismo en el ambiente conformando la ecología del planeta, y como tal viven estableciendo interacciones de sobrevivencia ya que los hospederos logran generar respuestas para evitar ser infectados o dañados, no obstante, ellos generan mecanismos que evaden estas respuestas yendo siempre un paso adelante. Durante estos procesos logran ser más resistentes e incluso modificar tanto sus estructuras internas (metabolismo) y externas (moléculas que le permiten fijarse al hospedero), estas transformaciones generan mayor variedad y cambios morfológicos y fisiológicos, lo que facilita su llegada a otro hospedador incluso incrementando su virulencia, por lo que obligan al analista a emplear más de un método de laboratorio para detectarlos e identificarlos para que se dé un tratamiento adecuado y el hospedero tenga un pronóstico alentador.

La relación del ser humano con el medio ambiente ha propiciado el contacto con los microorganismos, donde los parásitos, hongos y virus tienen una gran relevancia, se han encontrado fósiles donde se pueden describir asociaciones parasitarias desde hace 500 millones de años. Las civilizaciones antiguas han dejado un número crónicas de enfermedades relacionadas. En el mundo actual tanto los parásitos, hongos y virus son un importante problema de Salud Pública principalmente en los países en vías de desarrollo, el problema ha ido creciendo por la dificultad de un diagnóstico preciso y de la disponibilidad de antiparasitarios, antimicóticos y antivirales poco efectivos; actualmente se cuenta con una serie de recursos para la identificación de parásitos: tinciones, técnicas coproparasitoscópicas, pruebas inmunológicas, de biología molecular para su estudio e identificación, al igual que los parásitos los hongos cuenta con técnicas que permiten su identificación, pero tienen un aspecto que los hace peculiares el uso de ellos en el campo de la biotecnología en campos como la alimentaria, para la producción de vinos, quesos y pan, su importancia como biorremediadores y su amplio uso en la industria farmacéutica para la producción de antibióticos, vitaminas, estatinas, etc., mientras que los virus fue hasta 1931 que fueron vistos por primera vez a través de microscopio electrónico, después de su avistamiento fue fácil deducir su rol para producir enfermedades en los animales, plantas y en el ser humano, los virus a lo largo de la historia son los protagonistas de varias pandemias que han azotado el mundo. En este laboratorio nos basamos en métodos habituales de identificación morfológica a partir del desarrollo de los microorganismos en el hospedero, el empleo también de medios para su reproducción o replicación (en el caso de los virus) para facilitar la visualización, El propósito del curso de microbiología General II es que el alumno conozca los aspectos básicos de la parasitología, micología y virología, nombre de la estructura de los parásitos hongos y virus, condiciones adecuadas de desarrollo, técnicas y pruebas bioquímicas que nos permitan su aislamiento e identificación, la aplicación en nuevas áreas como la biotecnología. La aplicación de todos los conocimientos en el ámbito clínico e industrial.

El manual de Microbiología General II tiene el objetivo de ser una guía metodológica para la realización de prácticas que le permitirán al alumno complementar a través de experimentación los aspectos teóricos del módulo, reforzar el conocimiento teórico adquirido, conociendo la importancia de la clasificación de los parásitos, el uso de la técnica adecuada de donde se tenga mayor probabilidad de recuperar al parásito, las condiciones de crecimiento, técnicas correctas de asilamiento de fuentes naturales o muestras de origen clínico, dándole al alumno herramientas y entrenamiento de calidad, certero y confiable para realizar el trabajo de laboratorio. Además de promover el trabajo en un ambiente de respeto, responsabilidad y ética profesional.

Objetivos

- **General**

Los alumnos adquirirán las herramientas prácticas de conocimiento y habilidades para el manejo de material, equipo e identificación de patógenos para el diagnóstico clínico en el área de micología, virología y parasitología. Diferenciando a los microorganismos con base en sus características morfológicas, eligiendo el método (s) más adecuado para su diagnóstico, basándose en los mecanismos de transmisión, las fuentes de infección, las etapas de maduración para hacerse infectante, a través de alimentos, contacto directo, congénito o vectorial. Practicará procedimientos básicos de bioseguridad en todas las áreas de trabajo del laboratorio de microbiología para prevenir infecciones o accidentes laborales

- **Particular**

En cada practica se establecen los objetivos que se persiguen en cada una de ellas

REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA GENERAL II

1. Los profesores del laboratorio organizarán los equipos de trabajo (no se permitirán los cambios de los integrantes)
2. La entrada será a las con base en el horario programado con base en el grupo asignado
3. Deberá entrar y permanecer con bata blanca, de manga larga, limpia y abotonada
4. Deberá portar el gafete correspondiente
5. El cabello recogido, las uñas recortadas, zapatos cerrados y de suela antiderrapante

6. No se permiten visitas en el horario de laboratorio. La puerta permanecerá cerrada durante la sesión de laboratorio. Se prohíbe la entrada de personas ajenas al grupo
7. Los celulares se mantendrán apagados durante los seminarios y en vibración durante el resto de la sesión. Se pueden utilizar para tomar fotos y videos de los microorganismos
8. Se prohíbe el uso de audífonos
9. Queda terminantemente prohibido comer, introducir alimentos o fumar en el laboratorio
10. Por ningún motivo deberá llevarse los lápices o plumas o cualquier objeto a la boca
11. Antes y al término de cualquier trabajo el alumno deberá lavarse las manos con agua y jabón neutro y secarse con una toalla limpia
12. Deberá limpiar la superficie de la mesa de trabajo con solución germicida antes y al término de la práctica. Se puede limpiar cuantas veces sea necesario durante el trabajo del laboratorio
13. Antes de comenzar el trabajo de laboratorio, deberá haber leído la práctica y realizará las actividades con base en las indicaciones dadas en el seminario. No llevará a cabo experimentos no autorizados. En caso de dudas consultar con alguno de los profesores
14. Durante los exámenes, no usará acordeones o copias de algún escrito. No hablará con sus compañeros. Se anulará el examen en casos de incurrir en los casos antes mencionados
15. Durante el seminario deberá poner atención, de lo contrario deberá pasar a dar el seminario
16. No deberá realizar actividades de otras asignaturas, no jugar y no estar fuera de su lugar sin previa indicación
17. Deberá solicitar permiso para acudir al sanitario al cual acudirá sin la bata ni guantes y deberá lavarse las manos antes y después de ir al baño
18. Los objetos personales deben estar fuera de las mesas de trabajo a excepción de su bitácora, lápiz y pluma
19. Solicitará el equipo y el material a utilizar y lo deberá entregar limpio y seco
20. Deberá tener conocimiento y cuidados específicos de los equipos a emplear, solicitándolos en el interlaboratorio y al término entregarlos limpios y en caso de microscopio, sin aceite de inmersión. Deberá reportar cualquier daño del mismo a los profesores

21. Todo lo que deba incubar, deberá etiquetarlos con los siguientes datos: Grupo, Equipo, Fecha y tipo de material
22. Al final cuando esterilice su material, deberá estar libre de etiquetas
23. Emplear dispositivos (bulbos o succedáneos) apropiados para pipetear líquidos. Está prohibido pipetear con la boca o con jeringas. Las pipetas deberán tener algodón para reducir la contaminación
24. Colocar el material de vidrio contaminado en los recipientes apropiados para su esterilización, con respecto a portaobjetos, cubreobjetos y pepitas Pasteur (puntas hacia abajo) deberán colocarse en frascos de boca ancha que contenga hipoclorito de Sodio diluido 1:10. Las envolturas, tapones de algodón, etc., una vez esterilizados deben depositarse en los recipientes de basura
25. El material de desecho que vaya en bolsa de plástico, deberá seleccionarse con base en la **norma NOM 087 2002**
26. Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc.). Ninguna de estas situaciones deberá ser considerada como menor. Colocarse guantes y cubrir con papel absorbente el área del derrame, verter sobre él un desinfectante y dejar actuar por 15 minutos, retirar el material y colocarlo en recipientes para residuos contaminados o bolsas de desecho. Limpiar y desinfectar el área empleando nuevas toallas de papel y desinfectante. Lavarse las manos con abundante agua y jabón
27. Extremar precauciones cuando se utilicen jeringas y agujas para evitar la inoculación accidental durante su manipulación y desecho
28. Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivo de microorganismos

MEDIDAS EN CASO DE EMERGENCIA

A continuación, mencionaremos los pasos a seguir en caso de que ocurran los siguientes accidentes:

A) Derrame de material biológico sobre el cuerpo

1. Remover la ropa inmediatamente
2. Lavar vigorosamente el área expuesta con agua y jabón
3. Reportar el accidente al profesor

4. Buscar atención medica de ser necesario
5. La ropa contaminada, se colocará en una solución desinfectante antes de ser lavada

B) Salpicadura en los ojos con material biopeligroso

1. Lavar vigorosamente el globo ocular e interior de la superficie de los parpados con abundante agua durante aproximadamente 15 minutos. Abrir el ojo para asegurar efectivamente el lavado.
2. Reportar el incidente al profesor
3. Buscar atención medica inmediatamente

C) Cortadas menores y heridas por pinchazos

1. Lavar vigorosamente con agua y jabón por varios minutos
2. Aplicar un antiséptico
3. Reportar el incidente al profesor y buscar atención medica

NOTA: En el caso de prácticas en las cuales emplee el mechero deberá abstenerse de utilizar guantes

Manejo de Residuos

En el caso del material que ha sido esterilizado (por los métodos de calor húmedo o empleando algún agente antiséptico) Después de enfriarse, los residuos resultantes pueden ser reciclados o colocados en los contenedores de basura común.

¿Cómo deberán ser envasados los RPBI?				
CLASIFICACIÓN	Estado Físico	Envasado	Tipo de envase	Color
<i>Sangre</i>	Líquido	Recipientes Herméticos		rojo 
<i>Cultivos y cepas de agentes infecciosos</i>	Sólidos	Bolsas de polietileno		rojo 
<i>Patológicos</i>	Sólidos Líquidos	Bolsas de polietileno Recipientes herméticos		amarillo 
<i>Residuos no anatómicos</i>	Sólidos Líquidos	Bolsas de polietileno Recipientes herméticos		rojo 
<i>Objetos punzocortantes</i>	Sólidos	Recipientes rígidos de polipropileno		rojo 

Requisitos legales y reglamentarios aplicables (Normas, Guías, Reglamentos, etc...)

MARCO JURÍDICO Y NORMATIVO

Legislación Nacional y local de cumplimiento obligatorio:

1. Ley Federal de Sanidad Animal (D.O.F. 18-VI-1993). Título I. Art. 3ero. La Secretaría (SAGARPA) es la responsable de tutelar por la salud y el bienestar animal (DOF 060712) Art. 6. Cap. X.- Integrar y coordinar los Comités Consultivos Nacionales de Normalización en materia de Sanidad y Bienestar Animal y de buenas prácticas pecuarias, así como el Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal; Título III.- Del bienestar de los animales, importación, tránsito internacional y exportación. Capítulo 1ero. Art. 19 al 23. De las infracciones (art. 167) Sanciones administrativas de 1000-10000; 10000-50000 SM.
2. Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal (Gaceta Oficial del D.F., 26- II-2002). XVII. Bienestar Animal: Estado en que el animal tiene satisfechas sus necesidades de salud, de comportamiento y fisiológicas frente a cambios en su ambiente, generalmente impuestos por el ser humano; XXVIII. Maltrato. Todo hecho, acto u omisión del ser humano, que puede ocasionar dolor o sufrimiento afectando el bienestar animal, poner en peligro la vida del animal o afectar gravemente su salud, así como la sobreexplotación de su trabajo.
3. Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud; Título séptimo, artículos 121 al 126: De la Investigación que incluya la utilización de animales de experimentación.
5. Reglamento de seguridad y coordinación en materia de investigación para la salud en la Universidad Nacional Autónoma de México (09-II-89): Art. 37.
5. Reglamento para el cuidado de los animales en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (03-V-89).
6. NOM-062-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (D.O.F. 22-VIII-2001), que en adelante será designada como Norma.
7. NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Lineamientos y Declaraciones no vinculantes:

- a) Directiva del Consejo de los Estados Europeos (86/609/CEE): Disposiciones legales, reglamentarias y administrativas respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- b) Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS), Normas internacionales para la investigación biomédica con animales. Ginebra 1993.
- c) Tratado de Ámsterdam: Protocolo sobre la protección y el bienestar animal (Mayo, 1999).
- d) Tratado de Lisboa de la Unión Europea en la que se define a los animales no humanos como: "seres sensibles o sintientes" (Artículo 13, marzo de 2010).
- e) Universal Declaration on Animal Welfare. Resolution No. XIV. International Committee of the OIE, 24/mayo/2007.
- f) Guide for the care and use of Laboratory Animals. National Institutes of Health. Division of Research Resources (Maryland, 1994).
- g) Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. Canadian Council on Animal Care (1998).
- h) Russell WMS and Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1959.
- i) Conferencia global sobre bienestar animal: Una iniciativa de la OIE (Comisión Europea, 2004).
- j) Leary S, Underwood W, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, AVMA, Version 2013.0.1

Criterios de Evaluación

El siguiente segmento es una guía para evaluar al estudiante de Laboratorio de Microbiología General II, es consensado por los profesores del módulo. Las actividades planteadas estarán programadas de acuerdo con el calendario de prácticas que se dará a conocer en la primera clase de Laboratorio

Se mantendrá y entrará en función desde el inicio del semestre como se presenta a continuación.

- La calificación del módulo de Microbiología General II se obtiene acreditando la teoría y el laboratorio con una calificación mínima de seis (6.0), no se promedian si cualquiera de las evaluaciones es reprobatoria.
- Para acreditar el laboratorio se sumarán los elementos de los criterios de evaluación establecidos, considerando que deben tener los exámenes parciales Aprobados (parasitología, micología-virología, primera vuelta y segunda vuelta) y el trabajo por parte del estudiante en el laboratorio considerando su desempeño en todo el semestre (calificación mínima de 6).
- La calificación final del módulo de Microbiología General II comprende: Laboratorio 40 % y Teoría 60%.
- El alumno deberá cumplir con la asistencia del 80% de las sesiones en el laboratorio (incluyendo la primera que es la presentación) para poder ser evaluado, en caso de los alumnos en extraordinario largo deberán de cumplir con el 100% de asistencia.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN	PONDERACIÓN
1) Seminario y exposición (la calificación es individual)	20%
2) Bitácora (equipo)	Requisito
3) Informe de la practica	20%
4) Desempeño en laboratorio(individual)	20%
5) Exámenes: dos exámenes de modulo_ uno de parasitología y otro de micología/virología-. Primera y segunda vuelta	40%

- Las prácticas se dividirán entre los profesores con la finalidad de organizar el trabajo académico en el laboratorio.
- El profesor encargado de la práctica, tiene las siguientes funciones: Asesorar al equipo de

trabajo para preparar el seminario correspondiente a la práctica de laboratorio y calificarlo, revisar las bitácoras los equipos de los equipos en relación a la práctica que se esté desarrollando; así como también calificar el informe que se genere de dicha actividad.

- Se entregarán a los alumnos puntos guía al inicio del semestre y con base en ellos, se investigará y se desarrollará el seminario por parte del equipo responsable que le toca exponer; y serán como su nombre lo indica una guía para desarrollar la bitácora para cada una de las prácticas de laboratorio.

1) SEMINARIO Y EXPOSICIÓN

- En la primera sesión se formarán los equipos y se asignará la distribución de los seminarios que corresponda a cada equipo, el asesor responsable de la práctica deberá asesorar, revisar y autorizar el seminario preparado por el equipo correspondiente, este será enviado **una semana antes** de la fecha asignada en el calendario, al asesor por la vía que este indique para su revisión, corrección y autorización para exponerlo el día programado de forma presencial en el laboratorio.
- **NOTA: Fecha límite de entrega para revisión del seminario. Viernes anterior a la fecha de exposición para la última revisión. Entrega a destiempo, no será revisado ni autorizada la presentación.**

Se consideran los siguientes aspectos para asignar la calificación del seminario:

- ❖ Entrega de la presentación en la fecha indicada
- ❖ Participación de todos los integrantes en la elaboración de la presentación (el alumno que no participe en la elaboración tendrá cero en el rubro de seminario)
- ❖ Realizar las correcciones indicadas por el asesor. Se recomienda que se reúnan (por el medio que se indique) con el asesor para hacer comentarios o correcciones finales
- ❖ En caso de la modalidad en línea deberán tener su cámara abierta explicando el tema apoyándose en sus diapositivas. En forma presencial el equipo verificara su material de exposición (laptop, cañón, memoria, USB) antes de iniciar la exposición para resolver las fallas técnicas y logísticas.
- ❖ Al finalizar el seminario es muy importante la retroalimentación entre todos los integrantes del grupo (equipo expositor, alumnos en general y profesores del módulo de Laboratorio)

La estructura del seminario y exposición será la siguiente

El equipo asignado expondrá en forma presencial

Tendrá una duración de 30-40 minutos máximo, este tiempo deberá de respetarse y estará indicado por el conjunto de los profesores de laboratorio.

Deberá contener los siguientes puntos

- Portada: institución, carrera, nombre y número de práctica, número de equipo, integrantes y nombre del asesor
- Objetivos.
- Fundamentación teórica y desarrollo (basado en puntos guía, incluir imágenes y cuadros acorde al tema).
- Procedimiento de la práctica: Elaborar un diagrama de Flujo con imágenes en formato de cartel. El cual se pegará en el pizarrón para que pueda observarse durante la sesión de laboratorio.
- Aplicaciones de la práctica en las diferentes orientaciones de la carrera (Bioquímica Clínica, Farmacia Clínica y Farmacia Industrial).
- Referencias

NOTAS:

- **Durante los seminarios todos los alumnos deberán estar atentos (apagar sus celulares u otros distractores), participar al final de la presentación, ya sea haciendo preguntas o enriqueciendo el seminario según lo investigado en los puntos guía y la información del manual de prácticas.**
- **En caso de no existir participación por parte de los alumnos, los profesores podrán hacer preguntas tanto al equipo expositor como al grupo en general**
- **la calificación de los expositores es individual.**
- **Las observaciones por parte de los profesores y alumnos se realizarán concluyendo el seminario; al menos que sea una aclaración pertinente será en el momento.**

2) BITÁCORA

- La bitácora se trabajará por equipo, se revisará y calificará por el asesor correspondiente. Su entrega será requisito para poder evaluar el informe. Su estructura tendrá el siguiente orden:
- **Estructura:**
 - ❖ Portada (Institución, el nombre del módulo, el número de equipo y el nombre de los integrantes y el período correspondiente).
 - ❖ Colocar en la pasta de su libreta de tamaño profesional
 - ❖ Misión y visión de la carrera de QFB.
 - ❖ Calendario de prácticas
 - ❖ Criterios de evaluación
 - ❖ Puntos guía por práctica de laboratorio anotados.
 - ❖ Los puntos correspondientes al sistema de gestión de calidad de los laboratorios de docencia.

- **Por practica**

- ❖ Colocar el número y nombre de la práctica de laboratorio.
- ❖ Objetivos, tomar como punto de referencia el manual de laboratorio de Microbiología General 2.
- ❖ Auxiliar gráfico a su elección (Infografía, mapa mental, mapa conceptual, etc.). considerando los puntos guía y de preferencia no deben extenderse más de 4 cuartillas con un tamaño adecuado de letra, puede imprimirlo y pegarlo en su bitácora. Deberá contener los elementos respectivos al organizador elegido por el equipo (libre a su creatividad) para la construcción de estos, primero tendrán que investigar los aspectos teóricos y fundamentos de la práctica (Investigar en fuentes confiable, seleccionar la información, sintetizar y presentarla de manera correcta) deberá tener una caratula, grupo, título de la práctica, numero del equipo, nombre de los integrantes que colaboraron en su elaboración, asesor responsable de la práctica, fecha de entrega. Citar y referenciar las fuentes consultadas utilizando los criterios de Vancouver
- ❖ Material, reactivos y/o insumos.
- ❖ Equipo.
- ❖ Servicios (aire, vapor, vacío, etc.).
- ❖ Procedimiento o técnica en Diagrama de flujo
- ❖ Registrar los resultados observados en cada práctica de laboratorio se presentarán en forma concreta por medio de imágenes, tablas, esquemas, etc.
- ❖ Referencias bibliográficas y/o bibliografía.

NOTA: Si se detectan bitácoras que tengan el mismo contenido, ya sea dentro del grupo o en otros grupos y semestres anteriores, no se evaluara el informe de correspondiente.

3) INFORME/REPORTE DE LA PRÁCTICA

Los informes se entregarán una semana después de terminada la práctica

La estructura del reporte deberá contener:

- **Caratula:** debe contar con los siguientes elementos
 - Encabezado
 - Nombre del módulo
 - Nombre de la practica
 - Numero de equipo
 - Nombre de los integrantes
 - Fecha de realización
 - Nombre del asesor de la practica
- **Objetivos**
- **Resultados** que deberán presentarse en forma concreta por medio de imágenes, tablas, esquemas, etc.

- La discusión de resultados debe citar las fuentes que consultaron para sustentarlos, para qué no sean una descripción de los mismos.
- Las conclusiones deben ser puntuales con base a los objetivos de la práctica.
- Citar y referenciar de forma correcta utilizando los criterios de Vancouver, tomando en cuenta referencias clásicas de la materia y actuales

➤ **Nota: Sólo se calificarán los informes entregados en tiempo y forma. Es responsabilidad de todos los integrantes revisar el informe para evitar que se entregue de manera incorrecta.**

4) DESEMPEÑO DE LABORATORIO

Se calificará en cada práctica los siguientes aspectos:

- Puntualidad.
- Cumplimiento con el reglamento de laboratorio.
- Cumplimiento de las reglas para una convivencia armoniosa (Respeto, actitud, cuidar mobiliario, los equipos e instrumentos, el agua, etc.).
- Trabajar de manera colaborativa en toda la práctica.
- Limpieza.
- Llevar las muestras biológicas solicitadas por el asesor.
- Conocimiento y aplicación de las técnicas y métodos de laboratorio de cada práctica.
- Uso adecuado del equipo e instrumentos.
- Cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio.

5) EXÁMENES DE BLOQUE

- El laboratorio está estructurado en dos bloques:

- ❖ PARASITOLOGÍA (Prácticas 1 a 5)
- ❖ MICOLOGÍA Y VIROLOGIA (Prácticas 1 a 8)

- Al término de cada módulo se realizará el examen del bloque correspondiente de forma presencial y consta de un examen práctico y un examen teórico. Ambos deberán tener calificación mínima de 6.0
- En caso de reprobar un examen de bloque, se repondrá en la primera vuelta, si no se acredita este examen o ambos módulos se presentará en la segunda vuelta (examen global)
- Reprobando los dos bloques se presentará directamente a la segunda vuelta de reposición y será examen global.
- Casos no previstos serán analizados por el pleno de los profesores

MATERIAL NECESARIO PARA EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA GENERAL II

INDIVIDUAL:

- BATA BLANCA DE MANGA LARGA
- GUANTES
- CUBREBOCAS

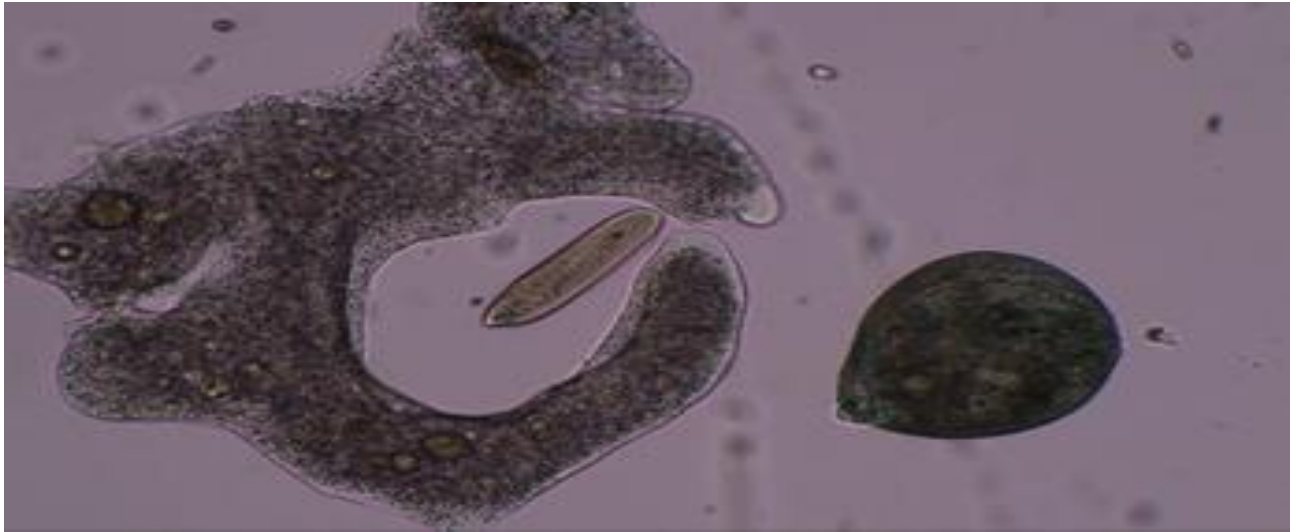
POR GRUPO:

- 500 GRAMOS DE CAL (PARA ENCALAR RESIDUOS COLECTA DE PARASITOS)
- 3 CAJAS DE PORTAOBJETOS MARCA CORNING (P DE MICROCULTIVO)
- 1 CAJA DE CUBREOBJETOS MARCA CORNING (PA DE MICROCULTIVO)

POR EQUIPO:

- | | |
|---|--|
| • CAJA DE PORTAOBJETOS MARCA CORNING | • AGUJAS Y ASAS BACTERIOLOGICAS Y MICOLOGICAS |
| • CAJA DE CUBREOBJETOS MARCA CORNING | • MECHERO BUNSEN |
| • CAJA DE APLICADORES | • CERILLOS O ENCENDEDOR |
| • CAJA DE ABATELENGUAS | • FRASCOS DE VIDRIO DE BOCA ANCHA |
| • PIPETAS PASTEUR | • FRASCOS GOTEROS DE 30 ML |
| • JERINGAS DE 1 mL (insulina), 3mL y 10 mL (5 de c/u) | • MARCADOR DE TINTA INDELEBLE PUNTO FINO |
| • BULBOS PARA PIPETA PASTEUR | • MASKIN-TAPE |
| • ESTUCHE DE DISECCION | • DIUREX DE BUENA CALIDAD |
| • CHAROLA PARA DISECCION | • ROLLO DE ALGODÓN DE 250 GR |
| • TIJERAS | • GRADILLA |
| • MANGOS Y NAVAJAS PARA BISTURI | • 10 TUBOS DE 13X100 |
| • ROLLO DE PAPEL SANITARIO | • EMBUDO DE PLASTICO |
| • PAPEL ESTRASA | • BOTES METALICOS “NUEVOS” (2 GRA CHICOS PARA LAB. PRODUCCION) |
| • FRANELA | |
| • JABON | |
| • DETERGENTE | |
| • ESCOBILLONES | |
| • FIBRA PARA LAVADO DE MATERIAL | |
| • BENZAL O HIPOCLORITO DE SODIO AL 10% | |
| • GASA ESTERIL | |
| • PAPEL ALUMINIO | |

NOTA: Revisar en cada práctica el material biológico que necesitan para realizar la práctica, en caso de no contar con lo que se indica en la práctica, los asesores indicaran en la sesión previa el tipo de material biológico que deberán llevar para la realización de esta.



**PRÁCTICA
NÚMERO
1**

**PROTOZOARIOS Y HELMINTOS DE
VIDA LIBRE Y PARASITARIA.
(MORFOLOGÍA)**



Unidad 1 parasitología

INTRODUCCIÓN

PROTOZOARIOS

Los Protozoarios son microorganismos que pertenecen al reino Protista, son unicelulares y poseen gran variedad de formas y tamaños, en la naturaleza existen aproximadamente 45,000 especies conocidas entre protozoarios de vida libre y parasitaria.

Los protozoarios tanto de vida libre como parásitos se dividen en cuatro clases:

- *Sarcodina*
- *Mastigophora*
- *Ciliophora*
- *Sporozoa*

La clase *Sarcodina* presenta dos principales formas de resistencia, trofozoíto (forma móvil) y quiste (forma inmóvil), la reproducción se da por fisión binaria o por esquizogonia (fisión binaria acelerada).

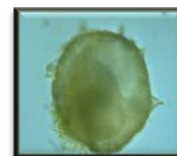
El trofozoíto presenta:

- a. Pseudópodos o falsos pies; proyecciones protoplásmicas que funcionan como órgano locomotor.
- b. Ectoplasma; capa exterior de citoplasma de apariencia clara.
- c. Endoplasma; región intracitoplásmica.
- d. Núcleo; generalmente presenta uno, algunas amibas gigantes son

- e. Vacuolas contráctiles; son estructuras grandes, circulares que regulan la presión interna del agua.
- f. Vacuolas alimentarias; contiene nutrientes útiles a la célula.

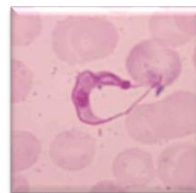


• *Entamoeba histolytica*



• *Diffugia corona*

La clase *Mastigophora*, presenta dos formas, trofozoíto y quiste, el tipo de reproducción de estos protozoarios es de tipo asexual por fisión binaria:



• *Trypanosoma cruzi*

Estructuras principales del trofozoito:

- a. Flagelo; puede tener uno o más estructuras largas en forma de

látigo que le sirve para la locomoción. Algunos protozoarios de esta clase presentan una membrana ondulante como en el caso de *Trypanosoma sp.*

- b. Película; cubierta elástica más fuerte que la membrana celular a la cual le proporciona protección contra sustancias químicas, daño mecánico y pérdida de agua.
- c. Boca; se puede presentar en forma difusa.
- d. Cloroplasto; es un organelo conteniendo clorofila sólo lo presenta las formas fotosintéticas.
- e. Mancha Ocular; mancha que se pigmenta en presencia de luz.
- f. Núcleo; presenta de uno a dos.

La clase *Ciliophora* se reproduce por conjugación y presenta las siguientes características morfológicas:

- a. Cilios; estructuras cortas de aspecto vellosos que le sirven para la locomoción y alimentación.
- b. Película; capa flexible más externa.
- c. Vacuola contráctil con canales radiantes; regula la presión osmótica.
- d. Vacuola alimentaria; sitio de digestión de los alimentos ingeridos.
- e. Macronúcleo; un gran núcleo que funciona para controlar las actividades celulares.
- f. Micronúcleo; pequeño núcleo que funciona en combinación con el

macronúcleo a modo de reproducción sexual.

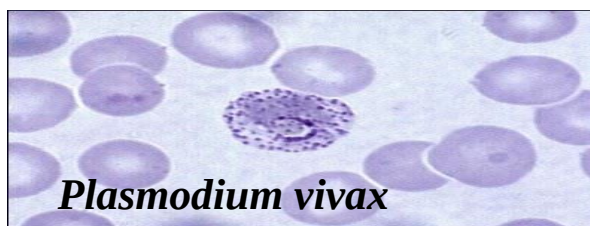
Ejemplo más representativo:



La clase *Sporozoa* al igual que la clase *Sarcodina* presenta reproducción por fisión binaria, sin embargo, también lo pueden realizar por esquizogonia esta puede ser sexual o asexual:

- a. Protozoo que presenta gran complejidad en su ciclo biológico.
- b. Presenta tanto fase sexual como asexual de reproducción.
- c. Puede requerir de un vector biológico para su transmisión.
- d. Se considera un parásito intracelular obligado.

Ejemplos de esta clase:



HELMINTOS

Los *Helmintos* son pluricelulares por lo que también son conocidos como metazoarios pueden ser aerobios o anaerobios; sus ciclos de vida son complejos, así como también su estructura, sus hospederos intermediarios son numerosos. El conocimiento de sus estadios durante su ciclo biológico, son esenciales para establecer sus diversas etapas de vida; tanto vegetativa o de vida libre como la infectiva o parasitaria.

Estos se consideran de gran interés dentro de la parasitología clínica y se dividen en dos grupos platelmintos y nematelmintos.

Los *Platelmintos* se encuentran divididos en dos clases:

- *Cestoda*
- *Trematoda*

Los *Céstodos* se caracterizan morfológicamente por ser gusanos polizóicos ya que presentan un cuerpo alargado con forma plana o de cinta, están compuestos de gran cantidad de unidades funcionales y estructurales llamados proglótides al conjunto de estos se le llama estróbilo, presentan un órgano de fijación llamado escólex, el cual puede tener en ocasiones una corona de espículas llamada rostelo.

Su cuerpo está cubierto por una fina capa llamada tegumento, con funciones

absorbentes y excretoras, para lo cual presenta microvellosidades.

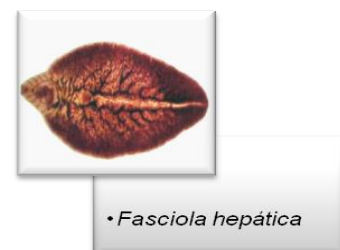
Esta clase de helmintos posee ambos sexos por lo cual se consideran hermafroditas; además de tener un sistema sexual y un sistema excretor que realiza por transporte activo a través de su membrana.

Algunos ejemplos de parásitos de este tipo son:



La clase de los *Trematoda* se caracteriza por ser gusanos monoizóicos con cuerpo ancho y con un sólo juego de unidades estructurales y funcionales; tienen forma acelomada o de hoja, poseen un dorso ventral, asimetría bilateral con un tipo pronefrítico de sistema excretor (células en vaina) osmorregulador, carecen de ano, aparato circulatorio y respiratorio. Están llenos de parénquima y la mayoría son hermafroditas.

Ejemplo de un parásito de esta clase:



NEMÁTODOS

Los *Nemátodos* pueden ser de vida libre o parásitos, de cuerpo alargado, cilíndrico de tamaño microscópico o macroscópico. Son generalmente dioicos, es decir, presentan sexos separados.

Dentro de su forma cilíndrica existen variedades morfológicas como son:

- Fusiforme: con extremos romos, puntiagudos o combinación de los dos, como en el caso de *Ascaris lumbricoides*.
- Filiforme: muy delgados y largos como *Onchocerca volvulus*.
- Intermedia: es una combinación de las dos anteriores, es decir, porción anterior filiforme y porción posterior fusiforme como es el caso de *Trichuris trichiura*.

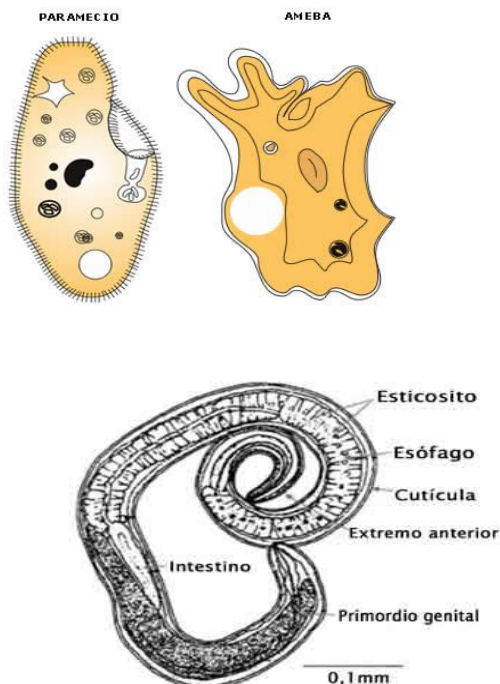
Presentan las siguientes estructuras; Cutícula, laminilla basal, hipodermis, musculatura y diversas estructuras especializadas en la superficie, tracto

digestivo, sistema nervioso primitivo, aparato excretor y reproductor con sexos separados siendo las hembras de mayor tamaño, tienen un órgano de fijación el cual está compuesto de placas o dientes.

Un ejemplo de un parásito de este tipo es la *Ascaris lumbricoides*.



Estructuras generales de protozoarios y helmintos.



OBJETIVOS:

1. Adquirir la capacidad de identificar Protozoarios de vida libre presentes en diferentes muestras como el agua encharcada.
2. Conocer algunos grupos de protozoarios y helmintos las observaciones a partir de preparaciones permanentes realizadas con el microscopio.
3. Identificar los diferentes protozoarios y helmintos que pueden parasitar al humano y a los que se pueden encontrar en vida libre.

MATERIAL POR EQUIPO:

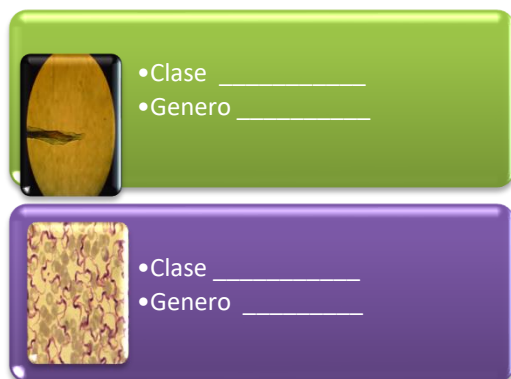
- ✓ Microscopio.
- ✓ Estereoscopio.
- ✓ Muestra de agua residual o estancada (esperar asignación por parte de los asesores).
- ✓ Portaobjetos y cubreobjetos por equipo.
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Preparaciones fijas y/o diapositivas de:

- a) *Fasciola hepatica*.
- b) *Taenia solium*.
- c) *Ascaris lumbricoides*.
- d) *Entamoeba histolytica*.
- e) *Giardia lamblia*.
- f) *Plasmodium sp.*

MÉTODO

Recolecte una muestra de agua residual (encharcada)

1. Realice varias preparaciones del agua estancada colocando una gota de la misma en un portaobjetos y posteriormente colocar un cubreobjetos primero una arista y lenta mente el resto para evitar la formación burbujas del cubreobjetos.
2. Observe al microscopio dichas preparaciones con los objetivos; seco débil (10X) y seco fuerte (40X), esquematizar lo observado, resaltando las características morfológicas de los parásitos.
3. Observe las preparaciones fijas que le proporcionen o diapositivas que proyecten los asesores.
4. Observe las preparaciones o frotis con el microscopio a 40X y 100X (aceite de inmersión).
5. Las preparaciones fijas más grandes como *Taenia solium* y *Ascaris lumbricoides* obsérvelas con el estereoscopio.
6. Esquematice lo observado cómo se ejemplifica.



PRIMERA PARTE:



1. Recolectar una muestra de agua



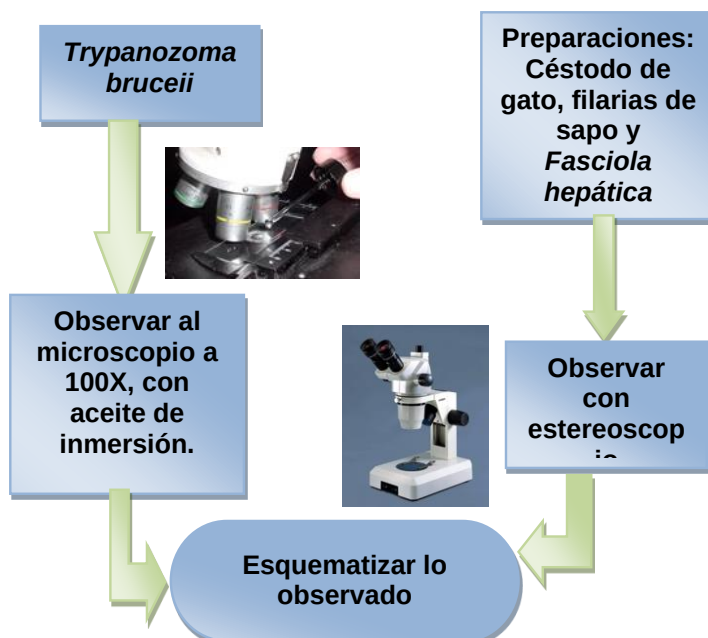
2. Colocar gota de agua entre porta y cubre objetos

4. Realizar descripciones y esquemas

3. Observar con objetivos seco débil y seco fuerte

SEGUNDA PARTE:

PREPARACIONES FIJAS



CUESTIONARIO

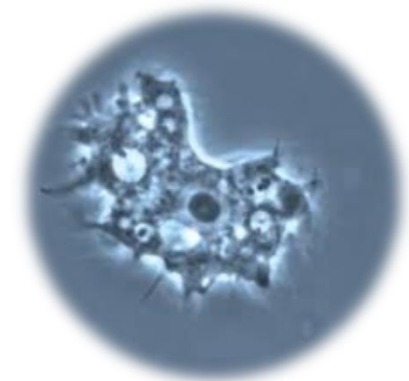
1. Mencione como mínimo cuatro protozoarios de vida libre y cuatro de interés médico que parasitan el intestino humano.
2. ¿Qué platelminto causa cisticercosis?
3. ¿Qué parásito puede causar elefantiasis?
4. ¿Qué parásito es agente causal del prolapso rectal en el humano?
5. ¿Cuántos tipos de *Plasmodium* causan paludismo en el hombre?

REFERENCIAS

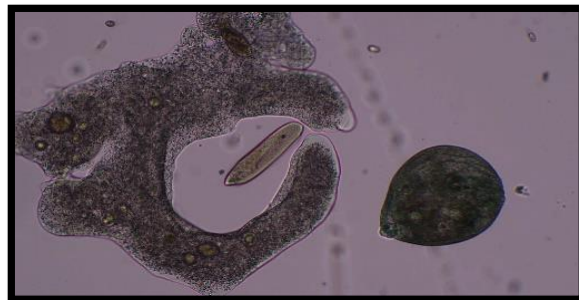
1. Tay ZJ, Velasco CO, Gutiérrez QM. Parasitología Médica. 7ª ed. México: Méndez editores; 2002.
2. Quiroz H. Parasitología: enfermedades parasitarias de animales domesticos. México: Editorial Limusa; 2005: p. 117-118.
- 3.
4. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Editorial Panamericana; 2007.
5. Capuccino J, Sherman N. Microbiology: Laboratoty manual. 5ª ed. USA: Benjamín/Cuminngs Pub Co edition; 1998.
6. Greenberg AE. Standard methods of the examination of water and wastewater. 18ª ed. USA: ALPHA edition; 1992.
7. Rodríguez E. Manual ilustrado de parasitología médica. México: Editorial Cuellar; 1998.
8. Zaman V. Atlas de parasitología médica. 2ª ed. Argentina: editorial Médica Panamericana; 2004.
9. Análisis de aguas: imagen tomada de URL: <http://cirabin.digitalbrain.com/cirabin/accounts/staff/casandra/web/PROGRAMA%20CLARA/?cmd=reorder&move=/cirabin/accounts/staff/casandra/web/PROGRAMA%20CLARA/https://www.youtube.com/watch?v=d3f2KoSXOkq&t=1360s>

Con respecto a los parásitos de vida libre encontramos toda una gran diversidad que constituye un ecosistema con consumidores y descomponedores. La mayoría son inofensivos, muy pocos son perjudiciales para el hombre. Nuestro interés se enfocará en agua residual en la que encontramos todo tipo de organismos, unicelulares y pluricelulares como bacterias, algas, arqueas, hongos, protozoarios, helmintos y virus.

Los protozoos son fagótrofos ya que ingieren bacterias, algas y algunas otras especies de protozoos algunos se dividen por fisión binario o por conjugación. Estos son organismos unicelulares, eucariotas heterótrofos y sin pared celular. Encontramos amebas de vida libre.



Algunas son patógenas en caso de penetrar a través del tracto respiratorio causando la muerte.



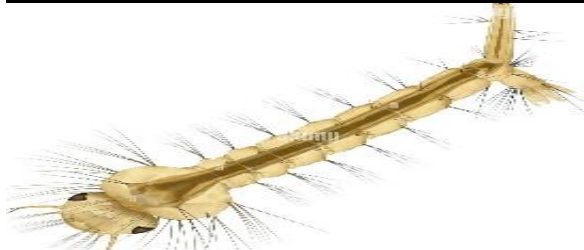
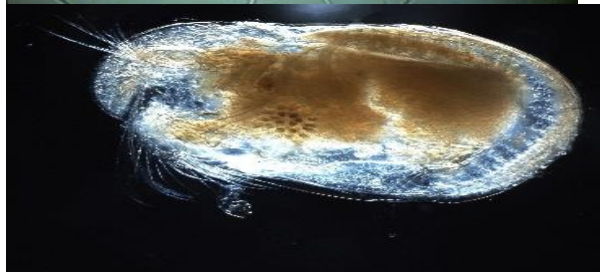
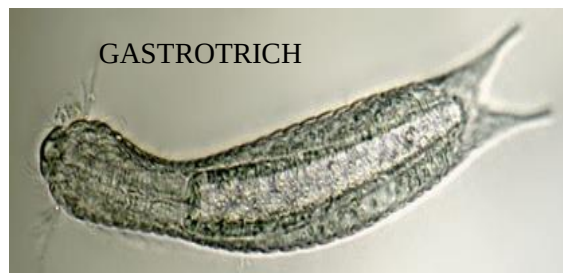
CILIADOS



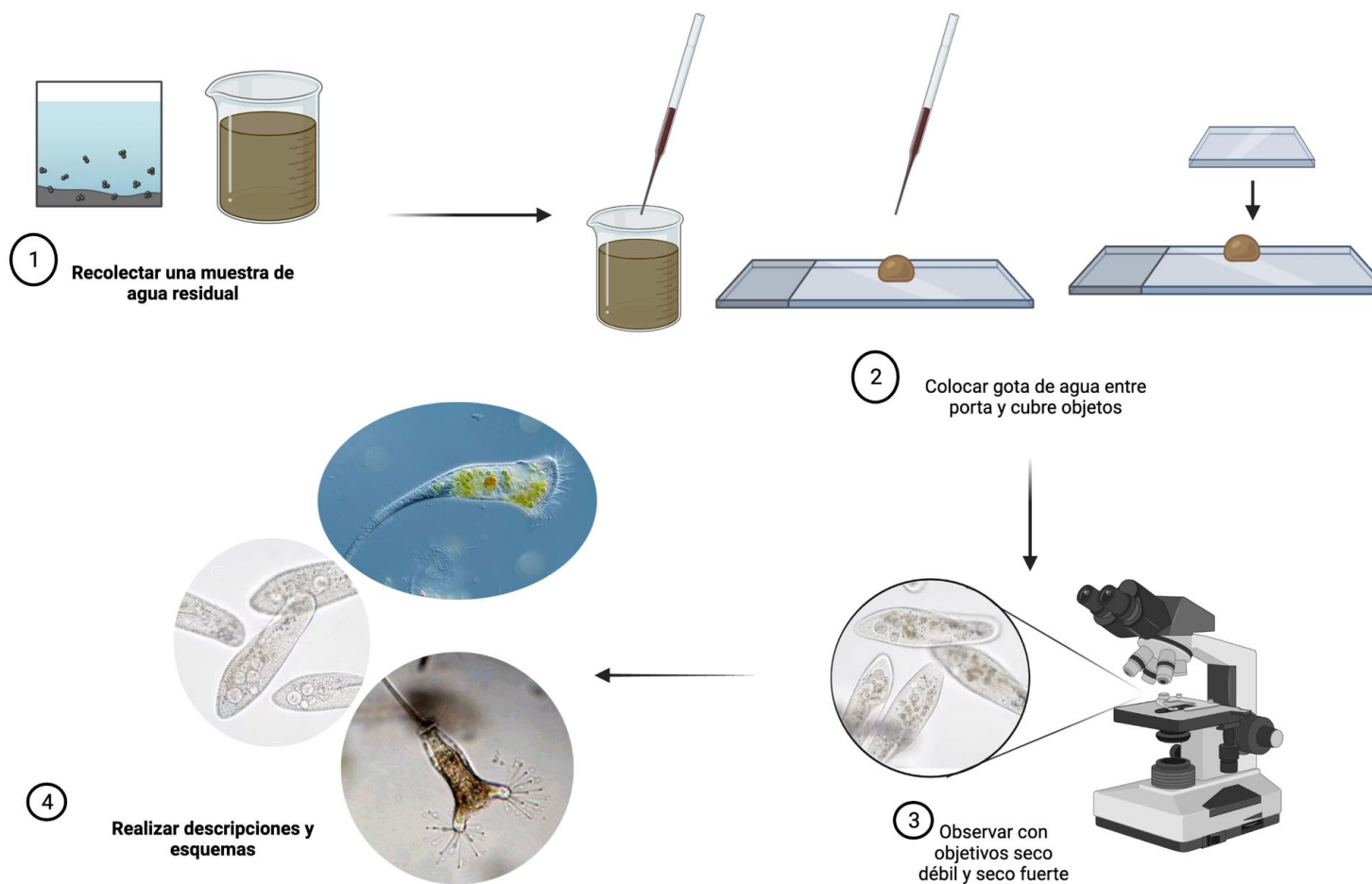
Paramecio



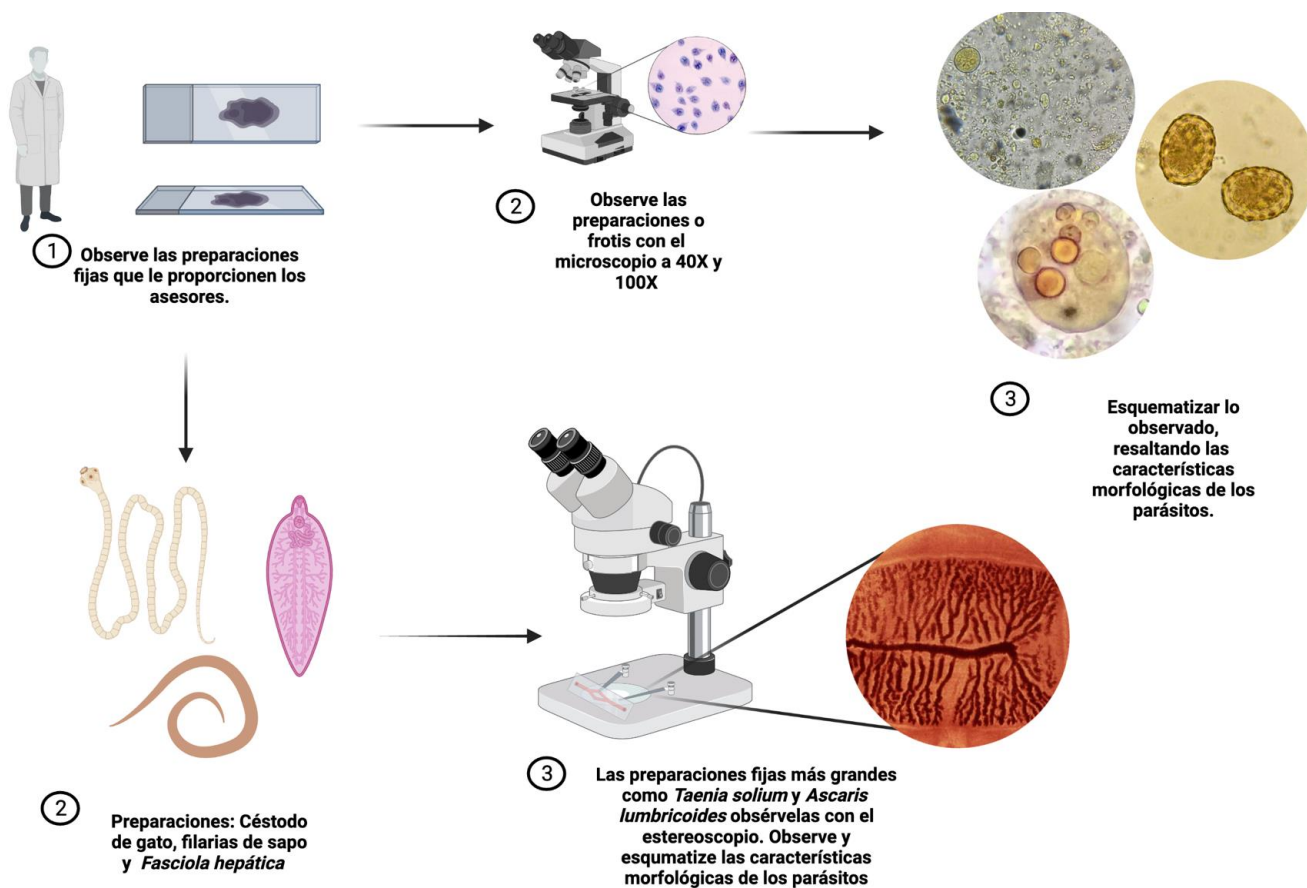




PRIMERA PARTE



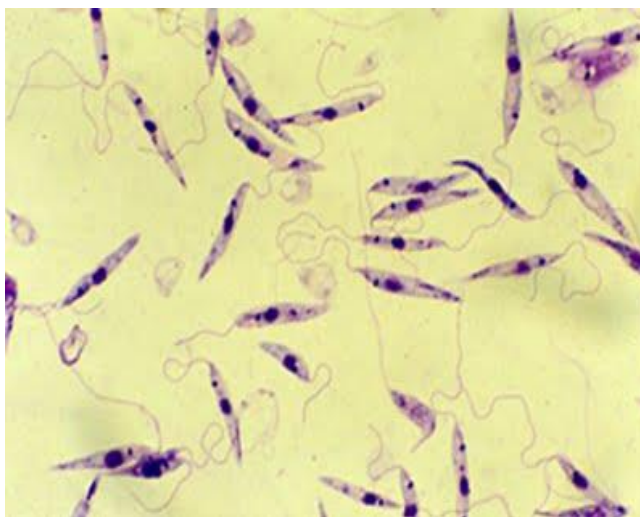
SEGUNDA PARTE





**PRÁCTICA
NÚMERO
2**

**TRANSMISORES, VECTORES Y
ECTOPARÁSITOS**



UNIDAD 1 PARASITOLOGÍA |

INTRODUCCIÓN

Las asociaciones que se presentan entre los seres vivos que hay en la naturaleza son muy amplias dentro de estas estudiaremos particularmente al parasitismo que es principalmente resultado de la relación entre dos seres vivos uno de los cuales es llamado parásito y el otro hospedero o mesonero. En esta relación biológica el parásito, es el único beneficiado de la asociación, pues obtiene casa y sustento del otro ser vivo llamado hospedero, con la particularidad de que el parásito causa daño al hospedero.

Una definición de un parásito es: Un organismo que vive a expensas de otro ser vivo al cual causa daño.

Existen diversos tipos de parásitos como son:

- a. Endoparásito: parásito que vive dentro del huésped. Pudiendo ser intracelular o extracelular. Fig. 1.2.1
- b. Ectoparásito: parásito que vive en la superficie externa del huésped. Pudiendo ser obligados o temporales; los ectoparásitos pueden succionar sangre, ingerir epitelio, etc. Son considerados un serio factor de diseminación de diversas enfermedades ya que en ocasiones pueden desempeñarse como vectores. Fig. 1.2.2

- c. Errático: el parásito se encuentra en localización no habitual un ejemplo de estos es *Ascaris lumbricoides* cuando se encuentra parasitando el riñón u otros lugares del cuerpo humano.

Figura.1.2.1



•Ectoparásito

Figura 1.2.2



•Endoparásito

El tipo de transmisión se puede dar de dos formas:

- a. Transmisión mecánica; los vectores son acarreadores pasivos de enfermedades, por: picadura, excreción, posar sus patas en alimentos, lesiones, etc.
- b. Transmisión biológica; en este caso parte del ciclo del parásito se desarrolla dentro del ectoparásito.

Esta a su vez se divide en:

- a. Propagativa; el parásito, en el interior del artrópodos no se presentan cambios en su ciclo

biológico pero si se reproduce activamente. Un ejemplo es el virus que causa la fiebre amarilla.

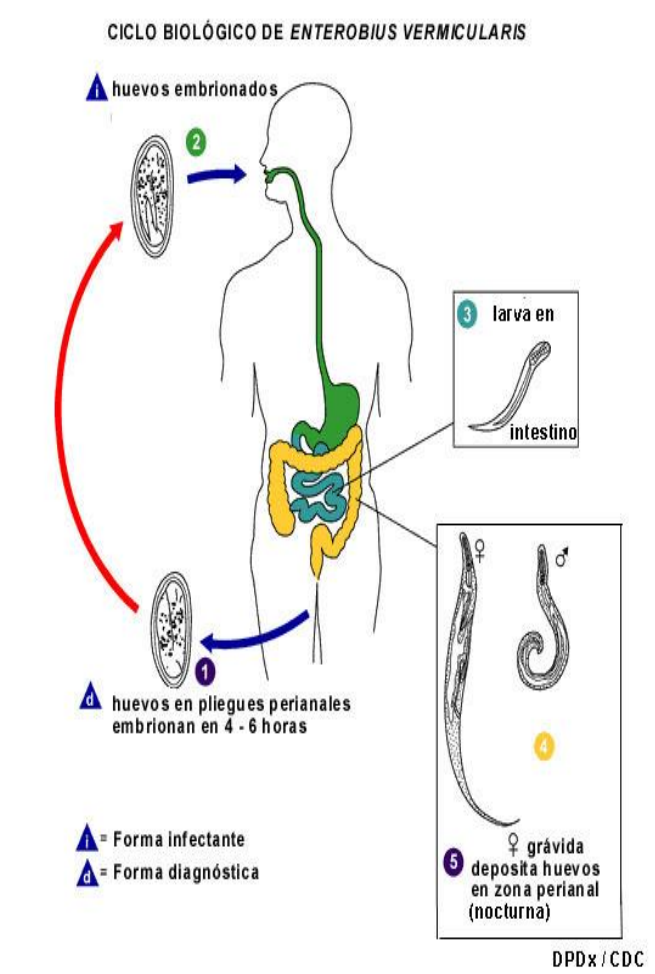
- b. Ciclopropagativa; el parásito dentro del ectoparásito presenta cambios en su ciclo biológico y además se reproduce activamente. Un ejemplo es el mosquito *Anopheles* que transmite el paludismo.
- c. Ciclodesarrollo; el parásito dentro del artrópodos sufre cambios en su ciclo pero no se reproduce. Un ejemplo pueden ser los ectoparásitos que contienen y transmiten las filarias.

El ciclo de vida de los parásitos varía en la mayoría de las especies conocidas, esto dependiendo de la cantidad de hospederos intermediarios que tienen. Las principales clasificaciones son:

- a. Monoxeno: son aquellos parásitos que en su ciclo biológico tienen un sólo huésped; ejemplo: *Enterobius vermicularis* cuyo único huésped es el hombre. Fig. 1.2.3
- b. Polixenos: parásitos que en su ciclo biológico presentan un huésped definitivo y uno o varios intermediarios. El ejemplo más común dentro de estos parásitos es *Leishmania sp.*
- c. Metaxeno: es aquel parásito en cuya transmisión interviene uno de sus

huéspedes, ya sea el definitivo o el intermediario.

Figura 1.2.3. Ciclo de vida de *Enterobius vermicularis*



OBJETIVOS:

1. Adquirir la capacidad para identificar parásitos así como las diversas fases en las que se pueden presentar.
2. Conocer algunos mecanismos de transmisión y propagación de un parásito.
3. Conocer los ciclos biológicos de algunos parásitos.

MATERIAL POR EQUIPO:

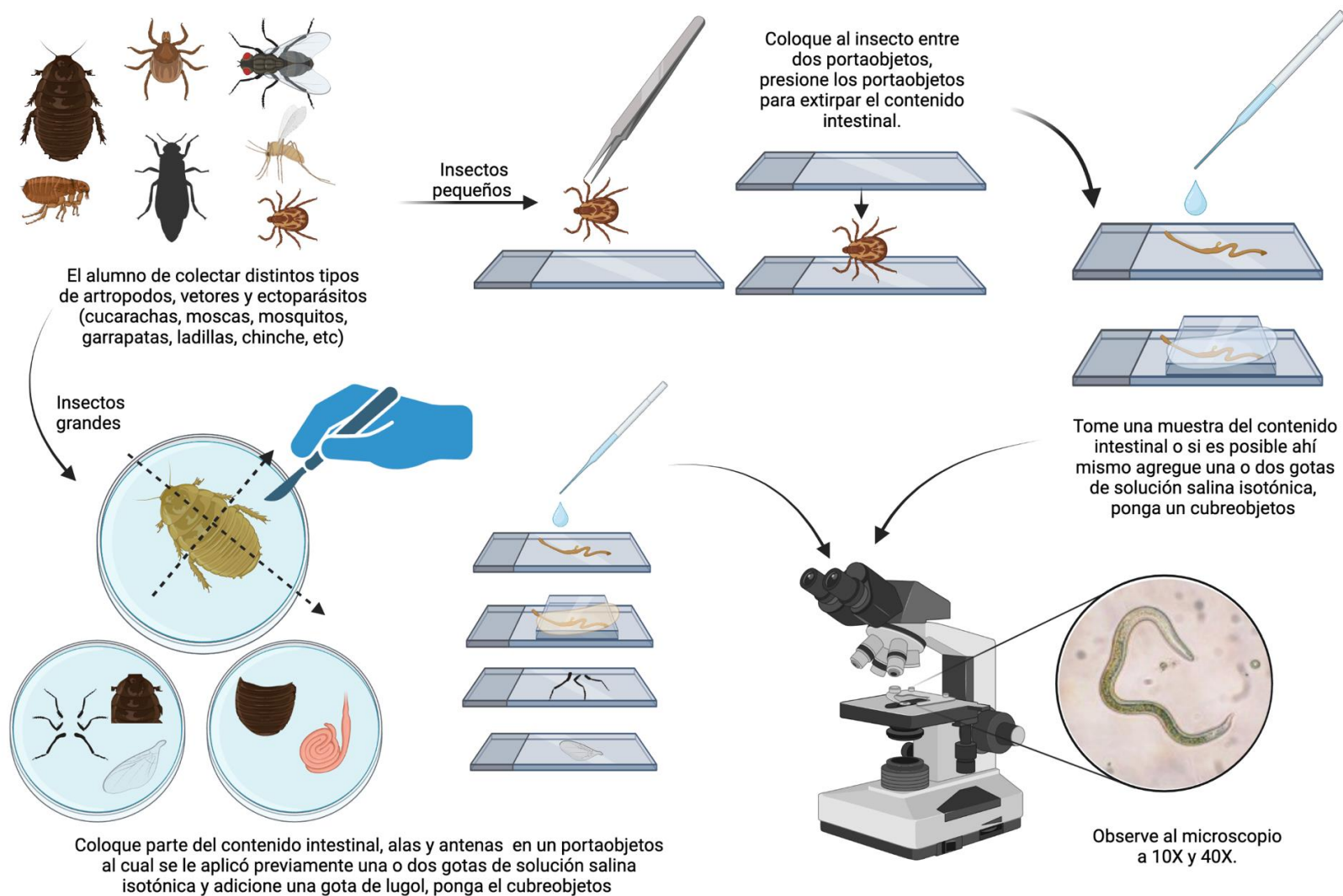
- ✓ Microscopio.
- ✓ Estuche de disección.
- ✓ Solución salina isotónica 250 mL.
- ✓ Colorante de Giemsa 50 mL.
- ✓ Lugol 25 mL.
- ✓ El asesor le indicara al alumno que artrópodos debe de traer para el desarrollo de la práctica (pulgas, chinches, piojos, moscas, cucarachas, garrapatas, hormigas, termitas, etc.).

MÉTODO

1. Obtenga cuidadosamente el contenido intestinal de los artrópodos asignados por el asesor (pulgas, chinches, garapatas, cucarachas, moscas etc.)
2. Tome los insectos grandes por la cabeza con ayuda de unas pinzas y colóquelos en una base para así poder abrirlos de la parte ventral con ayuda de un bisturí.
3. Coloque parte del contenido intestinal en un portaobjetos.
4. Aplicar previamente una o dos gotas de solución salina isotónica, ponga el cubreobjetos y observe con el microscopio a 10X y 40X.
5. En el caso de insectos pequeños; coloque al insecto entre dos portaobjetos, presione los portaobjetos para extirpar el contenido intestinal.
6. Tome una muestra del contenido intestinal o si es posible ahí mismo agregue una o dos gotas de solución salina isotónica, ponga

- un cubreobjetos y observe al microscopio a 10X y 40X.
7. Coloque parte del contenido intestinal en un portaobjetos al cual se le aplicó previamente una o dos gotas de solución salina isotónica y adicione una gota de lugol, ponga el cubreobjetos y observe con el microscopio a 10X y 40X.
 8. Inactivar en un frasco con solución de hipoclorito de sodio todas las muestras observadas

DIAGRAMA DE FLUJO



CUESTIONARIO

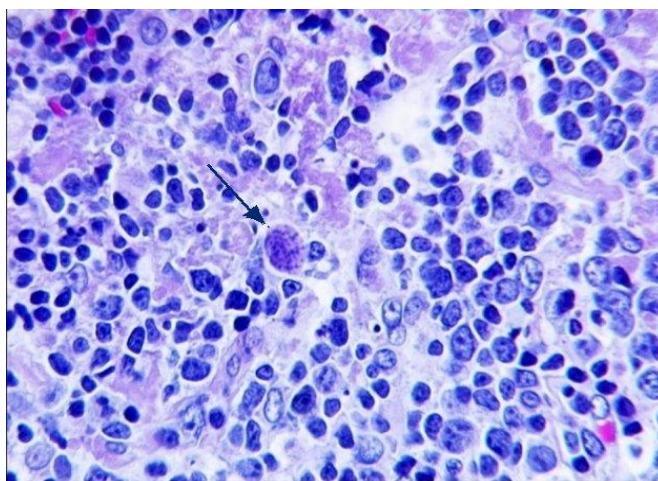
1. De qué forma se transmiten y cuáles son los posibles endoparásitos que pueden contener los diversos artrópodos que le tocó estudiar en la práctica (especifique al menos tres).
2. Explique el ciclo biológico del Paludismo y la Enfermedad de Chagas, indique que enfermedad transmiten (síntomas), que parásitos son los que portan y la forma de transmisión de los artrópodos.
3. Identifique las estructuras anatómicas de los artrópodos o insectos asignados

REFERENCIAS

1. Quiroz H. Parasitología: enfermedades parasitarias de animales domésticos. México: Editorial Limusa; 2005. P. 117-118.
2. Tay ZJ, Velasco CO, Gutiérrez QM. Parasitología médica. 7ª ed. México: Méndez editores; 2002.
3. Zaman V. Atlas de parasitología médica. 2ª ed. Argentina: editorial Médica Panamericana; 2004.
4. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Editorial Panamericana; 2007.
5. Capuccino J, Sherman N. Microbiology: Laboratory manual. 5ª ed. USA: Benjamín/Cuminngs Pub Co edition; 1998.
6. Greenberg AE. Standard methods of the examination of water and wastewater. 18ª ed. USA: ALPHA edition; 1992.
7. Rodríguez E. Manual ilustrado de parasitología médica. México: Editorial Cuellar; 1998

**PRÁCTICA
NÚMERO
3**

**TÉCNICAS DE COLECTA Y TINCIÓN DE
PARÁSITOS**



UNIDAD 1 PARASITOLOGÍA |

INTRODUCCIÓN

La parasitología es la ciencia que estudia los fenómenos de dependencia de los seres vivos.

Un parásito puede vivir dentro o fuera del huésped.

El diagnóstico de las enfermedades parasitarias se fundamenta en la correcta identificación de estos organismos a través de los diferentes métodos de diagnósticos.

Los métodos de diagnóstico se reducen a:

Diagnóstico clínico: está basado en las reacciones fisiopatológicas del hospedero, que dan lugar a los síntomas propios de cada parasitismo, es decir, a un cuadro clínico que puede tener características más o menos típicas y que a pesar de su utilidad, carece de la solidez suficiente para afirmar un diagnóstico.

Diagnóstico del laboratorio: puede realizarse por dos mecanismos distintos:

1.- Métodos directos: considerados como un diagnóstico de certeza que permite determinar o precisar el agente causal por hallazgo del parásito o de sus elementos morfológicos a través del examen macroscópico que permite identificar el parásito en su estado adulto o fragmentos de ellos y que

comprende el examen a simple vista o con lupa.

Otros de los exámenes utilizados es la observación microscópica de las diferentes fases evolutivas del parásito (quistes, trofozoítos, huevos, larvas,). Se realiza a través del examen directo y examen concentrado.

2.- Métodos indirectos: permiten establecer un diagnóstico de probabilidad y se basan en la interpretación de las reacciones del hospedero, por ejemplo:

- a) Inmunodiagnóstico: determinación de inmunoglobulinas, fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, látex, técnicas de inmunofluorescencia e inmunoelectroforesis, ELISA.
- b) Electrocardiograma (ECG), ultrasonido, radiología y tomografía axial computarizada (TAC).

Para el estudio de algunos parásitos o sus ciclos de vida se requiere del estudio de los mismos, en animales de experimentación, para esto es indispensable el sacrificio de algunos animales, utilizar los desechos o heces de ellos.

En ocasiones es necesario aplicar el sacrificio a animales, este sacrificio debe realizarse con métodos humanitarios por lo que se requiere una uniformidad en los métodos de insensibilización humanitaria que garanticen una muerte rápida, sin sufrimiento y dolor para los animales.

(Ver NOM NOM-033-ZOO-1995)

Los cadáveres y partes de animales utilizados en investigación deben ser correctamente desechados.

(Ver NOM-087-ECOL-SSA1-2002)

OBJETIVOS:

1. Aprender a coleccionar material parasitario de animales de experimentación y domésticos.
2. Conocer y utilizar las diferentes técnicas de tinción, utilizadas en *Parasitología*.

MATERIAL POR EQUIPO:

- ✓ Un microscopio.
- ✓ Un estereoscopio.
- ✓ Un pliego de Papel absorbente.
- ✓ Un estuche de disección.
- ✓ Bolsa amarilla para desechos biológicos

MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Ratas y ratones de laboratorio
- ✓ Visceras de animales obtenidas de rastros
- ✓ Pulgas, garrapatas, piojos, chinches, etc.

REACTIVOS NECESARIOS:

- ✓ Solución salina isotónica 250 mL
- ✓ Lugol
- ✓ Solución de AFA 100 mL
- ✓ Una caja de portaobjetos y una de cubreobjetos.

MÉTODO

1) Búsqueda y estudio de ectoparásitos:

- a) Localice y obtenga los ectoparásitos que se encuentran sobre los animales asignados.
- b) Sacrifique los ectoparásitos. Siga la metodología utilizada en la práctica número 2 (vectores, transmisores y ectoparásitos)
- c) Registre los resultados obtenidos

2) A las ratas y ratones empleados utilizar las técnicas de eutanasia aprobadas por la normatividad vigente. Se les toma sangre y se realiza lo siguiente:

Sangre:

a) Técnica de gota gruesa:

- Coloque sobre un portaobjetos limpio una gota de sangre del animal estudiado y se extiende, con una de las aristas de un portaobjetos formando un cuadro de aproximadamente 1.5 cm, con el fin de desfibrinar la sangre y se deja secar.
- El siguiente paso es el lacado o lisado de los eritrocitos en agua destilada, durante 8-10 minutos, hasta decolorarla totalmente, se seca y se procede a teñir con el método de Giemsa, observar al microscopio en 10X, 40X y 100X aumentos, que corresponden a la

utilización de los objetivos llamados; seco débil, seco fuerte y de inmersión.

b) Frotis o extensión fina de sangre:

- Deposite una gota de sangre del animal estudiado en uno de los extremos del portaobjetos, y con el borde de otro portaobjetos se realiza la extensión de la sangre.
- Mueva rápido este segundo portaobjetos el cual debe de formar un ángulo de aproximadamente 30 grados se debe tener el cuidado de no lisar los eritrocitos por lo cual se colocará el segundo portaobjetos después de la gota de sangre para que sea arrastrada por capilaridad. Se deja secar, se tiñe con el método de Wright y se observa al microscopio en 10X, 40X y 100X aumentos.

3) Obtención de Protozoarios y Helmintos:

- a) Hacer una incisión a todo lo largo de la línea media ventral.
- b) Una vez abierto el animal buscar en la superficie de los órganos internos y las membranas serosas la presencia de quistes.
- c) A continuación, extraer órgano por órgano, los que se colocan en placas que contiene solución salina.
- d) Abrir los órganos huecos con una tijera y los esponjosos se desmenuzarán en busca de

helmintos, el contenido del intestino se observará al microscopio en busca de protozoarios y helmintos.

- e) Realizar una impronta con una porción pequeña y delgada de algunos de los órganos del animal.
 - f) A los helmintos encontrados se les limpiará de moco y resto de tejido.
 - g) Conservar a los helmintos limpios en AFA y fijar posteriormente, con alguna de las técnicas que se sugieren en el anexo de esta práctica.
-

CUESTIONARIO

1. Desarrolle el ciclo biológico de los parásitos que encontró en la práctica. De no haber encontrado ningún parásito, el asesor le asignará el o los parásitos que desarrolle.
2. Nombre y explique el fundamento de dos técnicas de fijación y tinción, para protozoarios y helmintos, aparte de las incluidas en el anexo.
3. Nombre y desarrolle el ciclo biológico de dos nemátodos hematófagos y parásitos del humano.
4. ¿En qué consiste la estandarización de los colorantes y que factores intervienen en esta?
5. Mencione e identifique los ectoparásitos y endoparásitos que parasitan comúnmente a los animales requeridos en la práctica.
6. Identifique las estructuras fisiológicas de los animales utilizados en la práctica y mencione o esquematice su correcta manipulación.
7. Explique en qué consisten las normas oficiales mexicanas en manejo de animales de experimentación.

REFERENCIAS

1. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Editorial Panamericana; 2007.
2. Biagi F. enfermedades parasitarias. 3ª ed. México: Ediciones El Manual Moderno; 2004.
3. Capuccino J, Sherman N. Microbiology: A laboratory manual. 5ª ed. USA: Benjamin/Cummings Pub Co edition; 1998.
4. Rodríguez E. Manual ilustrado de parasitología médica. México: Editorial Cuellar; 1998.
5. Zaman V. Atlas de parasitología médica. 2ª ed. Argentina: editorial médica panamericana; 2004.
6. Beaver CP. Parasitología clínica. 2a ed. México: Salvat Editores; 1986.

ANEXO:**Fijación y Tinción de Helmintos adultos:****a) Técnica de Glicerol-Gelatina para Nemátodos Pequeños;**

- Disolver 10 g de gelatina en 60 mL de agua, adicione 70 mL. de glicerol puro y 0.5 mL de cristales fundidos de fenol. Esto se mantiene en un baño de agua (a 45°C) hasta que se emplee.
- Fije los nemátodos en alcohol glicerol (70 mL de alcohol al 95%, 25 mL de agua destilada, 5mL de glicerol) a la mezcla caliente de 60 a 63 °C. Los especímenes pueden ser almacenados indefinidamente en esta solución, pero deben de transferirse a un vidrio de reloj con una tapa que no cubra por completo la placa.
- Después de varios días, el alcohol se evaporará dejando al gusano en una concentración alta de glicerol. Si la evaporación es rápida el gusano se colapsará o se destruirá rápidamente.
- Transfiera el gusano a una placa que contenga glicerol puro, después de varias horas se depositará en el fondo los nematodos. Ponga una gota de glicerol-gelatina sobre un cubreobjetos, deposítelo sobre la placa, deje toda la noche.

- A la mañana siguiente se sella el cubreobjeto con esmalte, pintura o barniz de uñas.

b) Fijación de cestodos en Formalina;

- Caliente formalina-buffer de 60 a 63°C. Los gusanos se colocan en la solución y se agitan suavemente, para permitir la fijación sin contraer los proglótidos.

c) Fijación de Trematodos;

AFA (alcohol, formalina y ácido acético):

10 mL de formaldehído.

50 mL de alcohol al 95%.

5 mL de ácido acético glacial.

45 mL de agua destilada.

Caliente la solución de 60 a 63°C y fije los trematodos por 24 horas. Pueden colocarse los gusanos entre dos placas, si ellos se enrollan.

d) Tinción Indica, para Segmentos de Cestodos;

Esta tinción de segmentos grávidos permite mostrar las ramas del útero y permite diferenciar entre *T. solium* y *T. saginata*.

- Coloque los segmentos en agua por varias horas hasta que se relaje los tejidos de los proglótidos.
- Extraiga del agua los proglótidos y séquelos con un pañuelo facial,

colóquelo sobre un portaobjetos, presione cuidadosamente con un aplicador. Usando una aguja inyectora pequeña aplique la tinta india, dentro de los proglótidos.

- Lave el proglótido rápidamente con agua, seque y coloque entre dos portaobjetos, manténgalos unidos con una banda elástica a cada borde.
- Deshidrate el segmento del Cestodo con varios cambios de alcohol del 50% al 70% si se requiere.
- Aclare el segmento con dos cambios de Xilol y monte en bálsamo de Canadá.

e) Método de Transparentación de Proglótidos;

- Los proglótidos de la *Taenias* se lavan en formol hasta que pierda la porción mucosa que recubre.
- Se escoge uno de los proglótidos terminales del gusano y se coloca en el centro de un portaobjetos y después se pone encima otro portaobjetos quedando el segmento en “emparedado”.
- Con un hilo en cada extremo se presiona el emparedado, se deja uno de los hilos más largo.
- Sujetando este hilo se sumerge en una solución aclaradora de lactofenol hasta que se aclare.
- Cuando el proglótido se haya transparentado, se extrae el emparedado.
- Se abre el emparedado y con unas pinzas se toma el proglótido y se

coloca en un portaobjetos limpio y se fija con resina.

f) Tinción para la Observación de Microfilarias;

Tinción supravital;

Reactivo

- Azul de cresilo al 75% en solución salina.
- Azul de metileno al 1% en solución salina.

Se usa para teñir microfilarias vivas porque permite la tinción bajo su cubierta, se tiñe el núcleo y también provee un contraste entre el portaobjetos y el microorganismo. La preparación mientras se tiñe debe guardarse en una cámara húmeda

g) Tinción de Protozoarios.

- Tinción permanente en Giemsa

Reactivo:

- Giemsa al 4% en un buffer de fosfatos a pH 6.8
- Fije el frotis fecal en metanol por un minuto. Tiña con solución de Giemsa por 30 minutos. Se lava en buffer y seque.

Los flagelos, cilios y núcleo se tiñe de color rojo. El citoplasma y los esporocistos se tiñen de color azul.

Clave de actividad: S3Zoo

Tabla comparativa del cumplimiento de las normas

Norma	Se cumple	No se cumple
NOM-062-ZOO-1999	NO ESPECIFICA A LA AVES Sin embargo, es correcto el degollamiento ya que la muestra que se requiere es abundante y no se puede emplear anticoagulante & se emplean las técnicas de gota gruesa, frotis delgado y observación de en fresco	NO ESPECIFICA AVES
NOM-033-ZOO-1995 tiene por objeto, establecer los métodos de insensibilización y sacrificio de los animales, con el propósito de disminuir su sufrimiento, evitando al máximo la tensión y el miedo durante este evento.	No se realiza ningún maltrato ni sufrimiento al espécimen Se cuenta con experiencia laboral El método que se ha empleado es degollarlas con tijeras que es un método rápido y sin tanto sufrimiento	No se puede utilizar armas de fuego de suficiente calibre para provocar muerte inmediata Ninguna persona intervendrá en el manejo, insensibilización y sacrificio de los animales, a menos que cuente con la capacitación específica. Ningún animal se sacrificará por envenenamiento, ahorcamiento, ahogándolo, por golpes o algún

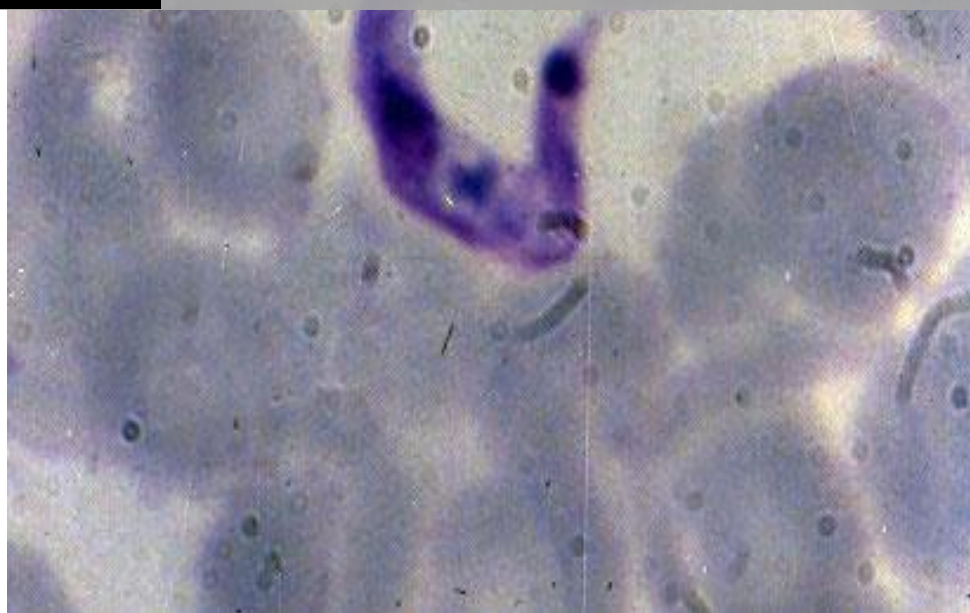
		otro procedimiento que cause sufrimiento o prolongue su agonía El insensibilizarlas a través del método indicado de choque eléctrico implica mayor sufrimiento y mayor liberación de toxinas
nom-087-ecol-1995	Los cadáveres se colocan en bolsas de plástico de color amarillo y se les adiciona cal para evitar un poco la descomposición	

Se habla en la NOM 033 de aves que serán empleadas para consumo humano



PRÁCTICA
NÚMERO
4

HEMOPARÁSITOS



UNIDAD 1 PARASITOLOGÍA |

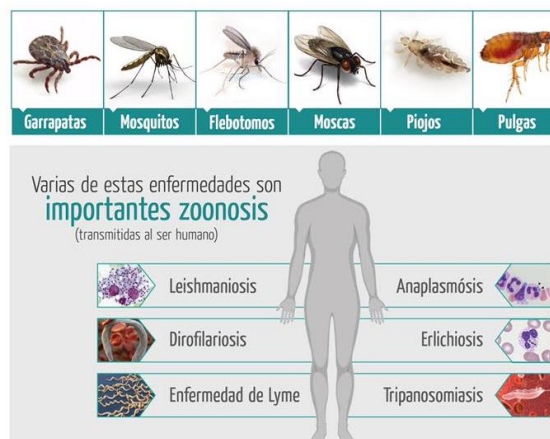
INTRODUCCIÓN

Los protozoarios son los microorganismos que mayormente pueden parasitar la sangre del humano. Por lo que se hace necesario el conocer el tipo de células presentes en sangre que pueden ser parasitadas y los posibles parásitos que más comúnmente se presentan en sangre.

Las Hemoparasitosis constituyen enfermedades ampliamente distribuidas en toda América, al igual que sus vectores, causando efectos negativos en la salud de los rebaños animales y sobre la producción y rentabilidad de los sistemas de producción animal establecidos en las diferentes regiones del continente. Están presente en muchos animales incluyendo aquellos que se emplean como mascotas y en la alimentación humana. Ejemplos son la Erlichiosis y la anaplasmosis y los *Haemoproteus sp* en las aves. Igualmente, la Trypanosomiasis, la malaria, la babesiosis, las filarias y la leishmaniasis en humanos ocasionan importantes problemas de salud en la población humana americana.

PRÁCTICA NÚMERO 4

HEMOPARÁSITOS



Existen diversas técnicas para determinar los parásitos en sangre. Algunas sumamente sencillas y eficaces como son los frotis sanguíneos, otros más sofisticados pero muy precisos como son las técnicas inmunológicas, las cuales son indispensables de conocer por el Q.F.B.

Los métodos Inmunoenzimáticos son las técnicas que se están utilizando actualmente y consisten en; Ser técnicas que emplean antígenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima.

Se basan en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad del sistema indicador.

Existen dos tipos de inmunoensayos: homogéneos y los heterogéneos.

Inmunoensayo homogéneo:

Se basa en los cambios de la actividad enzimática, un hapteno es unido a la

PRÁCTICA NÚMERO 4 ³

HEMOPARÁSITOS

enzima de tal forma que altera su actividad cuando el hapteno se une al anticuerpo.

Su uso se da sobre todo en; la detección de drogas de abuso, en la medición de niveles terapéuticos de drogas, etc.

Ventajas; ensayo específico, sensible, de amplia aplicación, equipo requerido barato y disponible, reactivos baratos y de vida media-larga, potencialmente se puede automatizar y no tiene peligro de radiación.

Inmunoensayo heterogéneo:

Es el llamado Análisis de inmunosorbente unido a enzimas (ELISA). Esta técnica combina las ventajas de la Inmunofluorescencia y el radioinmunoensayo, superando las ventajas de otros métodos.

Se usa esta prueba para determinar y medir la presencia de sustancias con un PM mayor a los 10,000 Daltons.

Ventajas; ensayo específico, sensible, preciso y eficiente.

Las técnicas de ELISA pueden ser competitivas, no competitivas e indirectas.

La variante **no competitiva** es la más utilizada y se verá en forma demostrativa en la presente práctica y consiste en:

El llamado ensayo inmunoenzimático, ELISA indirecta, en esta técnica el

antígeno reacciona con un exceso estequiométrico de anticuerpos y la reacción antígeno-anticuerpo es medido en un segundo paso.

Se usan antígenos bivalente o polivalente y se siguen los siguientes pasos:

1. El anticuerpo específico se inmoviliza en la fase sólida, el anticuerpo no pegado se elimina por lavado.
2. La solución conteniendo el antígeno se incuba con la fase sólida sensibilizada, se elimina por lavado el antígeno que no reacciona.
3. El complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado se incuba con un exceso de un segundo anticuerpo unido a la enzima, se elimina por lavado lo que no reacciona.
4. Se adiciona el sustrato y el cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra, como se ve en la figura 1.4.2

Se usa la técnica para cuantificar los marcadores tumorales como antígeno carcinoembrionogénico, alfafetoproteína y otros antígenos como proteínas, virus, bacterias, parásitos y hongos.

Los elementos, que se usan en la técnica de ELISA son:

1. Fase sólida.
2. Etapas de lavado.
3. Muestra a ensayar.



4. Antígeno.
5. Conjugado (métodos de Nakane o el de Avrameas).
6. Sustrato y cromógeno.

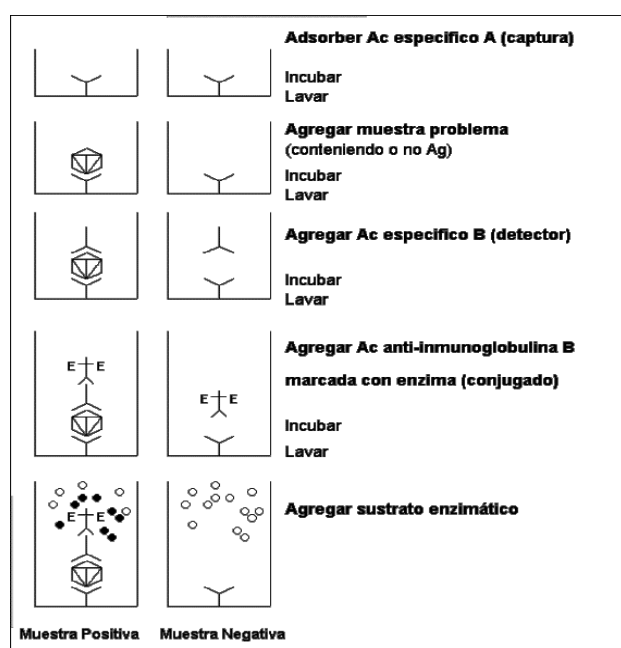


Figura 1.4.2 Pasos generales de la técnica de ELISA



OBJETIVOS:

1. El alumno aprenderá a realizar técnicas; hematológicas para determinar los parásitos presentes en sangre.
2. Que el alumno tenga el conocimiento de las técnicas que se utilizan en la actualidad para determinar parásitos presentes en sangre.
3. Familiarizar al alumno con el manejo de muestras sanguíneas para su posterior análisis.

MATERIAL POR EQUIPO:

1. Microscopio.
2. Aceite de inmersión.
3. Fortis o preparaciones realizadas en la práctica anterior.
4. Canastillas para tinción o en su defecto cajas petri
5. Portaobjetos una caja.
6. Cubreobjetos una caja.
7. Placas de lectura de la técnica de ELISA, una.
8. Lector de ELISA (preferentemente).

REACTIVOS POR EQUIPO:

1. Metanol 100 ml.
2. Colorante de Giemsa 50 ml.
3. Colorante de Wright 50 ml.
4. Amortiguador de fosfatos para la tinción de Giemsa y para la tinción de Wright 100 ml. para cada uno.



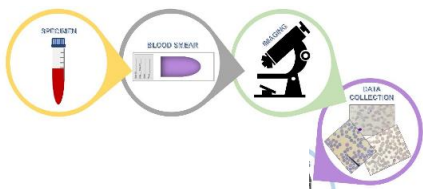
MÉTODO

Utilice las laminillas obtenidas en la práctica número tres y tíñalas con las técnicas de Giemsa y/o Wright.

*Los tiempo señalados para realizar las tinciones serán modificados de a cuerdo a la madurez de los colorantes.

Tinción de Wright:

1. No es necesario fijar el frotis.
2. Coloque el portaobjetos en la canastilla para tinción y sumérjalas en el recipiente que contiene el colorante de Wright sumergiendo por completo la canastilla.
3. Después de cinco minutos escurra la canastilla para eliminar los restos de colorante y sumerja la canastilla en solución amortiguador (amortiguador de fosfatos o agua destilada)
4. Después de cinco minutos enjuague con agua de la llave.
5. Deje secar y lea al microscopio, en seco débil 10X, seco fuerte 40X y a inmersión 100X.



Tinción de Giemsa:

1. En un frotis delgado es necesaria la fijación con metanol.
2. Coloque los portaobjetos en canastillas para tinción y sumérjala en un recipiente con metanol durante veinte minutos.

PRÁCTICA NÚMERO 4 | 6

HEMOPARÁSITOS

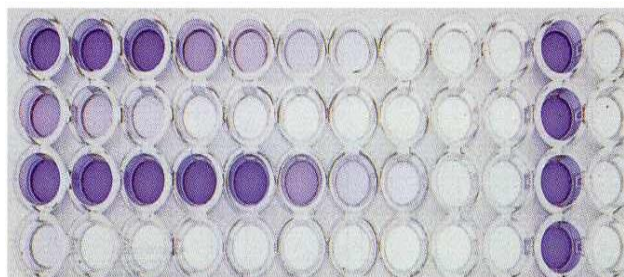
3. Deje secar el frotis al aire.
4. Coloque la canastilla en el recipiente que contiene colorante de giemsa durante diez minutos.
5. Saque y deje secar la preparación y lavar con solución amortiguador (unas gotas del colorante en agua destilada) por 5 minutos.
6. Si se llega a sobre teñir repita el lavado.
7. Seque y lea al microscopio a seco débil 10X, seco fuerte 40X e inmersión 100X.

*Es importante marcar los portaobjetos antes de realizar las tinciones, para identificar las diferentes preparaciones. Se recomienda el uso de lápiz con punta de diamante.

*Para las improntas realizadas repita el proceso de esta tinción.

Técnica de ELISA:

Esta técnica la mayor de las ocasiones en este laboratorio se realiza únicamente de manera demostrativa por lo cual sólo se muestra de manera general el procedimiento de la técnica en tres de sus principales métodos como se muestra en la siguiente figura.



PRÁCTICA NÚMERO 4

HEMOPARÁSITOS

7

Cuadro 1.4.1 Pasos que se realizan en la técnica de ELISA.

Figura 1.4.3. Resultados de la técnica de ELISA.

pasos	ELISA directo	ELISA Indirecto	ELISA en sándwich
Recubrimiento de los pozos con:	Antígeno	Antígeno	Anticuerpo (Ac)(5)
Lavado con regulador fisiológico (1)	3 veces	3 veces	3 veces
Bloqueo(2)	+	+	+
Incubación con:	Ac-Enzima (3)	Suero problema	Antígeno problema
Lavado con regulador fisiológico:	4 veces	3 veces	3 veces
Incubación con:	-	Ac-Enzima (4)	Ac-Enzima (5)
Lavado con regulador fisiológico:	-	4x	4x
Adición de sustrato (+ cromógeno) (6):	+	+	+
Detención de la reacción (7):	+	+	+
Lectura a la λ apropiada (8):	+	+	+

- 1) Solución salina (pH 6.0), solución salina-fosfatos (pH 7.4), solución salina-boratos (pH 8.4), etc. Algunos adicionan tween 20 del 0.01 al 0.05% a la solución de lavado, otros no lo hacen.
- 2) Solución de albúmina, caseína, gelatina o leche descremada al 2-3% en el regulador fisiológico.
- 3) Anticuerpo específico, acoplado a una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina, B-galactosidasa, etc.).
- 4) Anticuerpos contra el antígeno problema, el primer anticuerpo (de captura) usualmente es monoclonal, el segundo anticuerpo (de detección), acoplado a una enzima, casi siempre es policlonal.
- 5) El sustrato y el cromógeno (cuando este es necesario) dependen de la enzima.
- 6) La reacción se detiene con diferentes reactivos, dependiendo del cromógeno.
- 7) La longitud de onda de lectura depende del color del producto de la reacción enzima-sustrato-cromógeno.



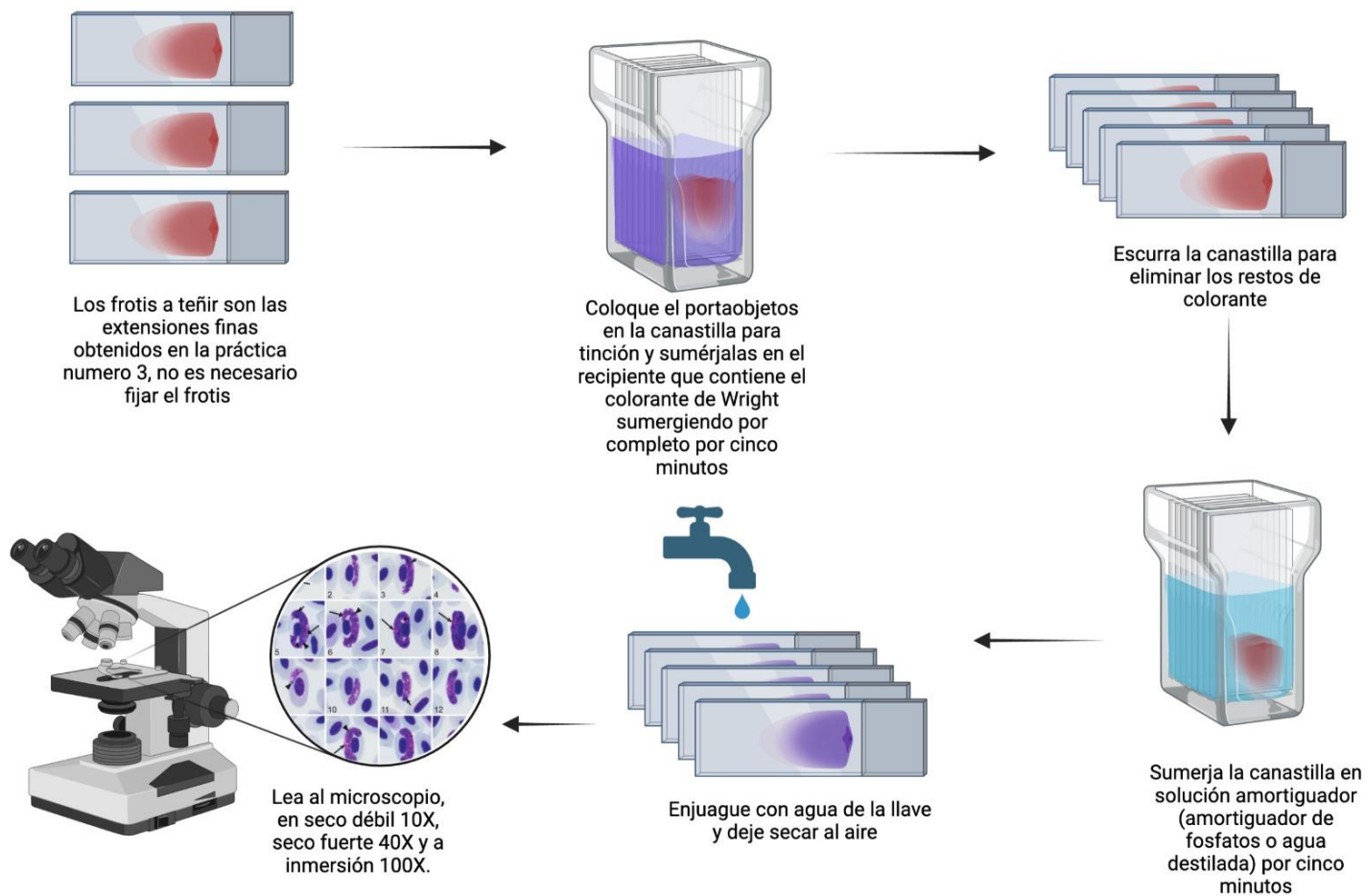
PRÁCTICA NÚMERO 4

HEMOPARÁSITOS

8

Diagrama de flujo

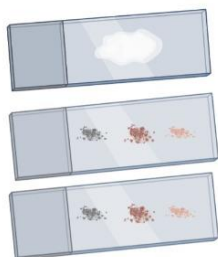
TINCIÓN DE WRIGHT



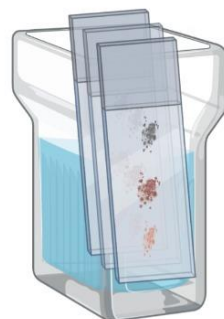
PRÁCTICA NÚMERO 4 | 9

HEMOPARÁSITOS

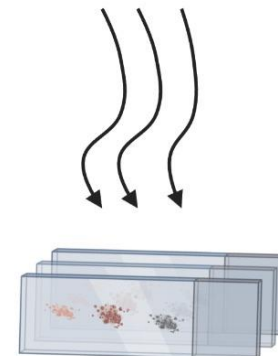
TINCIÓN DE GIEMSA



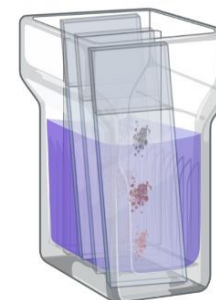
Los frotis a teñir son las improntas y los frotis por técnica de gota gruesa obtenidos en la práctica numero 3



Coloque los portaobjetos en canastillas para tinción y sumérjala en un recipiente con metanol durante veinte minutos.



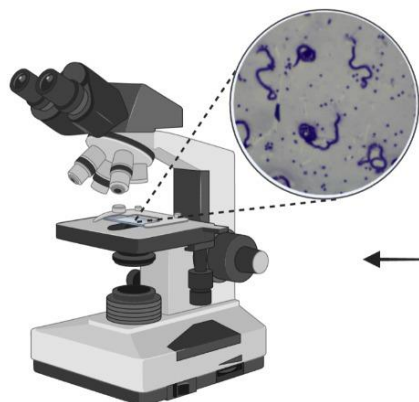
Deje secar el frotis al aire



Coloque la canastilla en el recipiente que contiene colorante de giemsa durante diez minutos.



Lavado con solución amortiguadora por cinco minutos, sio se llega a sobreteñir repita el lavado



Seque y lea al microscopio a seco débil 10X, seco fuerte 40X e inmersión 100X.



PRÁCTICA NÚMERO 4

HEMOPARÁSITOS

10

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los protozoarios hemáticos más comunes en México?
2. ¿En qué casos se debe usar la técnica de gota gruesa?
3. ¿En qué caso se debe usar la técnica de extensión de sangre?
4. ¿En qué hemoparásitos se puede utilizar la técnica de ELISA?
5. ¿Qué otras técnicas inmunológicas se pueden utilizar en el diagnóstico de hemoflagelados parásitos del hombre?

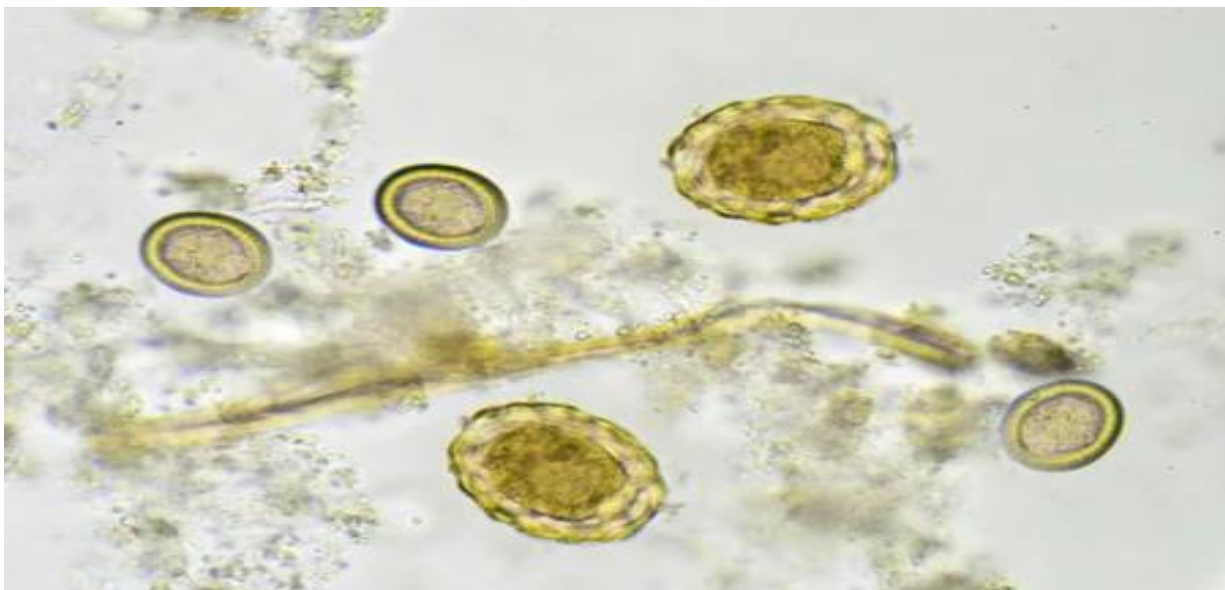
REFERENCIAS

1. Biagi F. Enfermedades parasitarias. 3ª ed. México: Ediciones el Manual Moderno; 2004.
2. Tay ZJ, Velasco CO, Gutiérrez QM. Parasitología médica. 7ª ed. México: Méndez Editores; 2002.
3. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Editorial Panamericana; 2007.
4. Capuccino J, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. 5ª ed. USA: Benjamin/Cummings Pub Co Edition; 1998.
5. Rodríguez E. Manual ilustrado de parasitología médica. México: Editorial Cuellar; 1998.
6. Sitites D. Inmunología básica y clínica. 7ª ed. México: Editorial Manual Moderno; 1993.
7. Rojas O. Espinosa. Inmunología (de memoria). 3ª ed. México: editorial Medica Panamericana; 2006.



**PRÁCTICA
NÚMERO
5**

COPROPARASITOSCÓPICO



UNIDAD 1 PARASITOLOGÍA |

INTRODUCCIÓN

Los exámenes coproparasitológicos (CPS) utilizan la materia fecal para el diagnóstico de parasitosis intestinales, son de los análisis clínicos más antiguos. Está indicado cuando se sospecha de una infección parasitaria y podemos encontrar prácticamente cualquier estadio perteneciente a helmintos y protozoos.

Estos parásitos se pueden encontrar en el tracto entérico del humano, los cuales ocasionarán un parasitismo intestinal de ligero a intenso, de ahí la enorme importancia de poder determinar su presencia. Por lo que esta práctica es fundamental en la formación profesional del futuro Q.F.B.

Las técnicas pueden clasificarse de acuerdo a varios aspectos:

- Al momento de su realización: Inmediato, fresco y mediáticos (no es inmediato y puede o no usar una solución conservadora)
- Según el tipo de procesamiento: Directo (en fresco); De concentración (flotación y sedimentación, tropismo), dilución, cultivo, aclaramiento y tinción.
- Por expresión numérica: cualitativos y cuantitativos
- Por aplicación de colorantes: preparación húmeda o tinción elaborada

- Especiales (otros): Raspado perianal, cápsula duodenal, amiba en fresco

El examen coproparasitológico se realiza de dos formas, una macroscópica y una microscópica.

EXAMEN MACROSCÓPICO

- a) Consistencia.
- b) Composición.
- c) Color.
- d) Presencia de parásitos adultos (helmintos) visibles a simple vista.

EXAMEN MICROSCÓPICO

Se requieren al menos tres muestras consecutivas para realizar el análisis.

a) **Método directo**; es rápido, útil en la determinación de quistes y trofozoítos de protozoarios, huevecillos, proglótides o larvas de helmintos, células de descamación, eritrocitos, bacteria, hongos y cristales. El principal inconveniente es que se llegan a distorsionar las estructuras (trofozoítos principalmente).

- Con solución salina: Trofozoitos de *E. histolytica*, larvas de *S. stercoralis*
- Con Lugol: Para cualquier estadio de parásitos intestinales

b) **Métodos de concentración**; el propósito de los métodos de concentración; es incrementar las posibilidades de observar quistes, huevecillos, quistes y larvas,

principalmente en infecciones ligeras. Existen dos variantes que son:

a) **Las técnicas de flotación:**

Permiten separar los elementos parasitarios de los residuos orgánicos más gruesos, con una solución de peso específico alto, por lo que, las estructuras parasitarias que tienen un menor peso específico ascienden a la parte superior de la solución (las más utilizadas son el sulfato de zinc y el cloruro de sodio). Las técnicas que podemos mencionar son, McMaster, Mini-Flotac

Método de flotación con sulfato de zinc: Es la técnica más usada en los laboratorios de análisis bioquímico clínico.

- Las ventajas: se puede observar bien quistes, huevecillos (incluso de poco peso) y larvas, aclara las estructuras de los quistes, huevecillos y larvas facilitando su observación.
- Las desventajas: que se pueden llegar a distorsionar los parásitos en especial a los quistes, algunas larvas no llegan a flotar, existen riesgos de contaminación y las soluciones de sulfato de zinc deben de ser de producción reciente.
- **Nota:** No es eficiente para huevos infértiles de *A. lumbricoides* o huevos de *F. hepática*

b) **Las de sedimentación:** Ritchie, Baermann (es una técnica eficiente para determinar nematodos de heces y suelo, pero poco utilizada en el laboratorio)

Método de sedimentación con formol- acetato de etilo

Es común en los laboratorios de diagnóstico clínico, facilita la recuperación de casi todas las estructuras parasitarias.

- Las ventajas: rápido desarrollo, amplio espectro (ooquistes, quistes, huevos y larvas), fácil observación morfológica de los parásitos y con bajo riesgo de contaminación, menos errores técnicos. La muestra puede estar fresca o fijada.
- Las desventajas: requiere de un desarrollo cuidadoso por la gran cantidad de pasos que tiene la técnica, el éter es flamable.
- La muestra contiene gran cantidad de residuos en comparación con la técnica de flotación.
- Nota: No se recomienda para huevos de *Fasciola spp.* Ni las larvas de *S. stercoralis*

Recolección de la muestra

Es de suma importancia el realizar una buena recolección de la muestra ya que esta requiere ciertas características para poder llevar a cabo un examen coproparasitológico confiable.

El tipo de muestra recogida dependerá de la especie y forma del parásito sospechado. El conocimiento del ciclo vital del parásito ayuda a determinar el tipo, cantidad y frecuencia de los especímenes necesarios para el diagnóstico.

Para el estudio se requiere recolectar una muestra de materia fecal en un frasco limpio de vidrio con tapa de rosca. No se deben mezclar las heces con orina o con ningún otro líquido como agua de la taza del baño.

El estudio se puede hacer con una sola muestra de materia fecal (examen coproparasitológico simple), este estudio simple es suficiente cuando la evidencia es tal que con una sola muestra se logran identificar gran cantidad de parásitos. Sin embargo, la mayor parte de las veces es mejor solicitar un examen coproparasitológico seriado.

La muestra de materia fecal debe recolectarse de preferencia en la mañana unas horas o minutos antes de llevarla al laboratorio, y de no ser posible, en la noche anterior y refrigerarla en el recipiente en el que se recolecto.

La cantidad de heces no debe de ser mucha, generalmente con una pequeña muestra es suficiente (del tamaño de una nuez). El frasco debe cerrarse herméticamente y no exponerse a calor extremo.



Figura 1.5.1. Muestra para examen coproparasitológico.

Las muestras no deben recogerse durante 1 semana si el paciente ha estado tomando materiales que dejan residuos cristalinos, como compuestos antidiarreicos, antiácidos, bismuto y bario. Además los laxantes a base de aceites, como la parafina, pueden interferir en los exámenes. Los antibióticos y los medios de contraste pueden disminuir la cantidad de organismos, particularmente los protozoos, en las heces durante 2 a 3 semanas.

OBJETIVOS:

1. Realizar un examen macroscópico y microscópico de la materia fecal.
2. Determinar la presencia de parásitos en la materia fecal.

MATERIAL POR EQUIPO:

1. Microscopio.
2. Portaobjetos.
3. Cubreobjetos.
4. Tubos de ensayo de 13X100 propios para la centrífuga.
5. Gasa.
6. Embudo
7. Centrífuga clínica

MUESTRA BIOLÓGICA

- Muestra de materia fecal 5 a 10 g aproximadamente del tamaño de una nuez (fruto de nogal) contenida en un frasco de boca grande. (Mínimo 3 muestras por equipo).
- Si la muestra es líquida recolectar de 5 a 10ml

REACTIVOS POR EQUIPO:

1. Sulfato de zinc al 33%, 500 mL con densidad de 1.180 +/- 0.02, 50 mL
2. Lugol propio para las técnicas de CPS, 50 mL

MÉTODO

TÉCNICAS COPROPARASITOSCÓPICAS.

I. Examen Macroscópico:

Reporte las características que presenta la materia fecal por estudiar.

- Color.
- Consistencia.
- Presencia de sangre y/o moco.
- Detección de parásitos macroscópicos.
- Composición.

II. Examen Microscópico:

a) CPS Directo:

Se utilizan principalmente para detectar trofozoítos y larvas móviles, glóbulos rojos, leucocitos, cristales de Charcot–Leyden (preparación salina) y quistes de protozoos (preparación yodada, Lugol). Cuando se examinan heces diarreicas o líquidas que contienen moco, se deben utilizar en ambas preparaciones.

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de solución salina en el lado izquierdo y una gota de lugol en el lado derecho.
- 2) Colocar aproximadamente 2 mg con ayuda de un aplicador de madera (una para cada solución), elegir en sitios donde se encuentre moco y/o sangre de

preferencia. Precaución para no crear burbujas de aire.

- 3) Observar a 10x y 40x

b) CPS mediante la Técnica de Flotación de Faust

- Agregar alrededor de 3 gramos de heces en 10 ml de formol allá 5-10%, mezclar con ayuda de un aplicador
- Filtre la suspensión con una gasa doble y deposite en un tubo de 13 x 100
- Centrifugar a 1500 g durante 3 minutos y decante
- Resuspender nuevamente el sedimento en solución salina
- Centrifugar a 1500 g durante 3 minutos y decante
- Resuspender el sedimento en solución de Sulfato de Zinc, centrifugar de 800 – 1000g/ 5 minutos
- Sacar el tubo de la centrífuga y agregar Sulfato de Zinc hasta formar un menisco
- Colocar un cubreobjetos en la superficie y esperar 10 minutos.
- En un portaobjetos colocar una gota de lugol y encima colocar el cubreobjetos, observar a 10x y 40x.

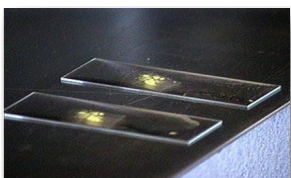
DIAGRAMA DE FLUJO

CPS directo:

Tomar muestra con ayuda de un aplicador de madera.



Colocar muestra en portaobjetos con lugol.



Observar al microscopio con objetivos 10X y 40X.



CPS Técnica de flotación de Faust:

Agregar agua hasta cubrir muestra y homogeneizar.



Filtrar muestra con ayuda de la gasa y el embudo, recolectar filtrado en tubo de ensaye.



Centrifugar y tirar sobrenadante. Repetir lavados de 2-3 veces.



Colocar cubreobjetos sobre tubo, retirar después del tiempo indicado y colocar en portaobjetos con lugol.

Adicionar sulfato de zinc hasta $\frac{3}{4}$ partes centrifugar y llenar tubo con sulfato de zinc hasta formar menisco.

Observar con ayuda del microscopio con los objetivos 10x y 40X



CUESTIONARIO

1. ¿Qué parásitos son los más fácilmente detectados por el CPS directo y el de flotación?
2. ¿Qué parásitos son difíciles de detectar por el CPS directo y el de flotación?
3. ¿Por qué se pide que sean cuando menos tres muestras subsecuentes para realizar un CPS?
4. ¿Qué técnica es la idónea para buscar *Enterobius vermicularis*?
5. ¿Para qué sirve la técnica de ameba en fresco y en qué casos se debe utilizar?
6. ¿Cuál es la proporción en que se pone la muestra con el conservador?
7. ¿Cuál es la forma de reportar el resultado en los exámenes coproparasitoscópicos?
8. ¿En qué forma se recomienda hacer la lectura al microscopio para búsqueda de los diferentes estadios parasitarias?
9. ¿Cuál es la utilidad de un micrómetro?
10. ¿Qué conservadores se recomienda utilizar?

REFERENCIAS

1. Fleck SL. Diagnostic techniques in medical parasitology. UK: Editorial Wright; 1989.
2. Biagi F. enfermedades parasitarias. 3ª ed. México: Ediciones el Manual Moderno; 2004.
3. Tay ZJ, Velasco CO, Gutiérrez QM. Parasitología médica. 7ª ed. México: Méndez editores; 2002.
4. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Editorial Panamericana; 2007.
5. Capuccino J, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual. 5ª ed. USA: Benjamin/Cummings Pub Co Edition; 1998.
6. Rodríguez E. Manual ilustrado de parasitología médica. México: Editorial Cuellar; 1998.
7. Stites D. Inmunología básica y clínica. 7ª ed. México: Editorial Manual Moderno; 1993.

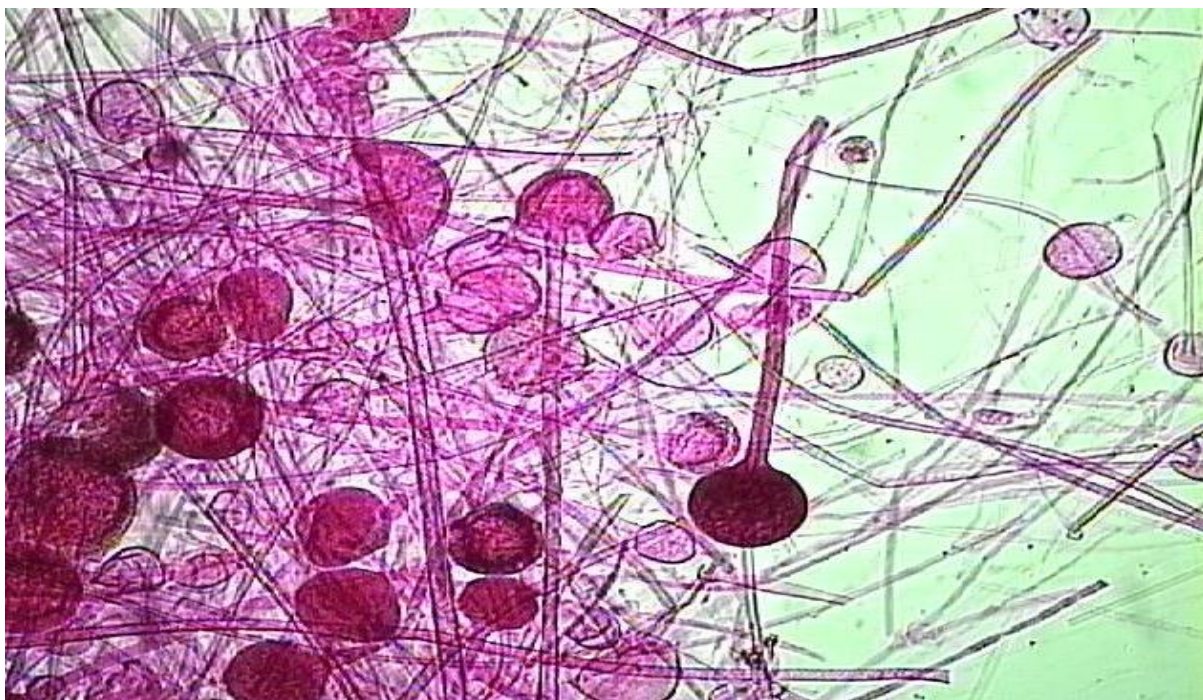
ANEXO DE LA PRÁCTICA:

Si para el análisis de las muestras se excede de los límites establecidos, se deben utilizar conservadores, como los que a continuación se desglosan:

1. Uno de los conservadores más empleados es el PVA (alcohol polivinílico), el cual es una combinación de fijador y resina soluble. Es usada particularmente para especímenes líquidos y debe ser usado en relación de tres partes de PVA y una parte del espécimen fecal homogeneizado y almacenado a temperatura ambiente en frascos cerrados. Es un reactivo estable, se debe almacenar en frascos herméticos, en frascos pequeños se llega a endurecer o a gelificarse.
2. La Formalina al 10%, es otro conservador que se emplea para conservar por períodos largos de tiempo, quistes de protozoarios, huevos y larvas de helmintos. Para los huevos de helmintos es preferible calentar la formalina a 60° C para prevenir el desarrollo al estado infectivo. Se usa en proporción de tres partes de formalina y una parte de heces mezclado vigorosamente para que quede bien homogéneo.
3. El Merthiolate-Yodo-Formalina es un conservador que se usa con todo tipo de heces y aspirados. Preserva trofozoítos y quistes de protozoarios, huevos y larvas de helmintos, además de fijarlos y teñirlos. La

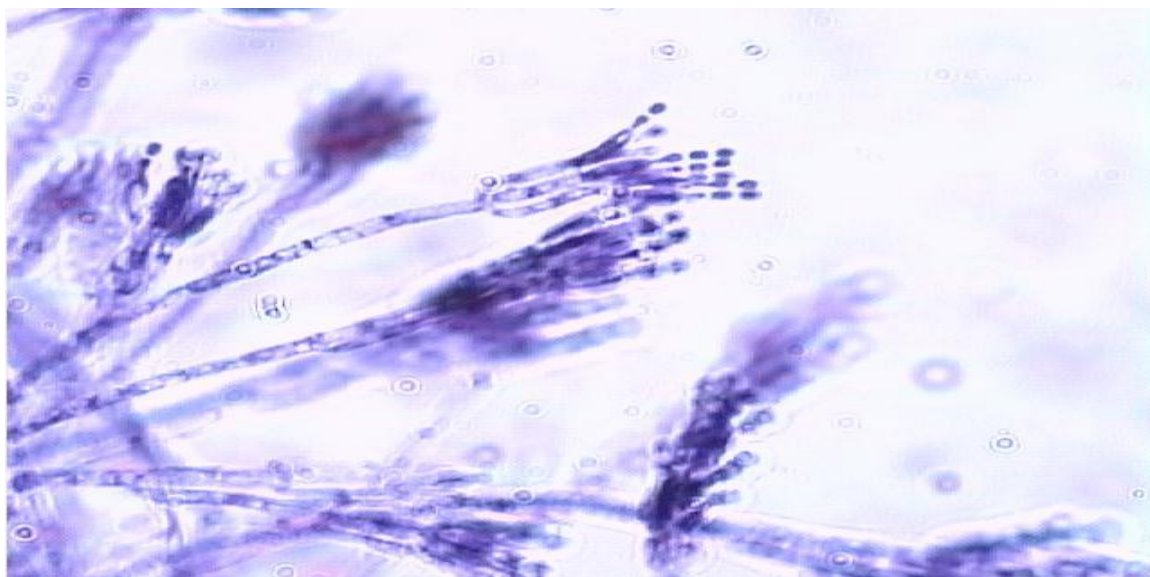
muestra se toma de la parte más consistente o sólida.

4. El PAF (Fenol-Alcohol-Formol), este conservador se puede utilizar en lugar de formalina. Conserva adecuadamente trofozoitos y quistes de protozoarios, huevos y larvas de helmintos. Se usa en una proporción de 1:5 y se homogeneiza.



**PRÁCTICA
NÚMERO
1**

OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS



UNIDAD 2. Micología|

PRÁCTICA NÚMERO 1 | 2

OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS

INTRODUCCIÓN

La micología es la ciencia, que tiene como objeto de estudio a los hongos, ya sean macroscópicos o microscópicos, así como las asociaciones, daños y beneficios que puedan causar.

Desde el punto de vista médico, los hongos macroscópicos, también llamados setas, se conocen en casos de intoxicación alimentaria (micetismo), a diferencia de los hongos microscópicos que generan variados cuadros patológicos (micosis). Estos son organismos muy abundantes en la naturaleza, constituyendo uno de los reinos de los seres vivos, el reino Fungi. Se calculan más de 70 000 especies, pero se cree que hay más de un millón y medio; viven en los medios más variados y sólo alrededor de 100 son necesariamente patógenos para mamíferos, pero también hay patógenos de vegetales, insectos o de otros hongos, y algunos son hongos oportunistas.

Los hongos pertenecen al reino *Fungi*, que constituyen un numeroso grupo de seres vivos de gran diversidad morfológica.

Las principales características de los hongos son:

- Organismos eucariotas

- Aerobios y anaerobios en algunos casos.
- Metabolismo heterotrófico.
- No poseen clorofila.
- Nutrición osmótrofa (por absorción).
- Temperatura: para la mayoría de hongos la temperatura óptima es de 22-30° C, y para patógenos de 30 a 37° C.
- Requerimientos de humedad elevada.
- pH óptimo de 5 a 6.
- Luz no necesaria, salvo en algunos casos.
- Tolerancia a la concentración de solutos variable.
- Pueden ser unicelulares o pluricelulares.
- Reproducción sexual y asexual.
- La unidad fundamental anatómica y de crecimiento es la hifa.

Los organismos del reino Fungi se dividen, según su forma de reproducción sexual en cuatro phyla:

- *Zygomycota*
- *Ascomycota*
- *Basidiomycota*
- *Chytridiomycota*

Se denominan hongos mitospóricos a los hongos sin reproducción sexual conocida y meiospóricos a los hongos con reproducción sexual conocida.



PRÁCTICA NÚMERO 1

OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS

Phylum Zygomycota

Se caracteriza por presentar hifas gruesas y cenocíticas (no presentan segmentaciones o tabicaciones), y reproducción sexuada por cigosporas. Entre los *Zygomycetes* quizá los más conocidos sean algunos representantes del orden Mucorales como *Mucor sp.* o *Rhizopus sp.* pero en realidad el grupo tiene integrantes que representan líneas evolutivas muy dispares.

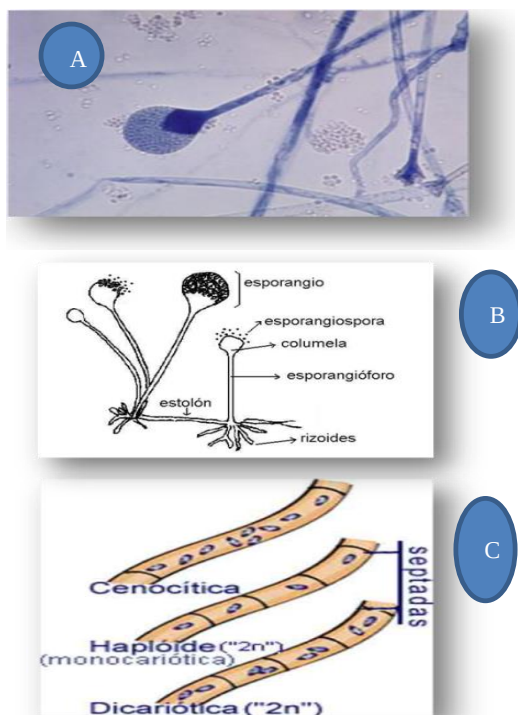


Figura 2.1.1. a) Imagen microscópica de *Mucor sp.* b) Esquema general de género *Mucor*. c) Tipos de hifas.

Phylum Ascomycota

Presentan hifas tabicadas y reproducción asexual mediante esporas externas o conidios, aislados, en cadenas o dispuestas en conidióforos. También presentan reproducción sexuada esta se da por medio de ascas.

Los representantes de este grupo prácticamente se encuentran poblando todo tipo de hábitat uno de los más representativos es el hongo del género *Alternaria sp.*

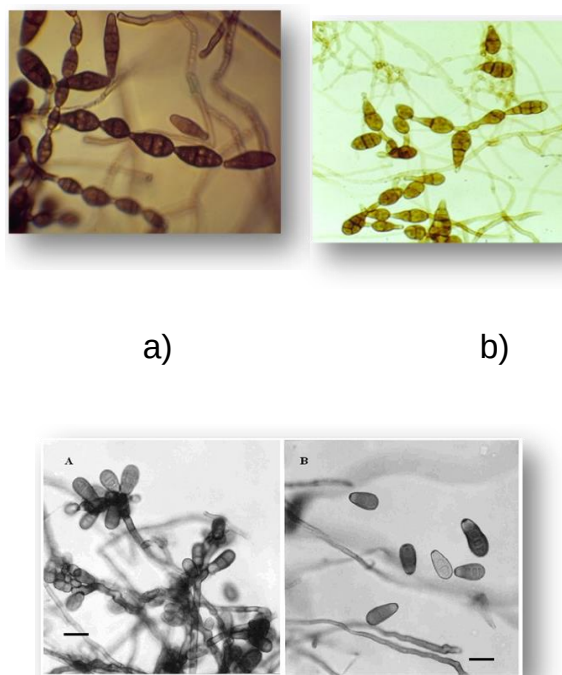


Figura 2.1.2. a) Conidióforos, b) Conidios. (*Marielliotia biseptata*)

PRÁCTICA NÚMERO 1

OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS

Phylum Basidiomycota

Está constituido por los macrohongos perfectos que incluyen setas, tienen hifas septadas o tabicadas. Su reproducción es de tipo sexual por medio de basidiosporas formadas sobre basidios y reproducción asexual ya que presentan crecimiento vegetativo, rara vez forman esporas, ejemplo en la figura 2.1.4.

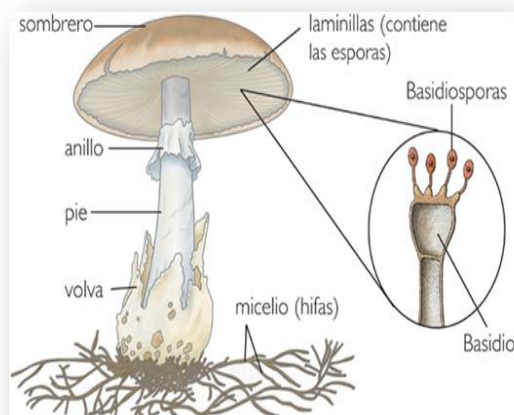


Figura 2.1.4. Estructura general del phylum basidiomycota.

Los ejemplos más representativos de este *phylum* son las comúnmente conocidas setas, figura 2.1.5.



Figura 2.1.5. *Amanita sp.*

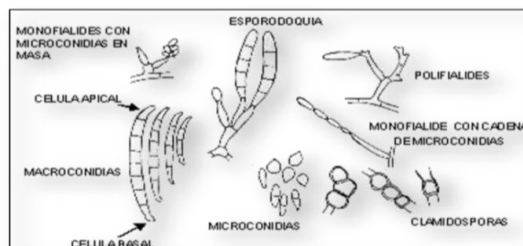
En los hongos mitospóricos que sólo se observa reproducción asexual se observa la estructura conidiógena se denomina de acuerdo a su origen como:

- Taloconidios
- Blastoconidios
- Esporangiosporas

Las conidias son esporas de forma variable; de forma esférica, oval, piriforme, fusiforme, filiforme, etc. Dependiendo del tamaño se le puede designar como macroconidias o microconidias.

En algunos hongos las conidioesporas se pueden formar aisladas o en cadena, otras en estructuras especializadas denominadas conidióforos, estos pueden ser simples o complicados. figura

Estructuras de hongos



PRÁCTICA NÚMERO 1

OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS

5

OBJETIVOS:

1. Reconocer y describir las principales estructuras de hongos filamentosos.
2. Adquirir la capacidad de diferenciar los tipos de esporas sexuales y asexuales.
3. Adquirir experiencia para ser capaz de diferenciar a los hongos de otros tipos de microorganismos.

MATERIAL POR EQUIPO

- Microscopio.
- Papel seda
- Portaobjetos
- Cinta adhesiva transparente
- Azul de algodón lactofenol

MATERIAL BIOLÓGICO

- Fruta y vegetales contaminados con hongos



PRÁCTICA NÚMERO 1

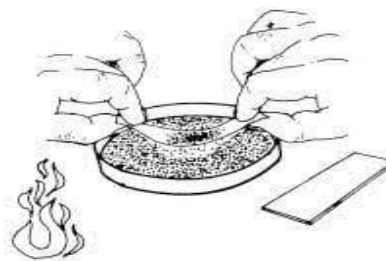
OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS

6

MÉTODO



Localizar en las frutas y verduras al hongo contaminante



Colocar sobre el hongo una tira de cinta adhesiva y hacer un poco de presión



Colocar la cinta con la muestra adherida en un portaobjetos que tenga previamente una gota de azul de algodón lactofenol



Observar al microscopio en 10X y 40x. Reportar las observaciones.



PRÁCTICA NÚMERO 1 | 7

OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS DE HONGOS

CUESTIONARIO

1. ¿A qué se le llaman hongos mitospóricos, meiospóricos?
2. Nombre tres hongos de importancia para la industria farmacéutica.
3. Nombre tres hongos de importancia médica.
4. Esquematice todos los tipos hifas por su grosor, presencia o ausencia de septos, por su función y forma
5. Esquematice los diferentes tipos de conidios

BIBLIOGRAFÍA

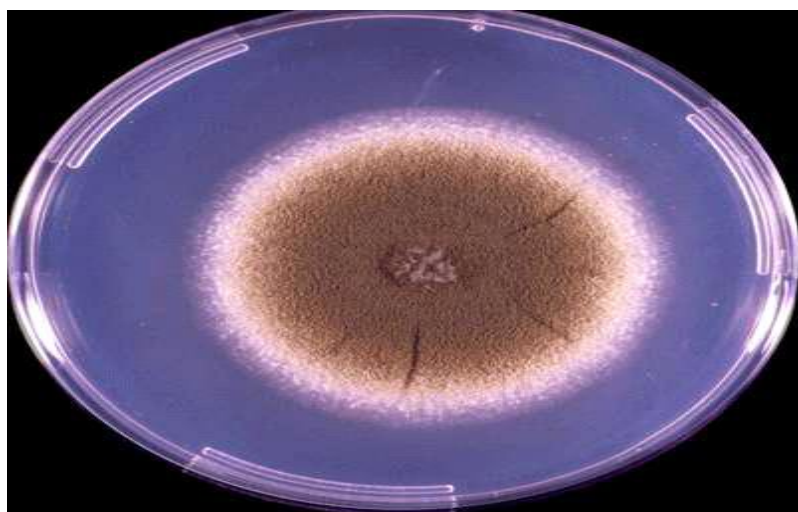
1. Gamazo C, López-Goñi I. Díaz R. Manual práctico de microbiología. 3ª ed. Barcelona (España): Editorial Masson. 2005.
2. Arenas R. Micología médica ilustrada. 3ª ed. México: editorial Mc Graw Hill; p 11
3. Herrera T, Ulloa M. El reino de los hongos. 2ª ed. México: Editorial Fondo de cultura Económica. 2003: pp 25,38-38, 381-385
4. López R., Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico en el laboratorio. 3ª. ed. Editorial Trillas.2012. pp 14-17
5. Microbiology, virology, immunology, bacteriology, parasitology, mycology Online
2001 The Board of Trustees of the University of South Carolina [internet] Disponible en:
http://www.facmed.unam.mx/bmnd/di_rijo_gbc.php?bib_vv=12.





**PRÁCTICA
NÚMERO
2**

**AISLAMIENTO DE HONGOS DE
 DIFERENTES FUENTES**



UNIDAD 2 Micología |

INTRODUCCIÓN

Los hongos tienen gran importancia económica, no tan sólo por su utilidad, sino también por el daño que pueden causar. Los hongos son responsables de la degradación de gran parte de la materia orgánica de la Tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite el reciclaje de la materia viva. Por otro lado, los hongos causan gran cantidad de enfermedades en plantas y animales, pueden destruir alimentos y materiales de los que depende el hombre. A los hongos se les considera los contaminantes más importantes del mundo, en gran medida a la facilidad con que se pueden distribuir, gracias a que pequeños fragmentos ya sea de micelios, hifas o esporas pueden ser diseminados por el aire, agua, alimentos, ropa, etc.

Los efectos perjudiciales de los hongos están contrarrestados por su utilización industrial. Los hongos son la base de muchas fermentaciones como se muestra en la figura 2.2.1. Los hongos son también la fuente de muchos enzimas comerciales (amilasas, proteasas, pectinasas), ácidos orgánicos (cítrico, láctico), antibióticos (penicilina).

Los hongos en su mayoría se les consideran saprofitos, ya que se alimentan de materia orgánica en descomposición y carecen de clorofila,

unos pocos son parásitos para los seres vivos (en el humano se considera que aproximadamente de 70 a 100 especies de hongos son patógenos).

Figura 2.2.1. Productos comerciales obtenidos a partir de hongos.



Los hongos requieren de ciertos factores para la regulación de su crecimiento y desarrollo, tal vez uno de los más importantes es la humedad del medio ambiente en general; sin esta nunca habrá hongos. La temperatura necesaria para los hongos oscila en un rango de entre los 4° a los 60° C. El pH aunque variado en muchas especies, por lo general debe mantenerse entre los 4-6. Necesitan tener oxígeno, y en este punto también debe mencionarse la relación existente entre el O₂ y el CO₂; si existe una abundancia de CO₂; no habrá crecimiento del cuerpo fructífero. La luz es medianamente necesaria, para algunos hongos es totalmente innecesaria, aunque algunos son fototrópicos (usan la luz para iniciar o limitar el proceso de esporulación).

La gran mayoría de los hongos presentan dimorfismo (un mismo hongo

en diferentes condiciones de desarrollo presenta diferente tamaño), polimorfismo (un mismo hongo en diferentes condiciones de desarrollo presenta diferente color) y pleomorfismo (un mismo hongo en diferentes condiciones de desarrollo presenta diferente forma) como se puede ver en la figura 2.2.2. Por lo anterior en micología general, industrial y médica, la tipificación de los hongos contaminantes y parásitos se dificulta.

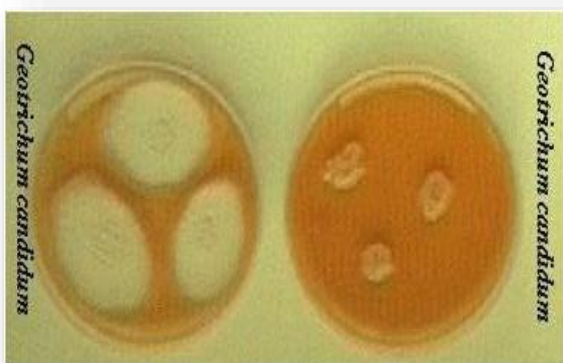


Figura 2.2.2. Colonias de *Geotrichum candidum* con diferentes características morfológicas.

OBJETIVOS:

1. Demostrar la presencia y distribución de los hongos que se encuentran en el medio ambiente.
2. Analizar la morfología macroscópica de los hongos que se han obtenido de diversas fuentes.
3. Realizar la identificación y clasificación de los hongos aislados de los diferentes especímenes trabajados.

MATERIAL POR EQUIPO:

- ✓ Microscopio
- ✓ Cuatro cajas de Petri que contiene agar Sabouraud glucosado.
- ✓ Dos cajas con agar Littman.
- ✓ Seis tubos, 15X100 con 4.5 mL de solución salina estéril.
- ✓ Asa y porta asa.
- ✓ Cuatro pipetas de 1 mL
- ✓ Cuatro cajas de Petri estériles.
- ✓ Muestras de frutas, verduras y tierra seca contaminadas de hongos.

MATERIAL POR GRUPO, CON 10 EQUIPOS EN PROMEDIO:

- ✓ 40 mL de agar Littman.
- ✓ 40 mL de agar Sabouraud.

REACTIVOS:

- ✓ KOH al 10%.
- ✓ Azul de algodón de lactofenol.
- ✓ Lugol.

MÉTODO

I. Aislamiento de Hongos del Aire.

1. Destape la caja de Petri que contiene agar Sabouraud y expóngala a las corrientes de aire, por un lapso de 15 minutos, de igual manera hágalo con la caja del agar Littman. Esto puede llevarse a cabo en algún sitio del hogar de algún integrante del equipo, el cual debe tener cuidado de vigilar el crecimiento de las colonias de hongos
4. hasta alcanzar 10^{-5} y 10^{-6} .
5. Proceda a preparar los medios Sabouraud y Littman, cuando estén fundidos y a temperatura de aproximadamente $45-50^{\circ}\text{C}$ podrá hacer el vaciado en placa.
6. De las diluciones realizadas en el paso 3 tomar un mililitro de la dilución 10^{-5} y vierta en dos cajas Petri estériles diferentes, repita el este proceso con la muestra diluida hasta 10^{-6} .
7. Vierta agar Sabouraud en dos de las cajas del paso 4, en una con muestra diluida 10^{-5} y otra con muestra diluida hasta 10^{-6} . Repita este pasó vertiendo agar Littman.

que lleguen a crecer en los medios mencionados anteriormente.

2. Incube la placa expuesta al aire a temperatura ambiente en un lugar húmedo y libre de cualquier tipo de contaminación.
3. Registre las características macroscópicas, de lo que se desarrolló en los medios de cultivo.

II. Aislamiento de Hongos del Suelo.

1. Cerna la muestra de tierra solicitada, seleccionando la que este seca o ligeramente húmeda.
2. Pese 0.5 g de tierra y agregue a un tubo que contiene 4.5 mL de solución salina estéril, para tener una dilución 1:10.
3. Proceda a realizar las diluciones
8. Incube todas las placas sembradas a temperatura ambiente y en un lugar húmedo.
9. Realice la lectura y reporte las características macroscópicas, de los hongos desarrollados en las cajas de Petri.

III. Aislamiento de Hongos de Verduras y Frutas.

1. Corte una pequeña porción del tejido de la fruta o verdura donde se encuentra el hongo, ayudándose con asas micológicas.
2. Siembre en una caja de Petri que contiene agar Sabouraud, repita la operación para la caja con el agar Littman. La siembra se realiza de

forma superficial del hongo en el centro de la caja de Petri y asegurándose de fijarlo tratarse de varias muestras divida las cajas y siembre en el centro de cada división.

3. Realice la lectura y reporte las características macroscópicas, de lo que se desarrolló en la caja de Petri.

correctamente, ejerciendo cierta presión en el agar. En caso de

IV. Resultados.

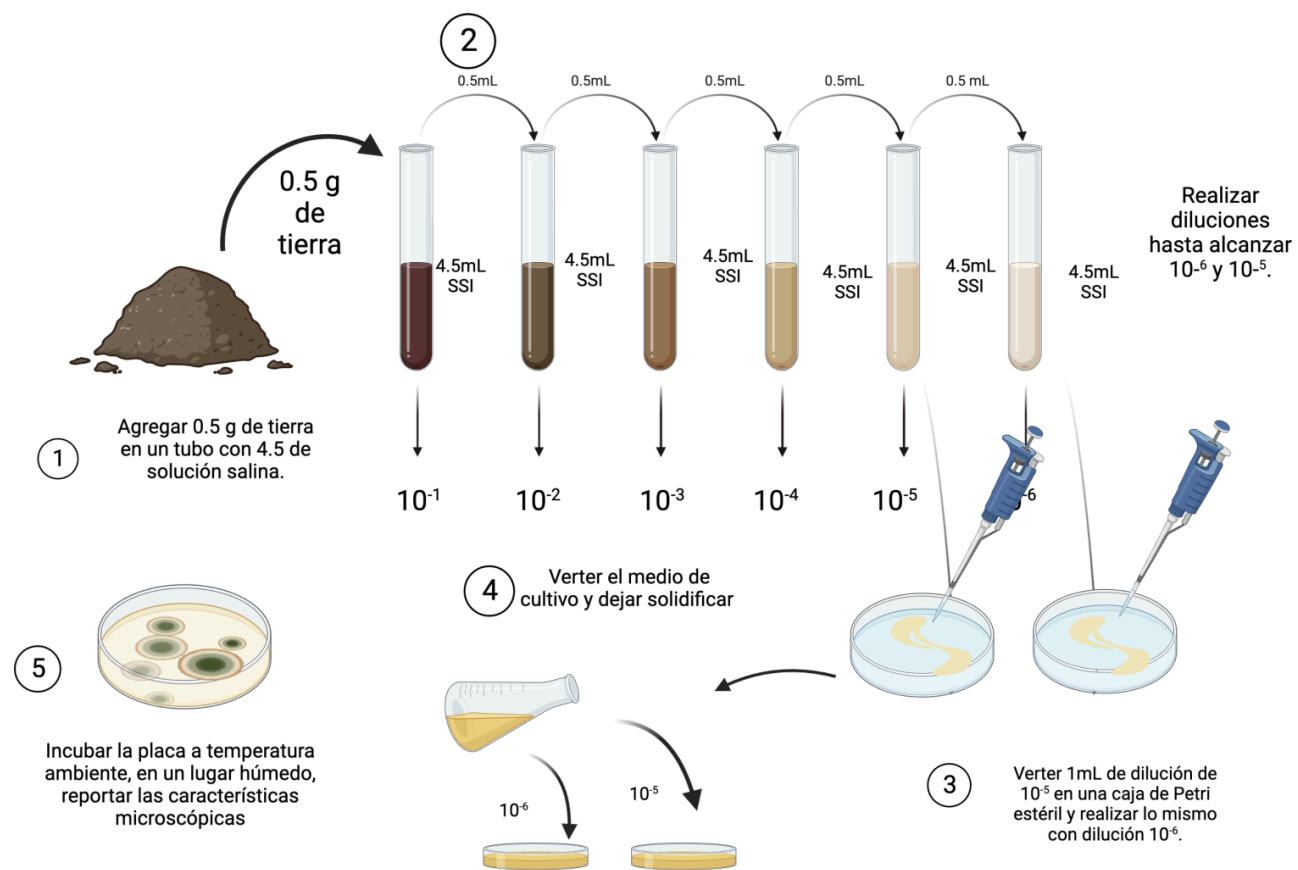
De los especímenes trabajados en la práctica, el alumno reportará lo siguiente:

1. Lugar de donde se obtuvo.
2. Fuente de aislamiento.
3. Fecha de aislamiento.
4. Características macroscópicas de las colonias como:

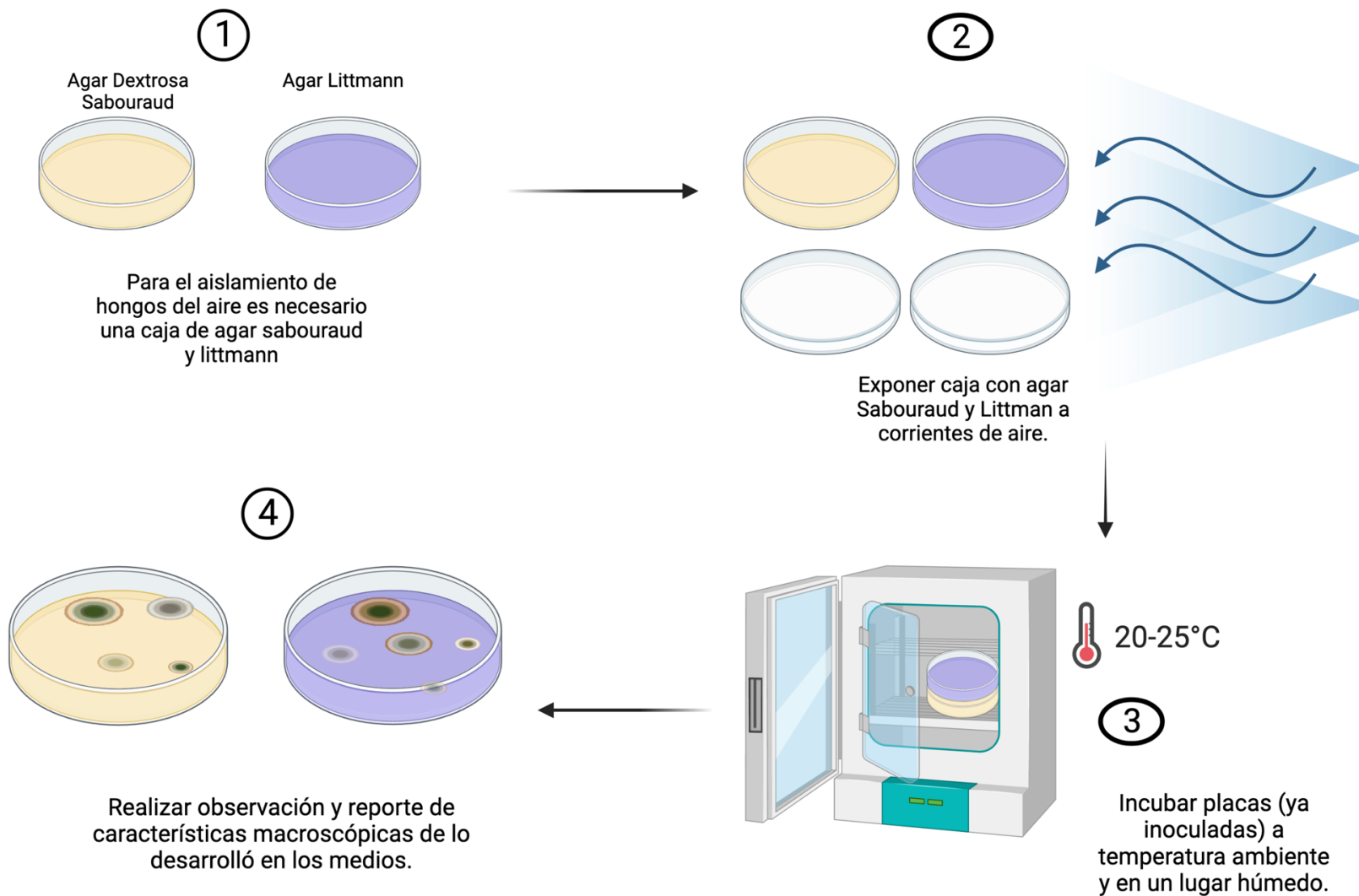
- a) Pigmentación de la colonia, del frente y del envés, del centro y la periferia, las diferentes zonas aéreas y en distintos períodos de incubación.
- b) Aspecto: algodonosa, polvosa, filamentosa, compacta, cremosa, reseca, etc.
- c) Tipo de crecimiento: radial, lento, rápido, etc.

DIAGRAMA DE FLUJO

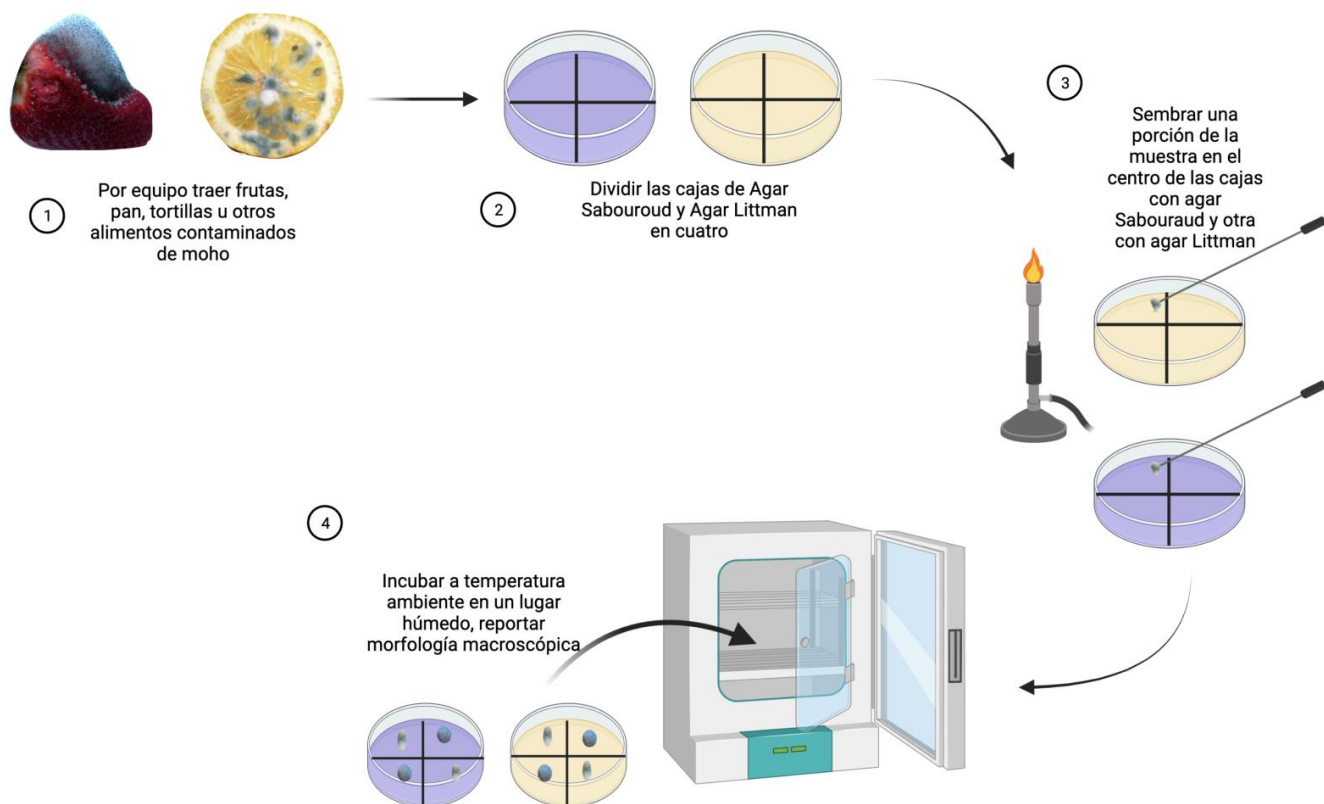
I. Aislamiento de hongos de la tierra



II. Aislamiento de hongos del aire



III. Aislamiento de hongos de frutas y verduras

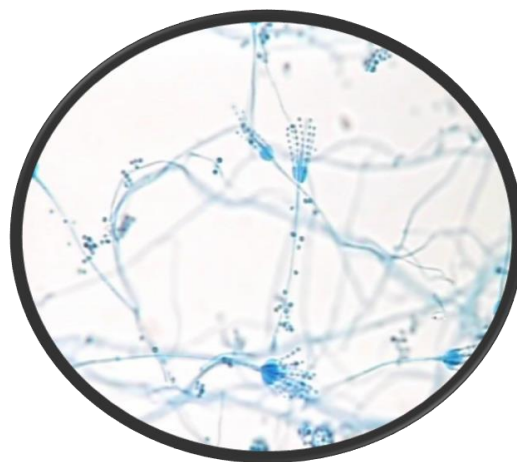
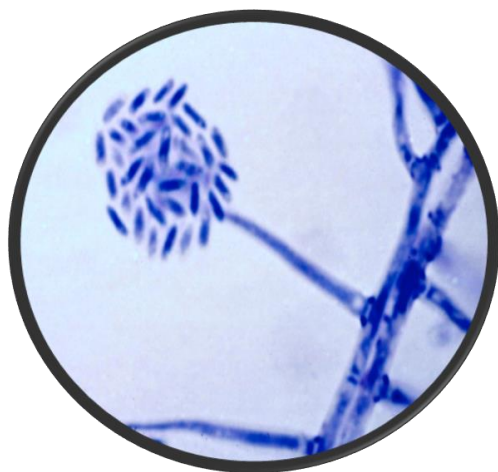


CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los factores que afectan el crecimiento de los hongos en libro encuadernados, frutas cítricas, compotas, gelatinas etc.?
2. ¿Qué clase de productos útiles proceden de los hongos?
3. ¿Cómo afectan la temperatura, pH, presión osmótica y humedad en el desarrollo de un hongo?
4. ¿Para qué se realizan las diluciones en el aislamiento de los hongos del suelo?
5. Nombre cinco medios de cultivo para hongos y su composición química.
6. Nombre cinco géneros de hongos que se presentan en suelo.
7. De existir métodos para cuantificar los hongos contaminantes en suelo, aire, alimento e industria farmacéutica. Nómbralos.
8. ¿Qué es una aflatoxina?
9. Nombre tres hongos superiores venenosos.

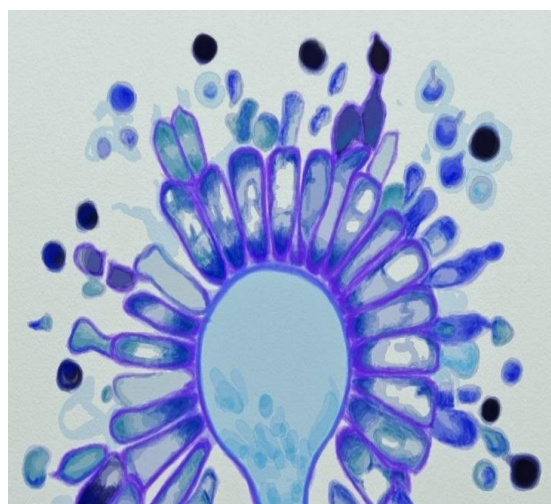
REFERENCIAS

1. Gamazo C. López-Goñi I. Díaz R. Manual práctico de microbiología. 3ª ed. Barcelona (España): Editorial Masson; 2005.
2. Herrera T Ulloa M. El reino de los hongos. México: Editorial Fondo de cultura económica y UNAM; 1990.
3. Koneman R. Micología: prácticas de laboratorio. Argentina: editorial Panamericana; 1993.
4. Rippon J. Tratado de micología médica. México: Editorial Interamericana; 1990.



PRÁCTICA NÚMERO 3

CARACTERÍSTICAS TINTORIALES DE LOS HONGOS



INTRODUCCIÓN

Los hongos microscópicos son unicelulares (levaduras) o multicelulares (filamentosos).

En los hongos filamentosos la unidad anatómica fundamental es la hifa.

Las características básicas para identificación de los hongos filamentosos es la pigmentación de los mismos; ya sea que las hifas sean hialinas (sin pigmento) o pigmentadas (hongos dematiáceos). La forma de las hifas, si son septadas o cenocíticas. Así como la observación de las estructuras de reproducción ya sea sexual (esporas) o asexual (conidios).



Figura 2.3.1. *Microsporum canis*, morfología microscópica. Hifas hialinas, septadas y ramificadas. Fragmaconidios (macroconidios con divisiones transversales) en forma de huso.

En micología las técnicas de tinción empleadas pueden ser simples, compuestas o especiales para el estudio histopatológico.

La técnica de tinción depende del producto que se va a procesar y de la finalidad que se persiga al realizar el procedimiento.

Las técnicas de tinción de hongos son:

1. TÉCNICAS DE TINCIÓN SIMPLE:

Las cuales se caracterizan por el empleo de un sólo colorante como pueden ser: azul de metileno, Lugol, safranina, verde de malaquita, etc.

Tinción con azul de algodón lactofenol

Se utiliza para examen directo de cultivo, ya que es una técnica rápida que tiñe la pared, lo que permite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas



Figura. 2.3.2. *Aspergillus versicolor*, esporas exógenas (Conidia). Tinción de azul algodón lactofenol.

Tinción con safranina:

Los elementos fúngicos se tiñen de color rojo intenso, y el resto del campo toma un tono incoloro o rosa pálido.

Útil para el estudio de cultivos y productos biológicos líquidos.

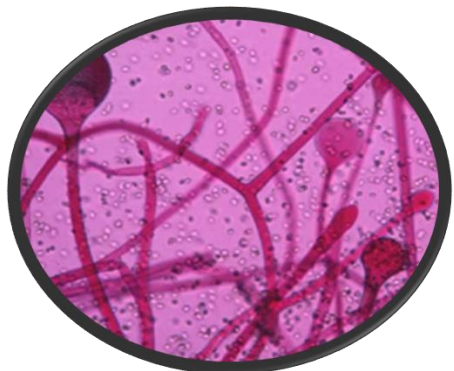


Fig. 2.3.3. *Absidia corymbifera*, tinción con safranina.

2. TÉCNICAS DE TINCIÓN DIFERENCIALES:

Son técnicas que utilizan un colorante primario y un colorante de contraste, ejemplos de este tipo de tinciones son: tinción de Gram y tinción de Ziehl-Neelsen.

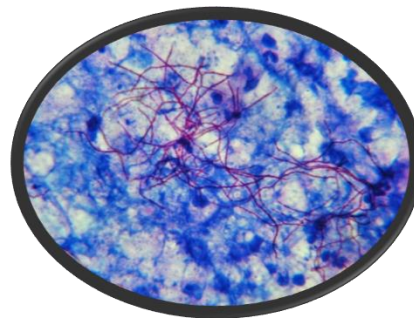


Figura 2.3.4. *Nocardia sp*, tinción de Ziehl Neelsen.

3. TÉCNICAS DE TINCIONES ESPECIALES:

Hidróxido de potasio-tinta azul Parker. Es útil para teñir productos biológicos con escamas de pacientes con pitiriasis versicolor.

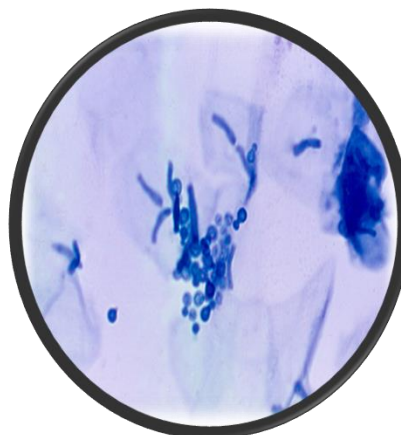


Figura 2.3.5. *Pitiriasis versicolor*, tinción con tinta Parker.

OBJETIVOS

1. Practicar la técnica de montaje con cinta adhesiva, observar, identificar, diferenciar y clasificar los hongos aislados en la práctica número 2.
2. Comparar la afinidad que tienen los colorantes utilizados con las estructuras fúngicas.
3. Conocer las principales técnicas de tinción de hongos y su aplicación en el área industrial y médica

MATERIAL POR EQUIPO

- ✓ Un microscopio.
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Cubreobjetos.
- ✓ Cinta adhesiva transparente

MUESTRAS BIOLÓGICAS:

- ☐ Muestras de hongos aislados en la práctica anterior.

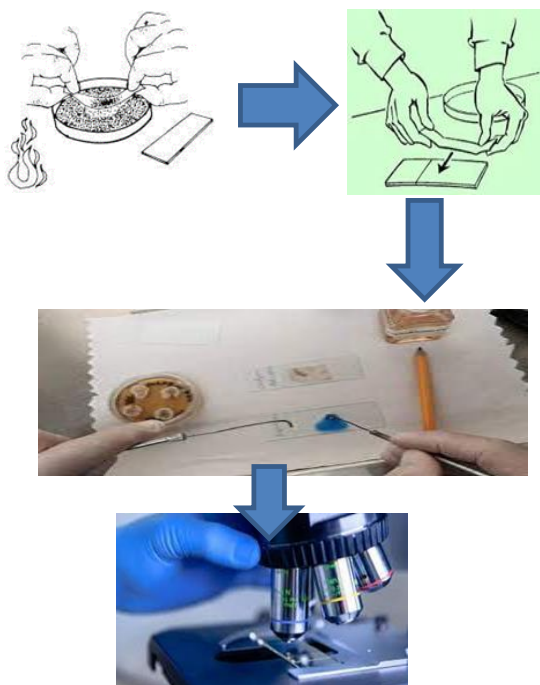
REACTIVOS:

- ✓ KOH al 10%, 50 ml
- ✓ Lugol, 50 ml
- ✓ Azul de algodón de lactofenol, 50 ml
- ✓ Azul de metileno, 50 ml
- ✓ Verde de malaquita
- ✓ Safranina, 50 ml

METODOLOGÍA

NOTA: Sólo se trabajarán tinciones simples.

1. Tome la muestra de las colonias aisladas en la práctica 2, que presente abundante crecimiento.
2. Realice la técnica de cinta adhesiva (impronta) que utilizó en la práctica 1.
3. Observe al microscopio en 10X y 40X y esquematice sus observaciones



CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es el fundamento y en qué casos se utiliza la técnica de Gram, Ziehl-Neelsen y la técnica de Schiff?
2. ¿Qué técnica de tinción se usa en hongos demateáceos?
3. ¿Qué técnicas de tinción son más utilizadas en el área de Bioquímica clínica para el diagnóstico de hongos, patógenos tanto miceliales como levaduriformes?
4. ¿Qué técnicas de tinción son más utilizadas en el área Farmacéutica para la determinación de hongos de importancia industrial o de contaminación en plantas farmacéuticas?

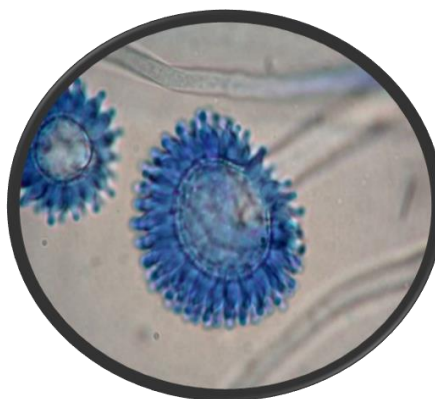
REFERENCIAS

1. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de microbiología. 3ª ed. Barcelona (España): Editorial Masson; 2005.
2. Koneman R. Micología: prácticas de laboratorio. Argentina: editorial Panamericana; 1993.
3. López R., Mendez L., Hernández F. Micología médica, procedimientos para el diagnóstico. México: EditorialTrillas; 2012.

Anexo de la práctica



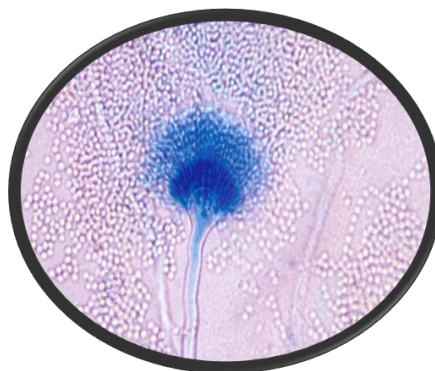
Acremonium strictum, en tinción de Wright.



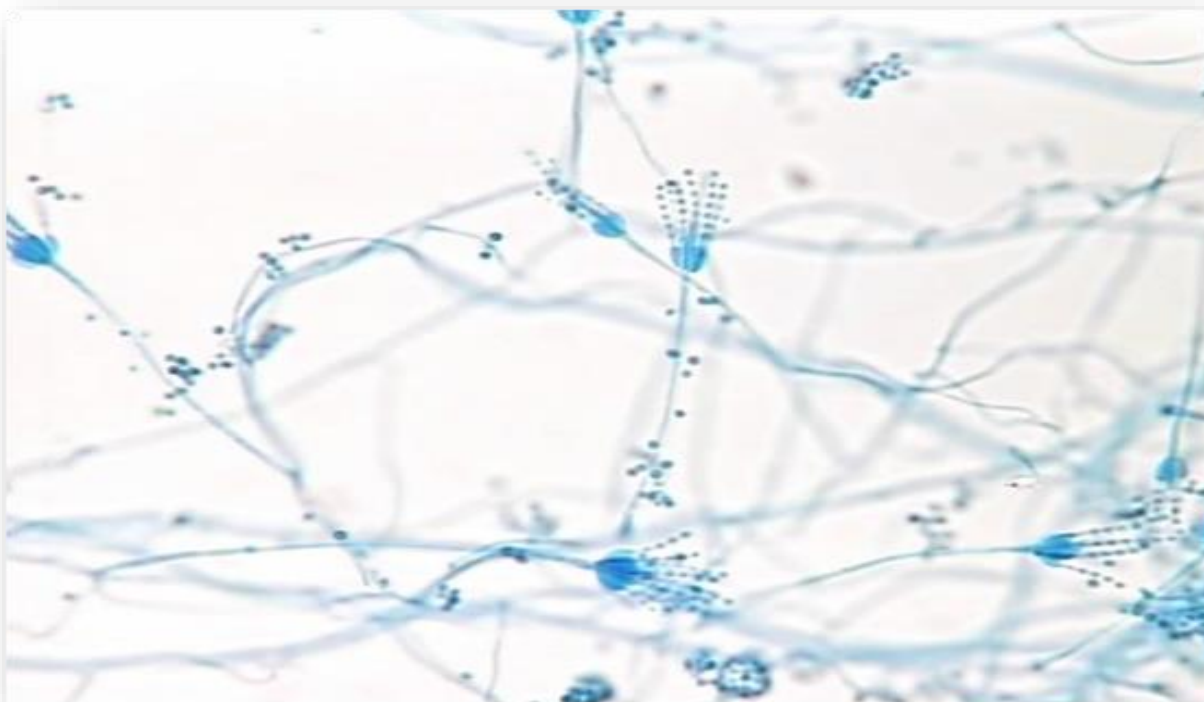
Aspergillus flavus, en tinción con azul algodón acético.



Aspergillus candidus, en tinción de eritrosina.

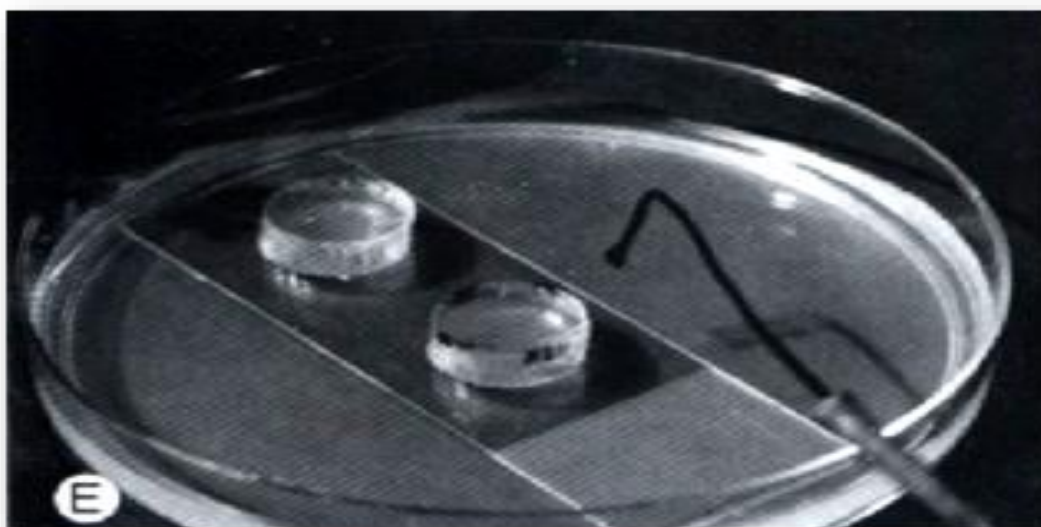


Aspergillus terreus, con técnicas para preparaciones con azul algodón-lactofenol a partir de colonias de hongos.



PRÁCTICA
NÚMERO
4

MICROCULTIVO



UNIDAD 2. Micología |

INTRODUCCIÓN

Comúnmente es posible determinar si una colonia que crece *in vitro* es un moho (hongo filamentoso), por medio de un examen directo, pero no es tan evidente si la colonia tiene apariencia levaduriforme, o debido a micelios muy finos y sedosos, donde la colonia presenta una apariencia tersa y sedosa como se observa en la figura 2.4.1.

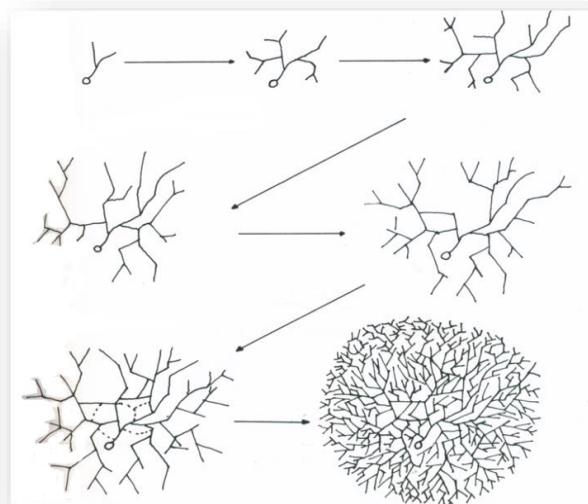
Existen diversas técnicas, para el examen microscópico de los hongos filamentosos, que son útiles para la identificación del género y especie del hongo.

- Montaje húmedo, técnica fácil de realizar, rápida y económica, pero debido a la forma tan directa de tomar la muestra, esta sufre algún traumatismo, en las estructuras microscópicas, lo que dificulta el hecho de identificarlo correctamente.
- Técnica de cinta adhesiva, la cual es barata, rápida y fácil de realizar, sin embargo, si la toma de la muestra no se hace correctamente la observación será mala.
- La técnica idónea para identificar y clasificar un hongo filamentoso es el "Microcultivo ". Esta técnica es más difícil de realizar, más cara, no es idónea para un diagnóstico rápido; por otro lado, esta técnica es inmejorable para observar las estructuras microscópicas de los

hongos filamentosos en forma casi intacta.

Una precaución que se debe de tomar para no realizar el microcultivo es; cultivos en donde el desarrollo es lento, ya que nos hace sospechar en patógenos como *H. capsulatum*, *C. immitis* o *S. schenckii*. Debido al riesgo que implica destapar la caja de Petri y contaminarse por la inhalación o contacto de las esporas.

Figura 2.4.1. Formación de una colonia de hongo filamentoso.



OBJETIVOS:

1. Ser capaz de realizar la técnica de microcultivo
2. Entender la eficacia de un microcultivo para identificar y clasificar un hongo filamentoso.

MATERIAL POR EQUIPO:

- ✓ Una caja de portaobjetos y una de cubreobjetos.
- ✓ Un microscopio.
- ✓ Cinco cajas de Petri con el equipo de microcultivo portaobjeto, cubreobjetos y un triángulo de varilla de vidrio todo dentro de la caja de Petri en condiciones de esterilidad.
- ✓ Pipeta de 5mL estéril.
- ✓ Dos pinzas de disección.
- ✓ Una espátula.
- ✓ Dos placas de agar PDA o Sabouraud.
- ✓ Un asa y porta asa.
- ✓ Glicerol al 10% estéril, 150 mL
- ✓ Formaldehído al 10%, 150 mL
- ✓ Fenol al 10%, 250 mL
- ✓ Azul de algodón de lactofenol, 50 mL
- ✓ Un esmalte transparente de uñas o barniz sellador.
- ✓ Un mechero.



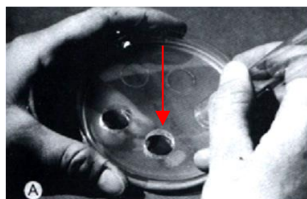
MÉTODO

1. El trabajo se realiza en condiciones asépticas usando dos mecheros. Deberá tener un crecimiento adecuado de 5 cultivos puros de hongos aislados de las practicas anteriores
2. Para cada uno de los hongos, corte dos cilindros de agar PDA de un centímetro de diámetro, se recomienda se haga en forma circular, con un grosor de aproximadamente 0.3 cm ayudándose de un tubo de ensayo.
3. En la caja de Petri estéril, coloque en la base de la caja un triángulo de varilla de vidrio y sobre el triángulo el portaobjeto y a su vez sobre el portaobjeto se deposita dos cilindros de agar, de manera equidistante sin llegar a las orillas para realizar esta operación se usa una espátula esterilizada.
4. Inocule los cuatro costados de ambos trozos de agar en forma simétrica de cada cilindro de agar con el hongo elegido.
5. Sobre el cilindro de agar inoculado deposite un portaobjetos, mediante las pinzas de disección.
6. Al término de esta serie de operaciones, deposite 5 mL de glicerina-agua en la base de la caja de Petri, cuidando que no se rebase el nivel del triángulo de vidrio, tape la caja e incube a temperatura ambiente o a 30° C, durante 3 a 7 días.
7. Diariamente revise el crecimiento del hongo, para verificar si ya está madura la colonia para su cosecha. (que el crecimiento no rebase las orillas)
8. Si decide que está completa la maduración del cultivo, elimine con una pipeta Pasteur el agua glicerizada residual y agregue de 10 a 15 mL de formaldehído al 10% o fenol al 10%, media hora antes de realizar el manejo del microcultivo.
9. Una vez inactivadas las esporas, retire hacia arriba el portaobjetos superior sin deslizarlo hacia los lados con sumo cuidado y adicione una o dos gotas de azul de algodón y coloque los cubreobjetos, por otra parte, retire el trozo de agar sosteniéndolo con unas pinzas hacia arriba, sin deslizarlo a los lados y deposítelo en un vaso de precipitados que contenga fenol al 10%, al portaobjetos ya sin el agar aplique una o dos gotas de azul de algodón y coloque los cubreobjetos.
10. Ambas preparaciones se observan a seco débil 10X y seco fuerte 40X.

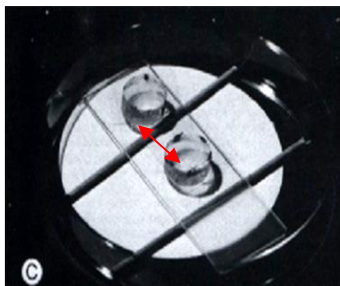
La correcta observación de las preparaciones, nos dará el género y especie del hongo filamentoso, estudiado.

DIAGRAMA DE FLUJO

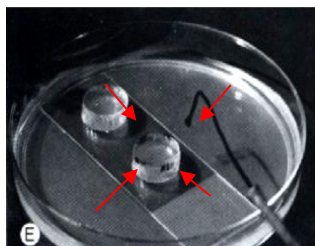
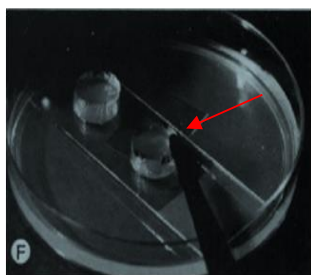
Cortar trozos circulares de agar PDA o Sabouraud.



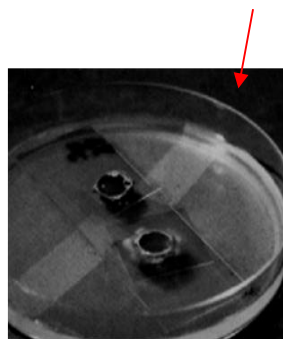
Colocar trozos de agar en caja Petri acondicionada con triángulo de varilla de vidrio y portaobjetos (estériles). Ayudándose de espátula estéril.



Inocule en los cilindros de agar, en cuatros costados simétricamente y colocar otro portaobjetos sobre los trozos ya inoculados.



Adicione 15 mL a 20 mL aproximadamente de glicerina-agua en la base de la misma caja, tapar e incubar.



Inactive las esporas con formaldehído cuando este completa la maduración (Desarrollo $\frac{3}{4}$ partes).



Deseche el agar y adicione una a dos gotas de azul de algodón a portaobjetos colocando posteriormente un cubreobjetos.

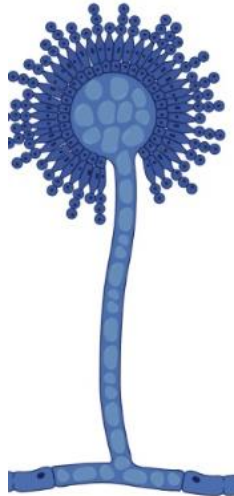
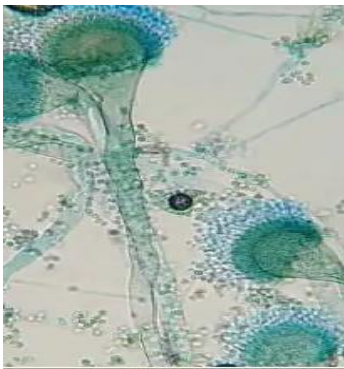


Realice las observaciones en ambas preparaciones.



RESULTADOS

Ejemplo de reporte que incluye la descripción de cada esquema

**CUESTIONARIO**

1. ¿Cuál es la función de agregar glicerina-agua a la caja de Petri?
2. ¿Cuál es el efecto del fenol o el formaldehído al 10%, al agregar a la caja de Petri?
3. ¿Qué otras técnicas a parte del microcultivo son útiles para la identificación de mohos?
4. En un hongo levaduriforme ¿Es recomendable usar el microcultivo para su identificación?

REFERENCIAS

1. Herrera T. Ulloa M. El reino de los hongos. México: Editorial Fondo de Cultura Económica y UNAM; 1990.
2. Koneman R. Micología prácticas de laboratorio. Argentina: Editorial Panamericana; 1993.
3. Rippon J. Tratado de micología médica. México: Editorial Interamericana; 1990.



Descripción de la morfología colonial de hongos

Textura:

Algodonoso
Pulverulento
Granuloso
Velloso
Aterciopelado

Superficie:

Plana
Elevada
Levantamiento central

Aspecto:

Concéntrica
Umbonada
Umbilicada
Crateriforme
Cerebriforme
Plegada
Radiada

Color – anverso del centro a la periferia

-reverso

-pigmento presente o ausente

Exudado presente o ausente



**PRÁCTICA
NÚMERO
5**

**DETERMINACIÓN DE LAS
CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE
LOS HONGOS**



UNIDAD 2. Micología |

INTRODUCCIÓN

Los hongos son un grupo muy amplio de seres vivos, que en un principio se les clasificó dentro el reino *Plantae*, pero que precisamente por sus características morfológicas y fisiológicas, posteriormente se abre un reino exprofeso para este grupo de seres vivos que es el reino *Fungi*.

Las características fisiológicas más relevantes de los hongos son:

- a) No tienen clorofila.
- b) Son fotosensibles pero no realizan la fotosíntesis.
- c) Pueden presentar dimorfismo.
- d) Son saprofitos, sus requerimientos nutricionales son muy sencillos, en especial en los hongos filamentosos, temperatura óptima de crecimiento de 25 - 28° C. Los hongos levaduriformes son los que requieren medios más ricos para su sobrevivencia, la temperatura óptima de crecimiento es de 35 - 37° C.
- e) El pH óptimo para el desarrollo de los hongos de de 5 - 7.
- f) La mayoría de los hongos filamentosos crecen en condiciones aerobias
- g) Además de requerir un ambiente húmedo mayor al que requieren las bacterias (actividad del agua – aw), la cual también puede ser alterada por la concentración de solutos

Por lo que los hongos deben de encontrar en los medios de cultivo, lo necesario para su crecimiento y desarrollo:

- a) Material nitrogenado como peptonas.
- b) Azúcares como; glucosa y maltosa, que son indispensables.
- c) Un soporte sólido como la gelosa, que permite a los hongos filamentosos desarrollar micelio aéreo como órganos de fructificación.
- d) Debe contener el medio cultivo un pH de entre 5 - 6. El medio glucosado o maltosado de Sabouraud reúne este requisito indispensable de desarrollo.

Para obtener la esporulación sexual o asexual es preferible utilizar medios naturales gelosados como el papa - zanahoria o extracto de malta.

También son necesarios elementos como el hierro y el fósforo para la transformación de energía.

Muchos hongos necesitan vitaminas, estas se encuentran en las impurezas de la peptona y del azúcar, en ocasiones conviene utilizar medios enriquecidos con vitaminas específicas.

La forma unicelular en los hongos pueden ser las levaduras, para obtener un desarrollo adecuado de estos hongos se requiere cultivarlos en medios enriquecidos con sangre o huevo. La temperatura ambiente que es de 15 a 30° C permite el desarrollo de la

mayoría de los hongos saprofitos y de patógenos superficiales. Para los patógenos de mucosas y demás órganos profundos la temperatura óptima de desarrollo es de 30 a 37° C.

La fermentación de azúcares es una característica importante para diferenciar levaduras, también es conveniente el método de utilización de azúcares y materias nitrogenadas en anaerobiosis. Estos también pueden utilizarse en hongos filamentosos.

Por todo lo anterior se diseña la presente práctica que aprovecha las características fisiológicas más relevantes de los hongos para su clasificación y como afectan los cambios de los parámetros de crecimiento de diferente géneros y especies de hongos filamentosos

OBJETIVOS:

1. Conocer las necesidades fisiológicas de los hongos filamentosos en comparación con los hongos levaduriformes.
2. Conocer las técnicas y métodos adecuados para demostrar y valorar las necesidades fisiológicas de los hongos.

MATERIAL POR EQUIPO:

- ✓ Un asa micológica.
- ✓ Una espátula.
- ✓ Un bisturí.
- ✓ Papel absorbente estéril, 20 cm
- ✓ Dos cajas de Petri estériles.
- ✓ Un tubo 13X100, con 3 mL de acetato de sodio al 5% pH 7.5.
- ✓ Un tubo 13X100, con 3 mL de cloruro de amonio al 5% pH 2.3.
- ✓ Un tubo 13X100, con 3 mL de ácido sulfúrico 2N.
- ✓ Un tubo 13X100, con 3 mL de solución salina al 2.5%.
- ✓ Un tubo 13X100, con 3 mL de solución salina al 5%.
- ✓ Un tubo 13X100, con 3 mL de solución de sacarosa al 5%.
- ✓ Un tubo 13X100, con 3 mL de solución de sacarosa al 15%.
- ✓ Dos tubos 13X100, con 3 mL de agua destilada estéril.
- ✓ Fruta fresca y/o verdura (se las asignará el asesor de la práctica a cada equipo de laboratorio).
- ✓ Mermelada (se las asignará el asesor de la práctica a cada equipo de laboratorio).

MÉTODO

1) Todos los tubos que se les proporcione inocúelos *(incluyendo el tubo con agua destilada estéril), con una cepa de hongo previamente identificada (el asesor les indicará cual hongo se utilizará).

* procure no llevarse medio de cultivo y de tomar la misma cantidad de inóculo en cada uno de los tubos

2) Incube a temperatura ambiente y cheque su crecimiento a las 24, 48, 72, etc. horas.

3) En una caja de Petri estéril coloque mermelada, cubriendo el fondo de la caja inocule en el centro la cepa utilizada en el paso anterior.

4) Incube a temperatura ambiente y reporte el crecimiento que observe en la caja de Petri.

5) En la otra caja de Petri estéril coloque en la base papel filtro estéril y agregue agua destilada estéril (todo el contenido del tubo) procurando impregnar el papel, posteriormente añada una pequeña porción de fruta o verdura cuidando de quitar la cáscara y suciedad externa.

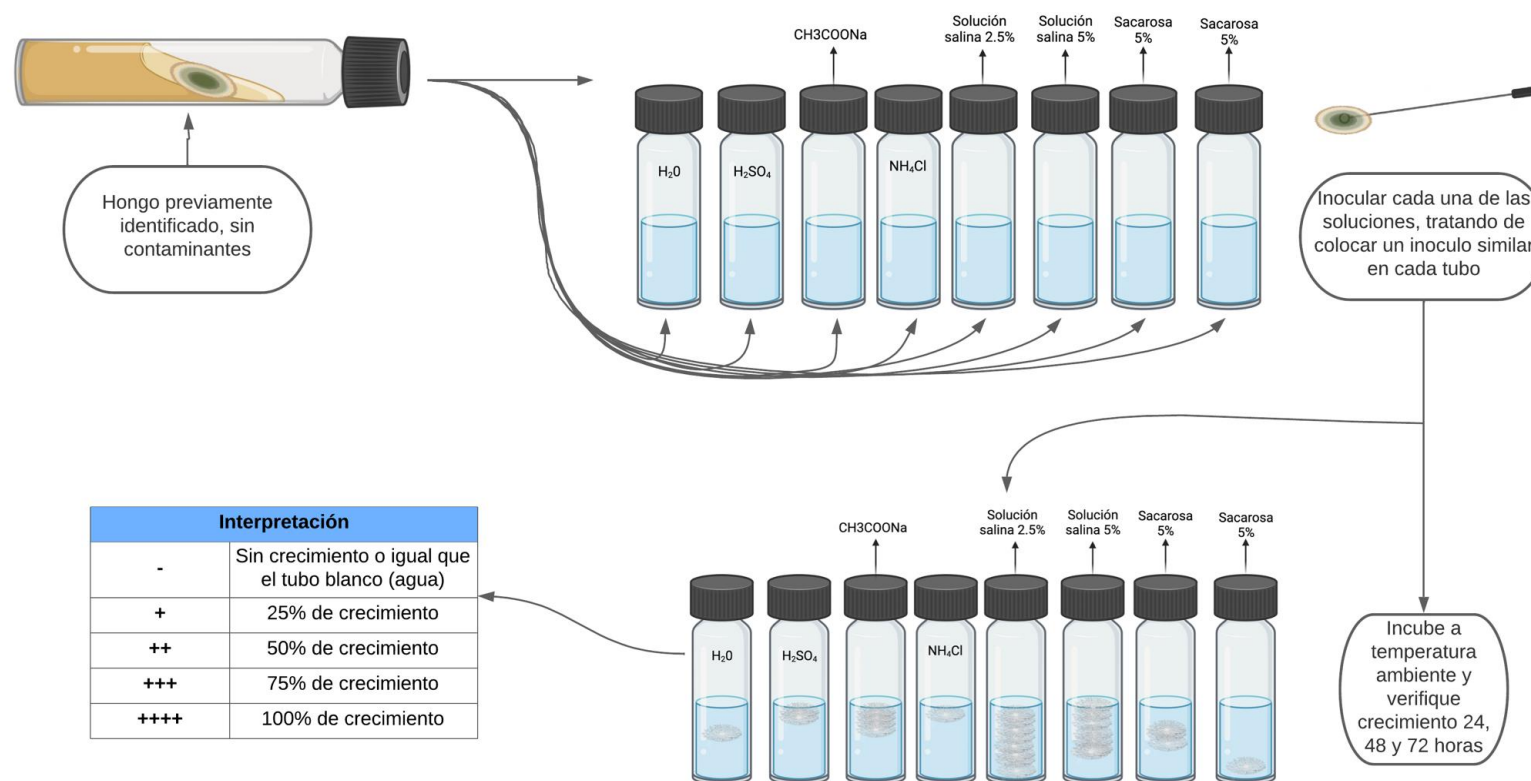
6) Inocule en el centro de la fruta o verdura la misma cepa con la que trabajo e incube a temperatura ambiente y reporte el crecimiento.

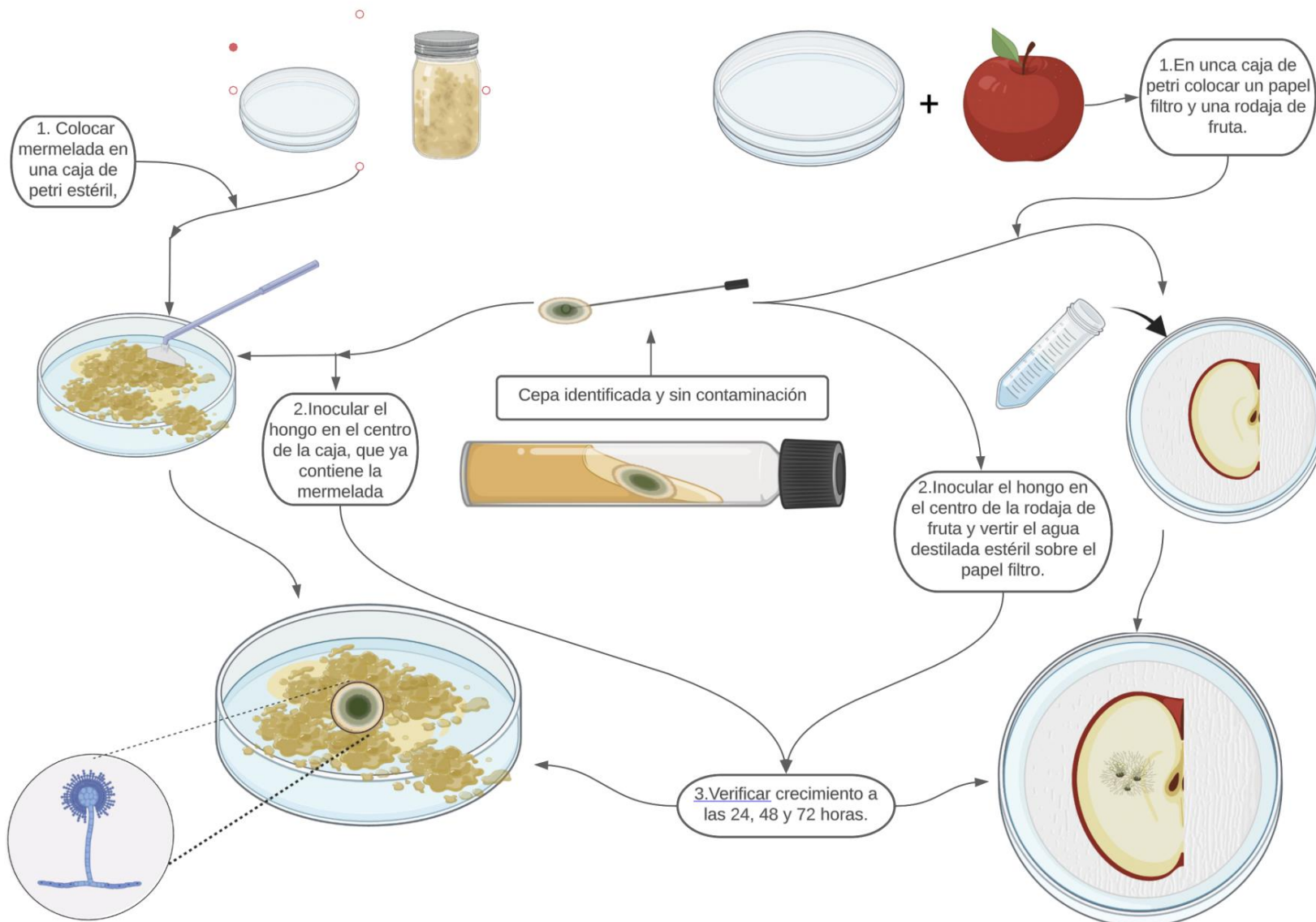
7) Realice por equipo sus observaciones y conclusiones.

8) A la siguiente semana de haber realizado sus observaciones, realice

una concentración de resultados de todo el grupo y discuta sus resultados y conclusiones en su reporte

DIAGRAMA DE FLUJO





CUESTIONARIO

1. ¿Qué importancia tiene el conocer la fisiología de los hongos?
2. ¿Cuáles son los requerimientos nutricionales de los hongos?
3. ¿Cuáles son los parámetros de crecimiento de los hongos y cómo se clasifican cada uno de ellos?
4. ¿Qué es el dimorfismo en micología?
5. Describa ampliamente como repercuten en la morfología y fisiología de los hongos los siguientes factores:
 - pH.
 - Temperatura.
 - Humedad.
6. ¿Qué factores fisiológicos influyen en la práctica donde utiliza la mermelada como medio de cultivo?
7. Analice y describa el comportamiento metabólico de los hongos en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis.

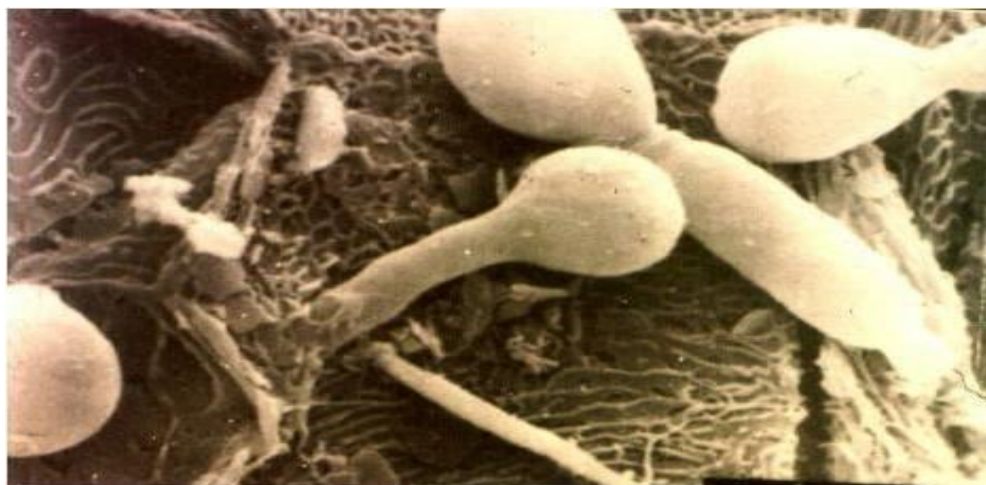
REFERENCIAS

1. Bayley and Scott's. Diagnostic microbiology. 7^a ed. USA: Editorial Mosby.. (1986).
2. Koneman-Roberts. Micología práctica de laboratorio. 2^a reimpresión. 3^a edición. Argentina: editorial panamericana. (1990).
3. Rippon. Tratado de micología médica. 3^a edición. México: Editorial interamericana. (1990).
4. Bonifas. Micología Médica Básica. 5^a edición. México: MacGrow-Hill. (2015).
5. https://www.youtube.com/watch?v=be_LwtZz3oc
6. <https://www.youtube.com/watch?v=ZFFzUSlgddw>



PRÁCTICA
NÚMERO
6

FISIOLOGÍA DE LEVADURAS



UNIDAD 2. |

INTRODUCCIÓN

Las levaduras en medios de cultivo como ADS no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones aracneiformes en la periferia de las colonias, aunque algunas levaduras pueden presentar crecimiento peculiar que ayuda en su caracterización (*Criptococcus sp.*)

Las levaduras son hongos unicelulares, tienen forma oval o esférica, midiendo de 3 a 15 micras de diámetro.

La gran mayoría de estos hongos se reproducen por gemación, tanto sexual como asexual. Por lo que la identificación microscópica es relativamente sencilla por su forma y su tamaño

Muchos hongos de importancia médica e industrial presentan esta forma. A nivel industrial tenemos los hongos levaduriformes que producen vitaminas, vinos, cerveza, la levadura del pan, etc.

Koneman y Roberts idearon un esquema útil para clasificar los hongos más comúnmente aislados en el laboratorio de Bioquímica Clínica, que consiste en determinar si el hongo es un moho ya sea hialino o demateaceo, o bien si el hongo es una levadura.

Por otra parte los hongos levaduriformes de importancia médica que más comúnmente se presentan son:

La *Candida albicans* y el *Criptococcus neoformans* causan la candidiasis y la

criptococosis, enfermedades que se caracterizan por ser oportunistas y tener una elevada incidencia en pacientes desnutridos, inmunocomprometidos, pacientes sujetos a prolongados tratamientos con antibióticos o quimioterápicos.

Cabe aclarar que este tipo de hongos forman parte de la flora normal.

Se sabe que el 75 al 80% de las muestras recolectadas en el laboratorio y al desarrollarse en los medios de cultivo presentan forma levaduriforme y corresponde a *C. albicans*.

Por todo lo anterior es importante la correcta identificación de las levaduras, las pruebas más comúnmente usadas son:

a) Desarrollo de tubo germinativo, como una prueba morfológica de gran importancia de identificación microscópica.

Esta prueba determina la formación de pseudohifa o tubo germinativo que es una prolongación de la levadura sin que desde su origen se estreche incluso puede ser dos veces el tamaño de la gema original ejemplo: *Candida albicans* (al igual que el desarrollo de blastoconidios o artroconidios en otras levadura). Como se puede ver en la figura 2.6.1.

b) Producción de ureasa.

Esta técnica se basa en el hecho que el *C. neoformans*, *C. krusei*, algunos hongos del género *Rhodotorula ssp.* y *Trichosporum ssp.* producen ureasa, esta técnica es altamente sensible (99.5%)

para detectar el *C. neoformans*.

c) Reducción de nitrato.

Esta técnica es útil para diferenciar el *C. neoformans*, se basa en el hecho que este hongo es incapaz de reducir nitritos.

d) Prueba de L-dopa-citrato férrico.

Esta prueba es útil para detectar la presencia de *C. neoformans*, ya que este hongo es capaz de producir fenoloxidasa, enzima que puede ser detectada por la L-dopa-citrato-férrico.

e) La asimilación y fermentación de carbohidratos, denominadas; Auxonograma y Zimograma respectivamente.

Estas pruebas son tan selectivas que pueden determinar el género y la especie del hongo levaduriforme.

El auxograma se realiza en placa de Petri que contiene un medio con escaso contenido de fuentes de carbono y se evalúa la asimilación de carbohidratos, que son colocados en el medio de cultivo desde que se sembró el hongo por identificar, como se ve en la figura 2.6.2.

El Zimograma se realiza en tubo de ensaye que contiene un carbohidrato específico en solución, en una campana de Durham invertida se coloca la levadura y se evalúa la fermentación del carbohidrato específico, como se aprecia en la figura 2.6.3.

f) También existen pruebas comerciales para identificar levaduras como son;

el sistema API-Yeast-Ident, API 20C y el Uni-Yeast-Tek System. Que se basan en la asimilación de carbohidratos. Pruebas eficientes Precisas pero muy caras.

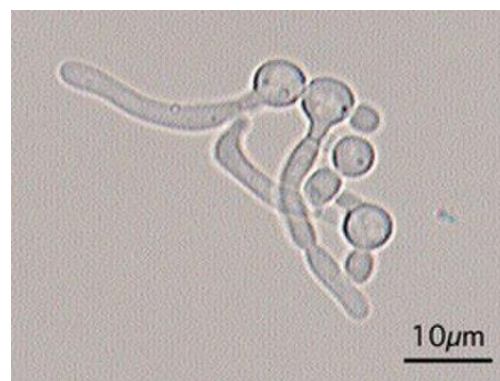


Figura 2.6.1. A) Tubo germinal de *Candida albicans* obtenido en suero humano a las 3 horas de incubación a 37 °C. B) Blastoconidio con pseudohifa.

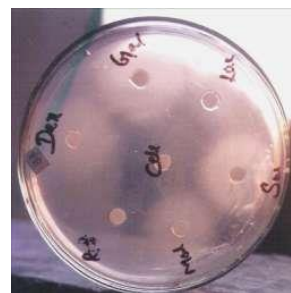


Figura 2.6.2. Auxograma en agar noble.



Figura 2.6.3. Tubos con medio para la prueba de zimograma.



Fig 2.6.4 formación de clamidosporas



Fig 2.6.5 prueba de reducción de nitrato



Fig 2.6.6 prueba de ureasa



Fig 2.6.7 prueba de L-dopa-citrato férrico

OBJETIVOS:

1. Conocer las necesidades fisiológicas de las levaduras.
2. Comprender y realizar las técnicas de Auxonograma y el Zimograma, para la identificación de levaduras.
3. Conocer la importancia clínica e industrial de identificar levaduras.

MATERIAL POR EQUIPO:

- ✓ Cepa de *C. albicans*, en un tubo 18X150 con tapón de rosca.
- ✓ Cepa de *C. stellatoidea*, en un tubo 18X150 con tapón de rosca.
- ✓ Suero humano o de carnero o conejo, 3 mL
- ✓ Una caja de agar harina de maíz.
- ✓ Dos cajas de agar base de levaduras más púrpura de bromocresol.
- ✓ Un tubo de 13X100 conteniendo una solución estéril de los siguientes carbohidratos:
- ✓ Manitol.
- ✓ Glucosa.
- ✓ Lactosa.
- ✓ Sacarosa.
- ✓ Maltosa.
- ✓ Trealosa.
- ✓ Galactosa.
- ✓ Dos tubos de solución salina estéril al 0.85%.
- ✓ Dos tubos 13 X100, con caldo maltosa más PBC con campana de Durham.
- ✓ Dos tubos 13X100, con caldo sacarosa más PBC con campana de Durham.
- ✓ Dos tubos 13X100, con caldo trehalosa más PBC con campana de Durham.
- ✓ Dos tubos 13X100, con caldo lactosa más PBC con campana de Durham.
- ✓ Dos tubos 13X100, con caldo glucosa más PBC con campana de Durham.
- ✓ Dos tubos 13X100, con caldo manitol más PBC con campana de Durham.
- ✓ Dos tubos 13X100, con caldo galactosa más PBC con campana de Durham.
- ✓ Diez discos de papel filtro estériles, en un tubo 18X150 con tapón de rosca.
- ✓ Un mechero.
- ✓ Cinco pares de hisopos estériles.
- ✓ Tubos 3 y 4 de la escala de Mc Farland.
- ✓ Un microscopio.
- ✓ Cubreobjetos y portaobjetos.

MÉTODO

I) Producción de Clamidiosporas.

- a) Divida por la mitad la caja de agar harina de maíz y en cada mitad siembre cada cepa en forma de "Z", con el asa micológica hundiéndola con el inóculo hasta el fondo de la rasgadura.
- b) Incube a 37° C por 24 a 48 horas.
- c) Tome un inóculo de cada mitad y colóquelos en un portaobjetos que contengan una gota de solución salina equidistantes y resuspenda el inóculo.
- d) Observe al microscopio 40x y reporte el tipo de desarrollo.

II) Producción de Tubo Germinal.

- a) En dos tubos de ensaye coloque aproximadamente 1 mL de suero de conejo, carnero o humano.
- b) Inocule una asada de cada cepa de hongo.
- c) Incube a 35° C durante 3 horas.
- d) Al término de la incubación, tome una gota de la solución de cada tubo, en su respectivo portaobjetos y se coloca un cubreobjetos.
- e) Observe al microscopio en busca del desarrollo del tubo germinal y reporte el resultado.

III) Auxonograma.

- a) Cada cepa de levadura se suspenderá en solución salina fisiológica o en agua estéril.
- b) Deje de suspender la cepa hasta igualar la turbidez del tubo con el tubo

3 o 4 de la escala de Mc Farland para conocer la carga microbiana.

- c) Introduzca en cada tubo un hisopo estéril hasta el fondo, escúrralo en las paredes del tubo y siembre masivamente cada levadura en su respectiva caja con agar levadura y púrpura de bromocresol.
- d) Humedezca los discos de papel filtro estéril (marcar los discos con lápiz), con cada una de las soluciones de carbohidratos (7), deje secar el exceso y coloque los discos en la caja de Petri sembrada de forma que no se superpongan (Preferentemente deberá etiquetar por el reverso de la caja las iniciales de cada uno de los azúcares para evitar confusiones o repeticiones de estos).
- e) Se incuba a 37° C por 24 a 48 horas.
- f) Se reporta el crecimiento de cada levadura alrededor de cada uno de los discos.
- g) Se interpreta de la siguiente forma; un crecimiento indica que hubo asimilación de ese carbohidrato por parte del hongo, un halo de inhibición alrededor del disco indica que no hubo asimilación de la azúcar por parte del hongo.

** Compare los resultados obtenidos con los reportados en la bibliografía. **

IV) Zimograma.

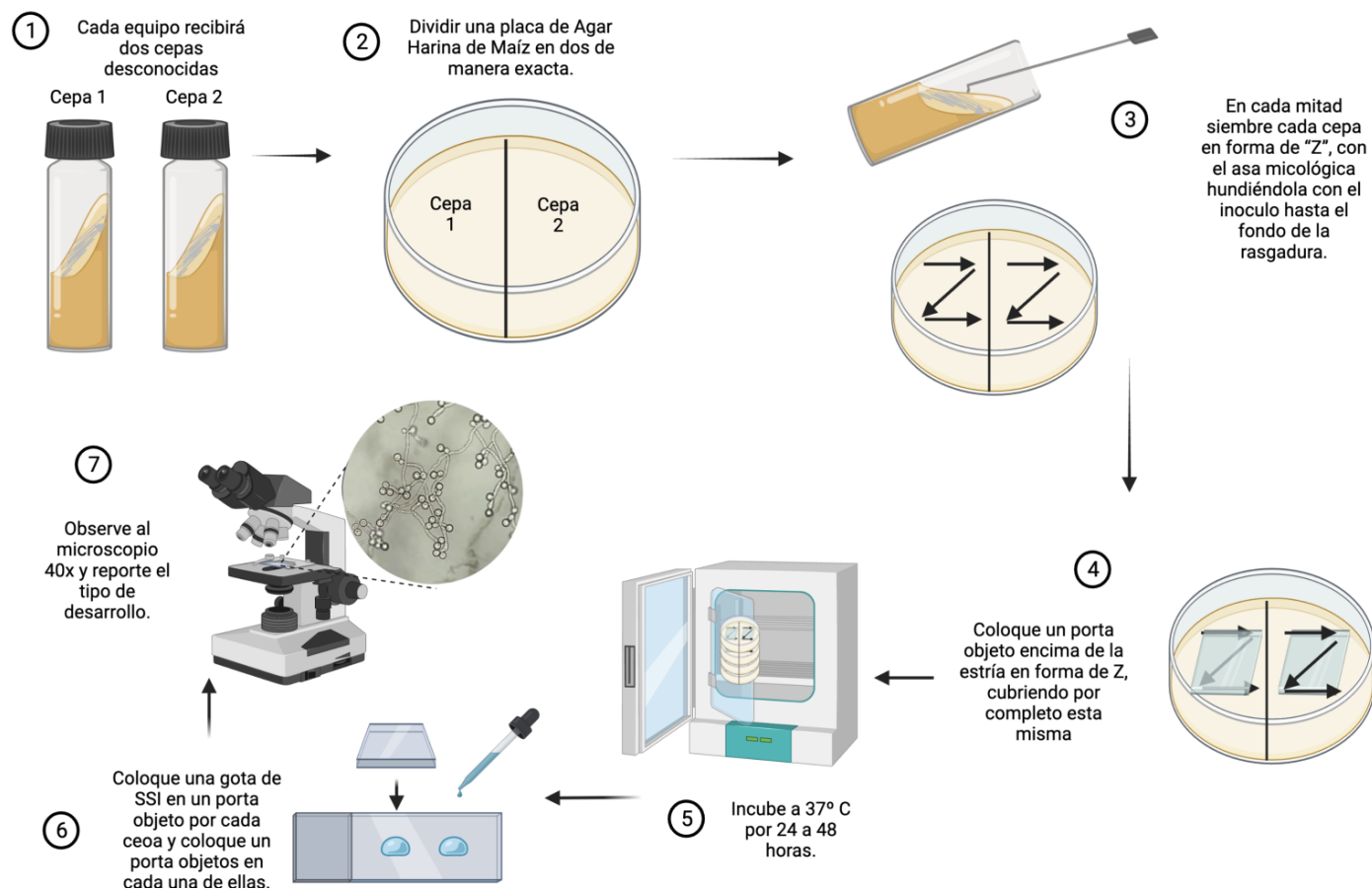
- a) Inocule 0.1 ml de la suspensión de la cepa de levadura en cada juego de tubos que contienen el caldo levadura más púrpura de bromocresol que contienen los diferentes carbohidratos (7)

- b) Incube a 37° C por 24 a 48 horas, lea y reporte los resultados.
- c) Interprete cualquier cambio o gas detectado, indica fermentación del carbohidrato.

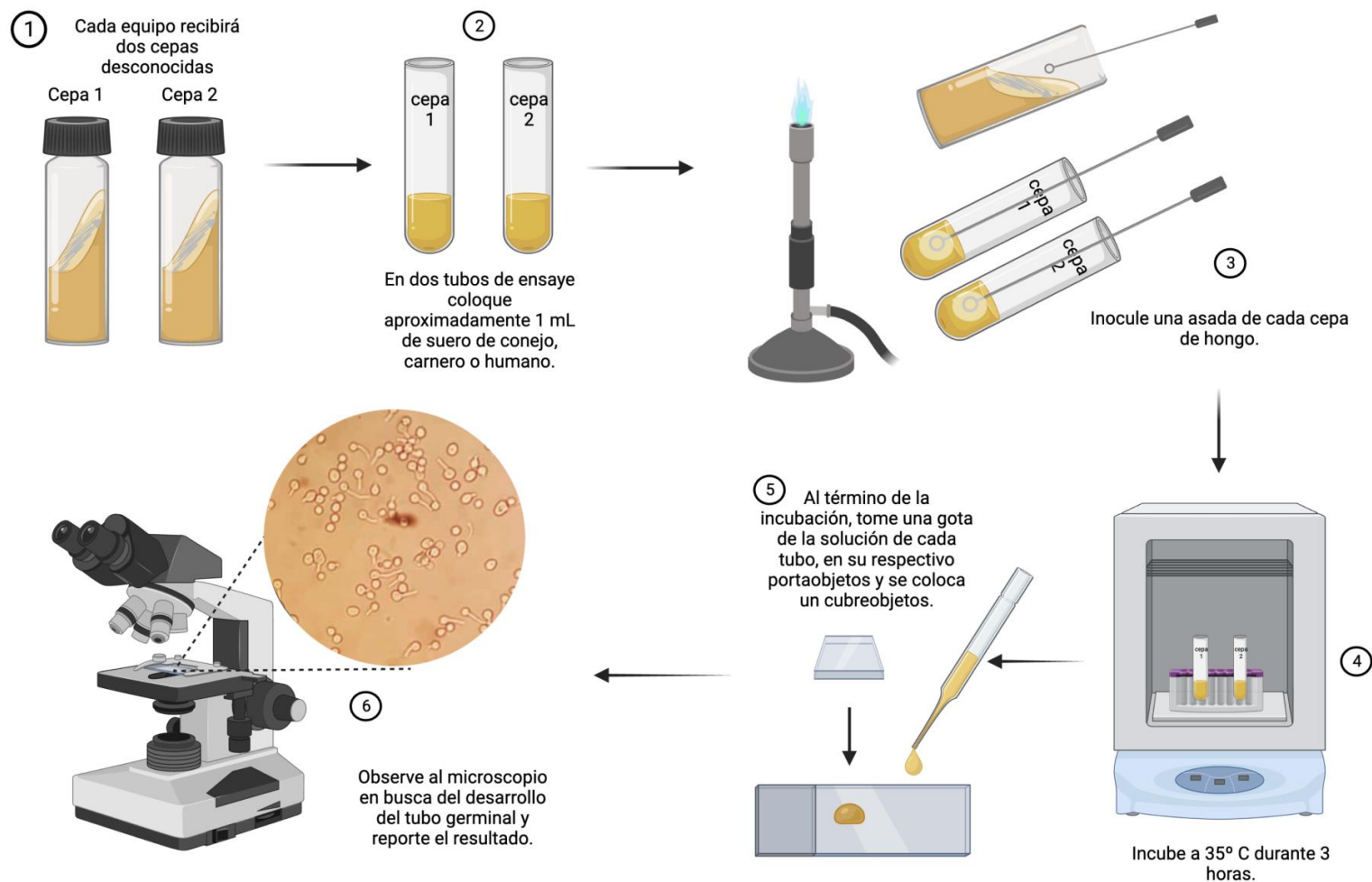
** Compare los resultados obtenidos con los reportados en la bibliografía. **

DIAGRAMA DE FLUJO

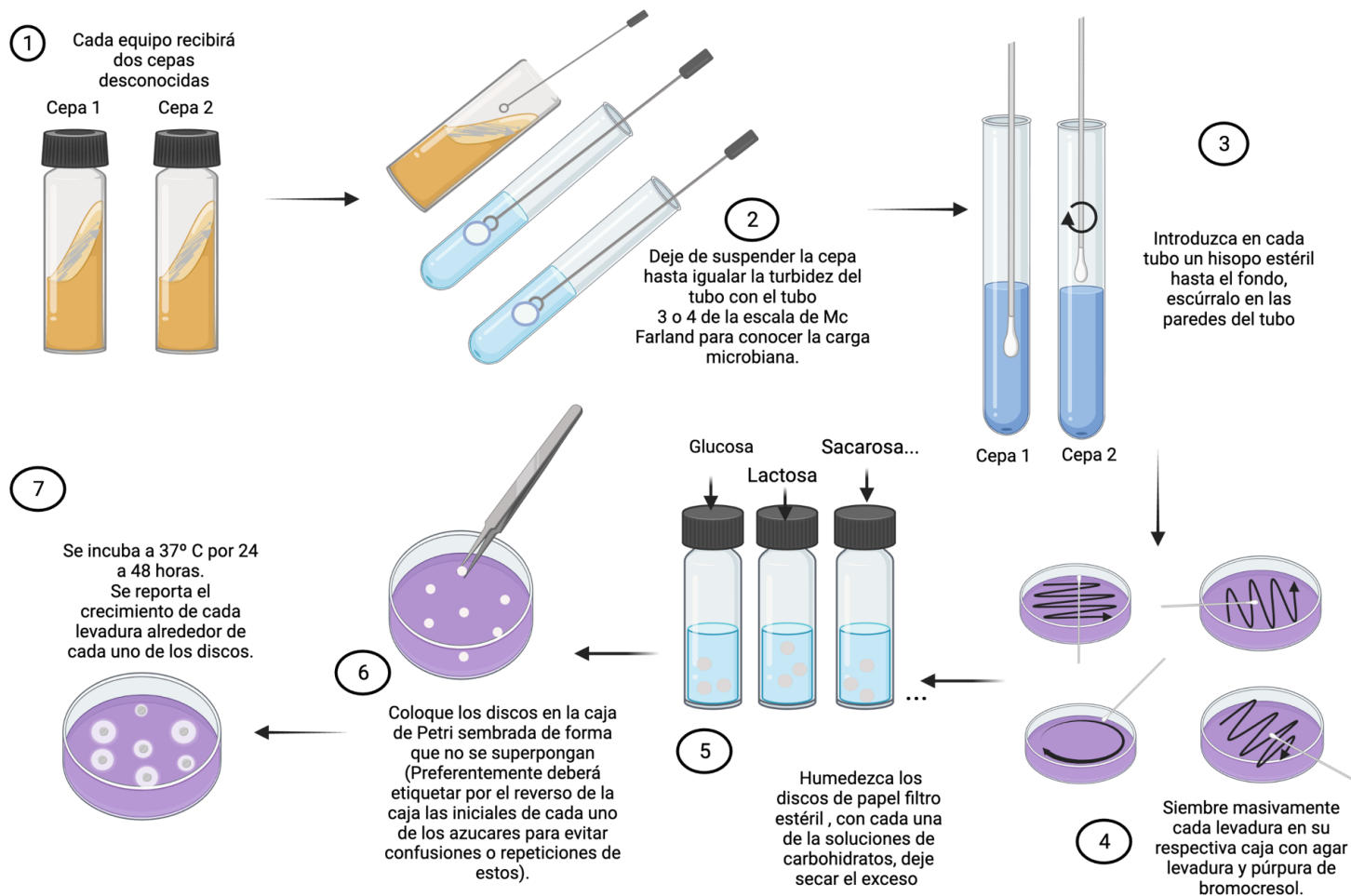
I. Producción de Clamidiospora



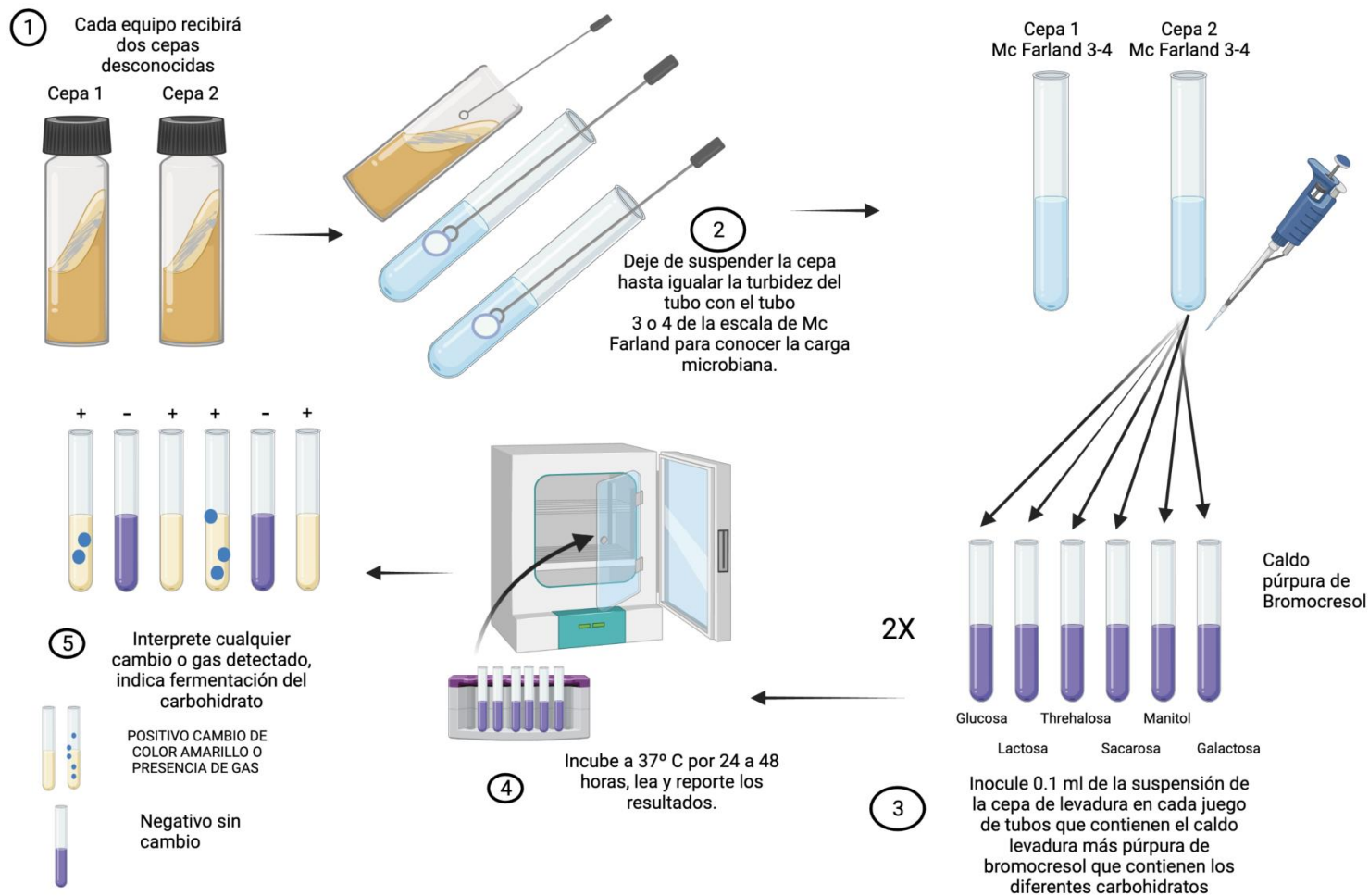
II. Producción de Tubo Germinal



III. Auxonograma.



IV. Zimograma.

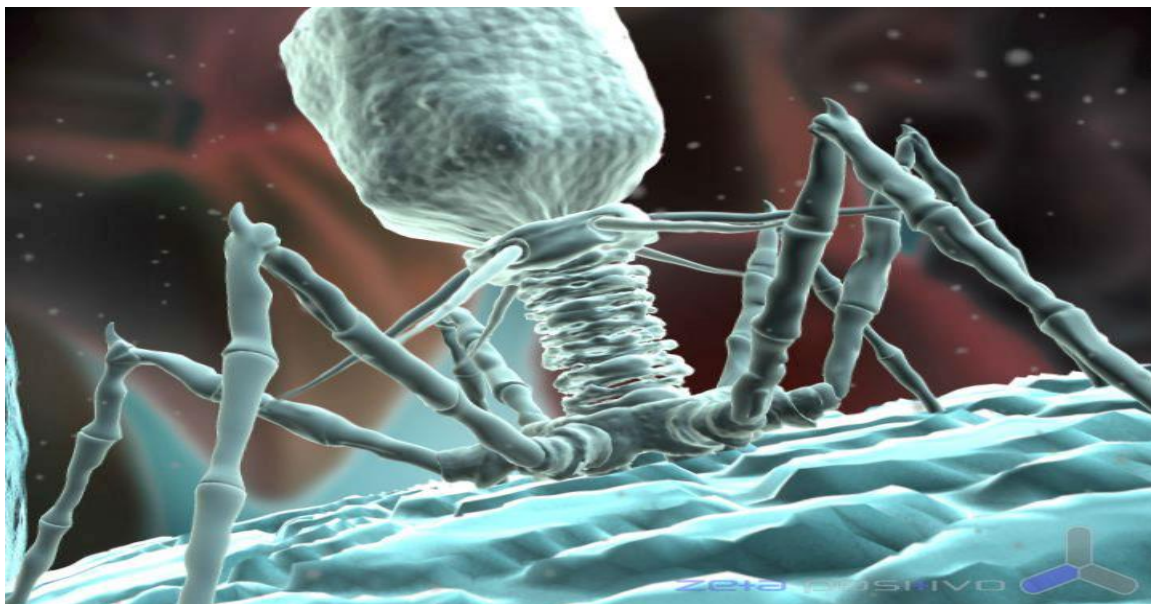


CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la diferencia entre asimilación y fermentación de un carbohidrato, por parte de una levadura?
2. Describa someramente la moniliasis, candidiasis sistémica y la criptococosis.
3. Describa en que consiste los sistemas de identificación API-20C y Uni-Yeast-Tek System.
4. ¿Qué otras técnicas de identificación de levaduras hay y que no se incluyeron en la práctica (dos)?
5. ¿Por qué motivo, se sembró en "Z" en la caja de agar harina de maíz?
6. ¿Qué otros medios pueden emplear para el desarrollo de clamidosporas?
7. ¿Cuál es el fundamento del cromoagar y qué importancia tiene en la identificación de las levaduras?
8. Mencione otras pruebas para la identificación de levaduras

REFERENCIAS

1. Herrera T, Ulloa M. El reino de los hongos. México: Editorial Fondo de Cultura Económica y UNAM; 1990.
2. Koneman R. Micología prácticas de laboratorio. Argentina: Editorial Panamericana; 1993.
3. Rippon J. Tratado de micología médica. México: Editorial Interamericana; 1990.



PRÁCTICA
NÚMERO
1

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS

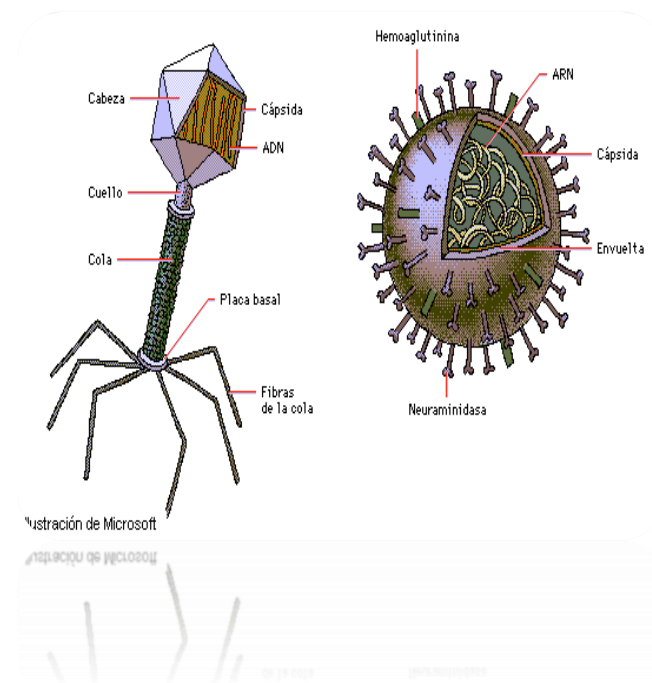


UNIDAD 3 Virología |

INTRODUCCIÓN

Los virus son parásitos intracelulares obligados, de tamaños muy pequeños en el orden de los nanómetros (nm). Los virus están constituidos de un genoma, coré o material genético, tienen un recubrimiento proteico al cual se le llama cápside y al conjunto del genoma y la cápside se le suele llamar capsómero, algunos virus suelen tener un recubrimiento lipídico a lo que se le llama peplos o membrana, estos virus se les llama virus envuelto, los virus sin peplos se les llama sin peplos o desnudos.

Figura 3.1.1 Estructuras virales



Los virus pueden parasitar células procariotas, como las bacterias y que en este caso el virus se le llama bacteriófago. Cuando el parasitismo lo realiza en células eucariotas se le llama virus.

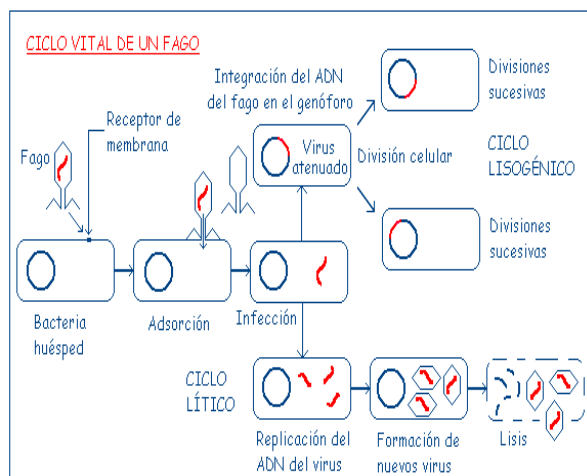
Los virus presentan diversas etapas en su replicación viral las cuales son mostradas en la figura 3.1.1.

Los virus que infectan bacterias se denominan bacteriófagos o simplemente fagos.

Existen dos clases de bacteriófagos:

- Fagos líticos o virulentos, en los que, tras la infección, el ácido nucleico del fago se replica y transcribe dentro de la bacteria huésped originando nuevas partículas fágicas que son liberadas al lisarse la célula (ciclo lítico).
- Fagos lisogénicos o atenuados. Tras la infección, su ácido nucleico puede integrarse en el genóforo o cromosoma de la bacteria, lo que se denomina profago, y replicarse en sincronía con él, manteniéndose en estado latente (ciclo lisogénico). El profago puede liberarse del genóforo bacteriano y entra en un ciclo lítico, como se muestra en la siguiente figura.

Figura 3.1.2. Ciclo vital de un fago.



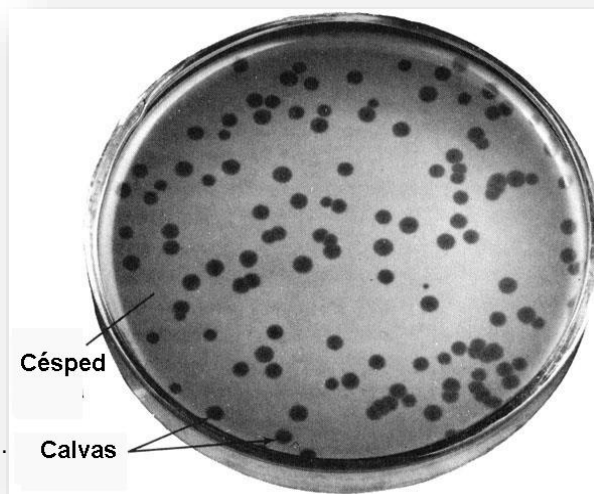
El cometido de la práctica es demostrar la capacidad de los virus de replicarse en una célula hospedera. Para este motivo se proveerá de un fago virulento y susceptible a la célula hospedadora del cultivo. Esta técnica es útil para enumerar partículas fágicas sobre la base de formación de placas en un medio de agar sólido.

Para preparar una suspensión de fagos virulentos, se mezcla una pequeña cantidad de estos en un cultivo de la bacteria susceptible a ser infectada o bacteria hospedera. Tras la infección, las bacterias se lisan liberándose nuevas partículas fágicas al medio, que se centrifuga para retirar los restos celulares. Se mezcla una determinada dilución de la suspensión fágica con un cultivo exponencial de la bacteria hospedera, y se coloca sobre la superficie de una placa de agar, después de la incubación se observará un césped o tapiz bacteriano sobre el que aparecen pequeñas áreas

circulares claras que corresponden a las denominadas placas líticas o “calvas de lisis”. Estas placas líticas representan áreas de producción de fagos procedentes de la lisis de bacterias infectadas en esa área.

Las placas líticas o calvas; son áreas claras en un medio de agar previamente sembrado con una muestra diluida del fago y la célula huésped. Cada placa representa la lisis que produjo un fago que infecto a una bacteria como se muestra en la siguiente figura.

Figura 3.1.3. Placas líticas causadas por bacteriófagos.



OBJETIVOS:

1. Conocer e identificar un bacteriófago, un virus y el efecto de parasitismo intracelular que producen en una célula hospedera.
2. Llevar a cabo el manejo y aislamiento de bacteriófagos.
3. Conocer las etapas de la replicación de los bacteriófagos.

MATERIAL POR EQUIPO:

- ✓ Moscas vivas, de 20 a 30, atrápelas usted.
- ✓ Aguas residuales como fuente del bacteriófago aproximadamente 45 mL
- ✓ Cepa de *Escherichia coli*. sembrado en forma masiva en una caja medio EMB. Aislada previamente.
- ✓ Dos matraces Erlen Meyer de 125 mL
- ✓ Seis tubos para centrifuga 13X100.
- ✓ Cinco tubos con tapón de rosca 18X150.
- ✓ Ocho pipetas estériles de 1 ml
- ✓ Un filtro de membrana estériles de 0.45 μm , marca Millipore para jeringa.
- ✓ Cuatro tubos 13X100, que contiene 4.5 mL de caldo soya tripticaseína.
- ✓ Cuatro cajas que contiene agar nutritivo.
- ✓ Cuatro tubos 13X100, que contienen 3 mL de agar blando (0.7% de agar) de soya tripticaseína.
- ✓ Mortero y pistilo para aproximadamente 250 mL
- ✓ Dos frascos estériles, de 50 a 100 mL
- ✓ Cinco mL de caldo nutritivo decaconcentrado, en un matraz de 50 mL
- ✓ Cuatro jeringas de insulina de 1 mL Estéril
- ✓ Una jeringa de 3 ml estéril.
- ✓ Una jeringa estéril de 10 mL

MÉTODO

A. Aislamiento de *Escherichia coli* de diversas fuentes.

Una semana antes de realizar la práctica es indispensable que haga lo siguiente.

Moscas vivas como fuente:

1. Atrape usted de 20 a 30 moscas vivas.
2. Macere las moscas con caldo BHI o caldo soya tripticaseína (de 10-12 ml).
3. Siembre de esta mezcla en agar EMB, en 4 cuadrantes, incube a 37 °C por 24 horas.
4. De todas las colonias que han crecido identifique y aislé a la *E. coli* (por las características de crecimiento) en agar EMB. Realice esta operación las veces que sea necesario hasta tener el cultivo puro y siémbrelo masivamente en una caja de agar soya tripticasa.
5. Una vez aislado la *E. coli*, tome una asada y resuspenda en 2 mL de caldo de soya tripticaseína (este cultivo se usará para el enriquecimiento del bacteriófago). Incúbelo por 24 horas.

Aguas residuales como fuente:

1. Obtenga aproximadamente 45 mL de agua residual.

2. Tome con el asa bacteriológica el agua residual siembre en agar EMB, en cuatro cuadrantes, e incube a 37 °C por 24 horas.
3. De todas las colonias que han crecido identifique y aislé a la *E. coli* (por las características de crecimiento) en agar EMB. Realice esta operación las veces que sea necesario hasta tener el cultivo puro y siémbrelo masivamente en una caja de agar soya tripticaseína.
4. Una vez aislado la *E. coli*, tome una asada y resuspenda en 2 mL de caldo de soya tripticaseína (este cultivo se usará para el enriquecimiento del bacteriófago). Incúbelo por 24 horas

B. Enriquecimiento del bacteriófago

Un día antes de la práctica debe realizar lo siguiente.

Moscas vivas como fuente:

1. Adicione de 20 a 30 moscas a una pequeña cantidad de caldo soya tripticaseína (de 10-12 ml) y macere con un pistilo hasta hacer una pulpa fina.
2. Transfiera esta mezcla a un frasco estéril y adicione más caldo soya tripticaseína hasta completar 20 mL más los 2 mL de caldo que contiene *E. coli* (del cultivo del punto cinco del aislamiento de *E. coli* de moscas vivas).

3. Mezcle suavemente.
4. Incube 24 hrs. a 35 °C.

Agua residual como fuente:

1. Adicione 15 mL de agua residuales a 4.5 mL de caldo nutritivo decaconcentrado en un frasco estéril, adicione los 20 mL de cultivo en caldo de *E. coli* (del cultivo del punto cuatro del aislamiento de *E. coli* de agua residual).
2. Mezcle suavemente.
3. Incube 24 hrs. a 35 °C.

C. Identificación del bacteriófago

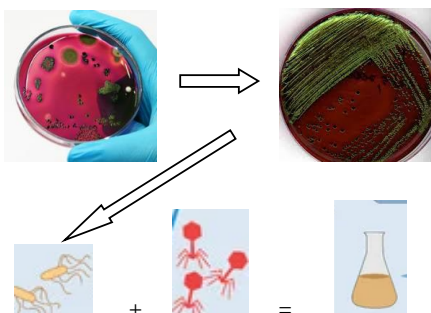
El día de la práctica debe realice lo siguiente.

Tanto de la fuente de aguas residuales como de las de moscas.

1. Decante 10 mL del enriquecimiento de bacteriófagos (del punto B tanto de moscas como de agua residual) dentro de tubos para centrífuga y centrifugue a 3000 r.p.m. por 30 minutos, para remover bacterias y material sólido.
2. Del sobrenadante del tubo centrifugado, con la ayuda de una jeringa, filtre el sobrenadante a través de un filtro de membrana (con el filtro Millipore) y deposite el líquido claro dentro de un tubo con tapón de rosca.
3. Marque 4 tubos de caldo soya tripticaseína (con 4.5 mL cada uno), del 1 al 4.
4. Asépticamente adicione 0.5 mL de la suspensión enriquecida (del paso dos) al tubo uno y mezcle cuidadosamente aspirando y bajando el volumen dos a tres veces. De este tubo (1) transfiera 0.5 mL al segundo tubo, y repita la operación hasta el tubo (4) y el restante 0.5 mL viértalo a un contenedor con desinfectante.
5. Adicione 0.1 mL de cultivo de *E. coli* del paso A, a los tubos de agar blando, previamente fundido y manteniéndolo a 45 °C., continúe manteniéndolos a 45 °C sin permitir que solidifique.
6. Pipeteé del tubo (4) 1 mL y viértalo al agar blando (marcado con el número 4), mezcle por agitación y rápidamente invierta este tubo sobre la caja con agar soya tripticaseína marcada con el número (4), mezcle en forma de ochos. Repita la operación para los tubos (1) al (3) a igual número de cajas de Petri –resultados cuantitativos por la aparición de las calvas (unidades formadoras de calvas).
7. Adicione 0.1 mL del cultivo de *E. coli*, a cada remanente de los tubos (del 1 al 4) del paso anterior y mezcle suavemente -resultados cualitativos, existe o no turbidez al día siguiente- (cuidando que la asada de *E. coli* sea de la fuente correspondiente, moscas o aguas residuales, recuerde que los virus son “selectivos”).

8. Incube las cajas y los tubos del paso 9 a 35 °C por 24 horas, observe.
9. Ver la figura 3.1.3 de cómo se deben observar las placas líticas en las cajas.

DIAGRAMA DE FLUJO



Decantar
enriquecimiento
B y centrifugar.



Decantar el
sobrenadante
del centrifugado
y filtre con
ayuda de una
jeringa y un filtro
de disco
Millipore.

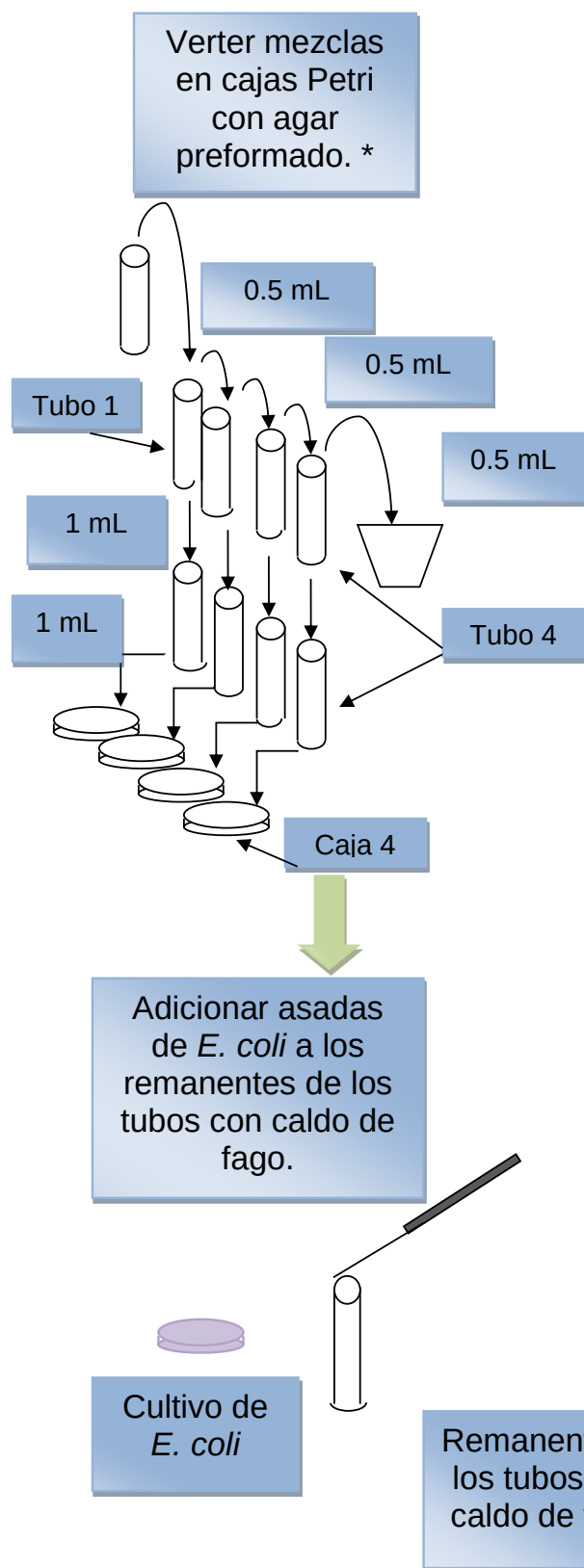


Realizar
diluciones *

Fundir agar
blando y
mantener a
45 °C



Adicionar 0.1 mL
de caldo de *E. coli*
y 1 mL de
caldo de fago.*



CUESTIONARIO

1. Describe las formas y tamaños de los DNA virus y RNA virus.
2. Amplíe lo que es un bacteriófago y cuál es su utilidad?
3. ¿Cuántos virus de la hepatitis hay y cuál es su forma de transmisión, de cada uno de ellos?
4. Describe la forma que presenta el virus HIV.
5. ¿Qué es el SIDA?
6. ¿Cuántos virus respiratorios se conocen, cómo se explican sus mutaciones y con base en que se pueden elaborar vacunas para erradicarlos ?
- 7.-Explique como las bacterias adquieren resistencia a los bacteriófagos
- 8.-En que se basó la tecnología CRISPR y cuales son sus usos

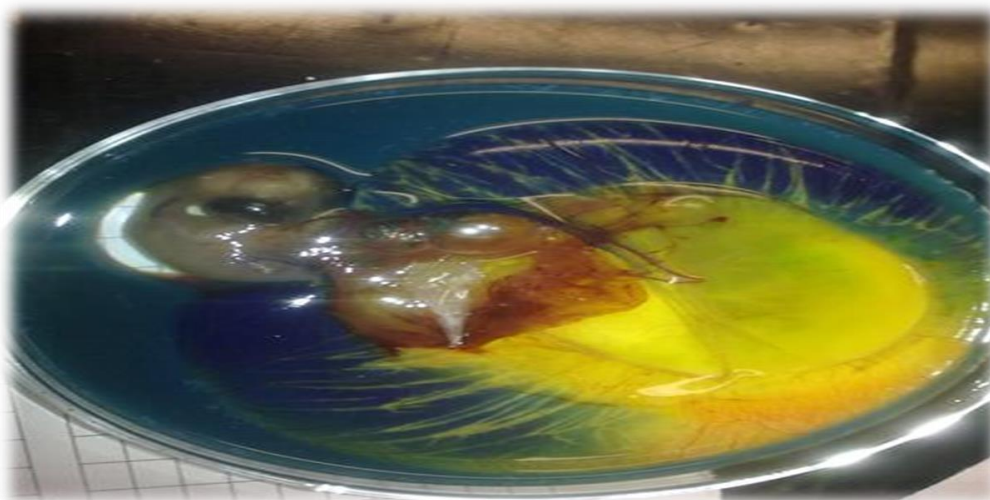
REFERENCIAS

1. Lorraine smith a. principles of microbiology. 8a ed. USA: editorial Mosby: 1981.pp 392-399.
2. Ketchum P.A. Microbiology. USA: editorial wilwy & sons. 1988. pp 431-513
3. Bayley and Scott's. Diagnostic microbiology. 7a ed. USA: Editorial Mosby. (1986). pp 234-495.
4. Mims P. Microbiología médica. España: editorial Mosby. 1995. pp 1.6-24.9
5. Brooks G. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª ed. México: Editorial El Manual Moderno. 2002.
6. Douglas, J. Bacteriófagos. España (Barcelona): Ediciones Omega. 1978.
7. Madigan M.T., Martinko J. M. Biología de los microorganismos. 10ª ed. España (Madrid): Editorial Pearson Educación, 2004.
8. Murray P. Microbiología Médica. 4ª ed. España: Editorial Mosby, 2004.
9. https://www.youtube.com/watch?v=VcQZ2oa_8-w
10. <https://www.youtube.com/watch?v=FYRqK2rBWs4>
11. <https://www.youtube.com/watch?v=IYj2MO0hjKs>



**PRÁCTICA
NÚMERO
3**

**ESTRUCTURAS DEL EMBRIÓN DE
POLLO Y SUS VÍAS DE INOCULACIÓN**



UNIDAD 3. Virología |

INTRODUCCIÓN

Los primeros investigadores en utilizar embriones de pollo son, Rous y Murphy en 1911 que los utilizaron por primera vez, usando la membrana corioalantoidea del embrión de pollo para el estudio de los virus. En 1931 Goodpasture logró introducir el embrión de pollo para cultivar virus. Los primeros trabajos fueron para aislar e identificar al virus *influenza* y luego se extendió para estudios de otros virus y bacterias intracelulares como la *Viruela*, *Herpes simplex*, *Rickettsias* y *Chlamidias*. Por lo que el embrión de pollo es uno de los métodos más antiguos y eficientes, para cultivar virus, y otros microorganismos intracelulares.

Esta técnica es útil para el aislamiento e identificación de agentes etiológicos de enfermedades virales.

El embrión también se utiliza para cultivar virus para obtener vacunas contra; la *Rabia*, el *Newcastle* o la *Influenza*.

Por todo lo anterior se hace indispensable conocer las partes de un embrión de pollo y sus vías de inoculación.

MEMBRANA	VIRUS	SIGNOS DE CRECIMIENTO
Saco vitelino	Herpes simple	Muerte
Coriolantoies	Herpes simple Poxvirus Sarcoma de Rous Varicela	Muerte Pústulas Pústulas
Alantoides	Influenza	Hemaglutinación
Amniótica	Parotiditis Virus de la gripe	Muerte

Cuadro 3.1 Relación de infecciones virales y la vía de inoculación

OBJETIVOS:

1. Adquirir el conocimiento para el correcto manejo de la técnica de inoculación de embrión de pollo por las vías más utilizadas.
2. El alumno conocerá las diversas partes del embrión de pollo de 9 días de incubación.

MATERIAL POR EQUIPO:

- ✓ Un ovoscopio.
- ✓ Cinco embriones de pollo de 9 a 10 días.
- ✓ Algodón, 100 g
- ✓ Cinco jeringas de un mL
- ✓ Cuatro agujas del número 27.
- ✓ Una aguja del número 22 larga.
- ✓ Azul de metileno, 10 mL
- ✓ Un lápiz de número 2.
- ✓ Pinzas de disección.
- ✓ Cinco cajas de Petri.

MÉTODO

A. Estructura Normal:

1. Transilumine con el ovoscopio el embrión de pollo, identificando y marcando la cámara de aire y la mancha ocular.
2. Corte el cascarón a la altura de la cámara de aire, procurando que no queden bordes filosos.
3. Deposite el contenido del embrión en una caja de Petri.
4. Proceda a identificar las estructuras del embrión de pollo de 9 días.

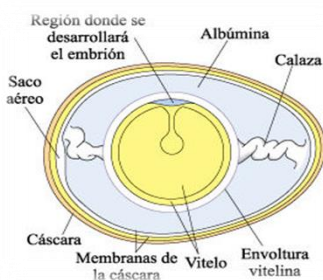


Figura.3.1 Partes del huevo

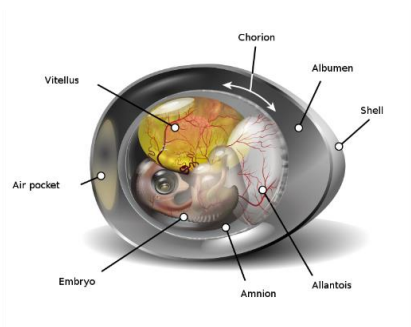


Figura.3.1 Partes del embrión de pollo

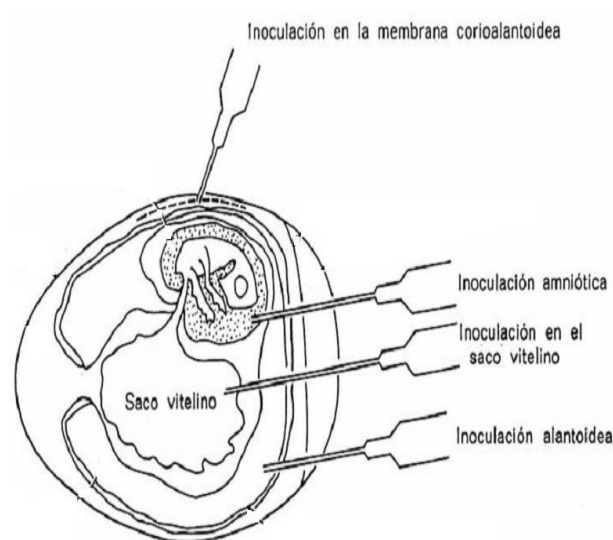


Figura 3.2 Vías de inoculación del embrión de pollo.

B. Inoculación de Membrana Corioalantoidea.

1. Transilumine con el ovoscopio el embrión y marcar la cámara de aire.
2. Divida imaginariamente al embrión en tres partes, al final del primer tercio señale el punto de inoculación entre los vasos sanguíneos.
3. Perfore sobre la cámara de aire y el punto de inoculación.
4. Succione con una boquilla por el orificio de la cámara de aire. Se debe formar una cámara de más menos un cm de diámetro.
5. Con una aguja del 27 corta depositar 0.1 mL del colorante.

**** Cuide de no perforar la membrana corioalantoidea ****



3. Perfore los puntos marcados e inocule 0.1 mL del colorante con una aguja del 27 corta.
4. La inoculación se puede realizar también a través de la cámara de aire con una aguja del 22 larga.



C. Inoculación en Saco Vitelino.

1. Transilumine con el ovoscopio el embrión y marque la cámara de aire.
2. Coloque el embrión en plano horizontal y localice el saco vitelino (mancha oscura y densa).
3. Introduzca una aguja del 22 larga verticalmente a través de la cámara de aire y depositar 0.1 mL de colorante.

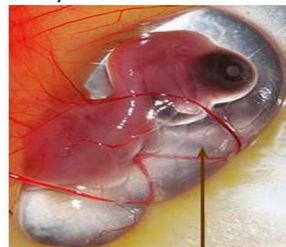


D. Inoculación de la Cavidad Alantoidea.

1. Transilumine con el ovoscopio el embrión y marque la cámara de aire y marcar un punto en la cima.
2. Aproximadamente 5 mm por abajo de la cámara de aire localice una zona libre de vasos y del lado opuesto al embrión marque el punto de inoculación.

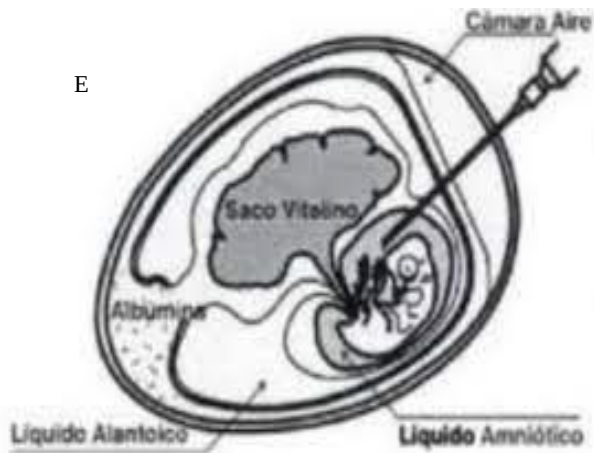
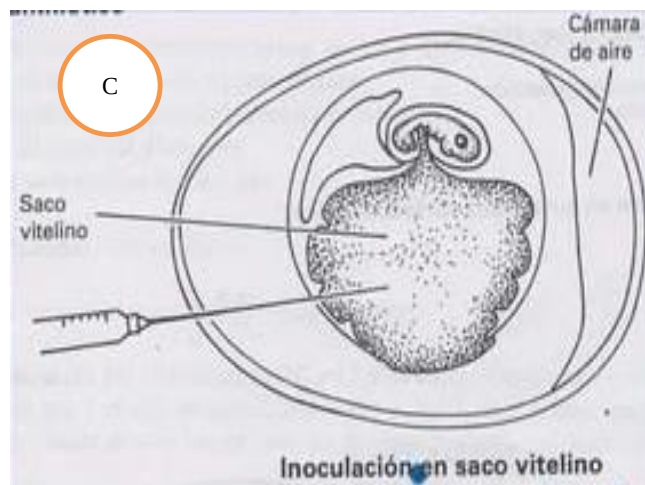
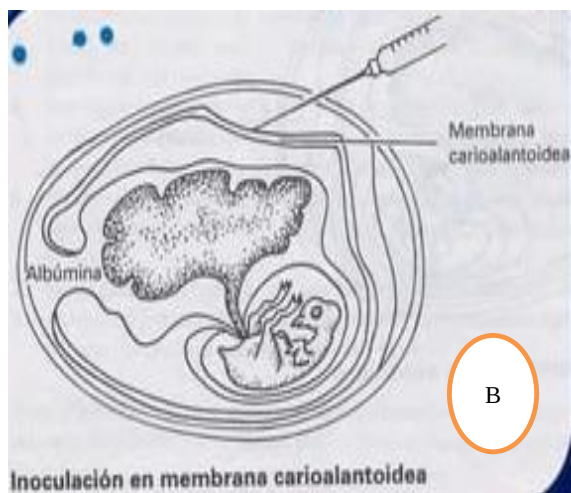
E. Inoculación en Cavidad Amniótica.

1. Transilumine con el ovoscopio el embrión y marcar la cámara de aire y marcar un punto en la cima.
2. Marque el punto de inoculación exactamente donde se ve el embrión (localice las manchas oculares).
3. Ilumine el embrión e inocule con la aguja del 22, 0.1 mL del colorante.



NOTAS:

1. Después de cada inoculación ilumine al embrión y haga sus observaciones.
2. Después de cada inoculación vacíe el embrión en una caja de Petri y haga sus observaciones.



CUESTIONARIO

1. ¿Qué otros tipos de cultivos se cuentan para desarrollar virus?
2. ¿Qué ventajas o desventajas tiene el uso de un embrión de pollo?
3. ¿Qué tipos de virus se pueden inocular en cada una de las partes del embrión de pollo?
4. ¿Qué efectos causa la inoculación de un virus en un embrión de pollo?
5. Esquematizar y explicar los ciclos de replicación viral.

REFERENCIAS

1. Stuart-Harris C, Shild Gc, Oxford Js. Influenza: the viruses and the disease. London: Editorial Arnold London, 2^a Ed, 1985.
2. Kendal AP, Cate TR. Increases sensitivity and reduced specificity of hemagglutination inhibition tests with ether treated influenza b/ Singapore/222/79 J Clin Microbiol 1983; 18: 930-934.
3. Harmon MW, Rota PA, Walls HH, Kendal AP. Antibody responses in human to influenza type b host cell derived variant following vaccination with standard (eggs-derived) vaccine or natural infection. J Clin Microbiol 1988;26: 333-337.
4. Rota PA, Regnery HC, Kendal AP. Influenza viruses. In Rose Nr, Friedman H, Fahey JI. (Eds.): Manual clinical immunology. 4^a. Ed. Washinton D.C: American Society For Microbiology: 1992.
5. https://www.youtube.com/watch?v=Pe_dajVADLGw
6. <https://www.youtube.com/watch?v=330DKCuNm4Q&t=2s>
7. <https://www.youtube.com/watch?v=JsDcYiNJ02I&t=2s>

