



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Carrera de Cirujano Dentista

Área Biológica

**Manual de prácticas de laboratorio del
Módulo Introducción al Proceso Salud –
Enfermedad, Nutrición, Metabolismo y
Bases Farmacológicas**

Fecha de aprobación por el CAC:

08 de Marzo de 2019.

Vigencia: **08/03/2019-08/03/2021**



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	2/218

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO SALUD – ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Revisión y actualización 2016.

Profesores participantes

C.D. Axeel Becerril Ramírez

C.D. Diana María Buendía Martínez

C.D. Niria Rebeca Castro Rico

C.D. Yolanda García Méndez

C.D. Fabiola Adriana Hernández Alonso

I.Q. Francisco Hernández Hernández

Mtra. Beatriz Hernández Monjaraz

Dr. Edgar Ledesma Martínez

Mtro. Tomás Zepeda Muñoz



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	3/218

Revisión y actualización noviembre 2018 – febrero 2019.

Profesores participantes

Mtro. Ulises Arellano García

C.D. Axeel Becerril Ramírez

Dra. Marta Elena Castro Manreza

C.D. Niria Rebeca Castro Rico

C.D. Diana María Buendía Martínez

C.D. Yolanda García Méndez

C.D. Fabiola Adriana Hernández Alonso

I.Q. Francisco Hernández Hernández

Mtra. Beatriz Hernández Monjaraz

Mtro. Tomás Zepeda Muñoz



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	4/218

ÍNDICE

1. Introducción	5
2. Objetivo	6
3. Contenido	
• Práctica 1 Manejo del Microscopio	7
• Práctica 2 Estructura bacteriana	20
• Práctica 3 Cultivo de bacterias	36
• Práctica 4 Metabolismo microbiano	53
• Práctica 5 Demostración de la actividad de la lisozima como mecanismo de defensa inespecífico	67
• Práctica 6 Fagocitosis	75
• Práctica 7 Reacción de aglutinación	80
• Práctica 8 Determinación del número de bacterias presentes en saliva	86
• Práctica 9 Formación de Biopelícula dental “ <i>in vitro</i> ”	94
• Práctica 10 Aislamiento de microorganismos de la biopelícula dental	102
• Práctica 11 Identificación de algunos factores de riesgo para caries dental	109
• Práctica 12 Determinación de la acción bacteriostática y bactericida de algunos agentes desinfectantes	119
• Práctica 13 Estructura eucariótica de hongos y parásitos	127
• Práctica 14 Manejo de material de vidrio en el laboratorio	140
• Práctica 15 Manejo del equipo de laboratorio	150
• Práctica 16 Capacidad amortiguadora de la saliva	162
• Práctica 17 Retención de azúcares reductores en la boca	168
• Práctica 18 Identificación de aminoácidos constituyentes de la colágena	175



MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	5/218

- Práctica 19 Actividad de la amilasa salival 181
- Práctica 20 Identificación de proteínas en diente 188
- Práctica 21 Determinación de carbohidratos en diente 196
- Práctica 22 Determinación de fósforo en diente 203
- Práctica 23 Determinación de calcio en diente 209
- Práctica 24 Determinación de urea en saliva

4. Criterios de evaluación 218
5. Reglamento de laboratorio 220
6. Manejo de residuos 218

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	6/218

INTRODUCCIÓN

El sistema de enseñanza que se lleva a cabo en la FES Zaragoza es modular, cuyo objetivo es que los profesionales se comprometan con la solución de problemas de la sociedad. Para tal meta, es necesario actuar a tres niveles: investigación (producto del conocimiento de las necesidades sociales), docencia (comunicación y confrontación práctica del conocimiento) y servicio (aplicación social de tales conocimientos) (Padilla 2012. p.73).

El sistema modular incorpora la interdisciplina y la aplicación del conocimiento a un objeto de estudio. Entonces, este objeto de estudio será abordado conjugando diversas ciencias y técnicas con la finalidad de dar salida al problema planteado, lo cual implica que debe existir una relación entre la teoría y la práctica.

Para poder lograr la producción de conocimientos, es fundamental, buscar la información a través de experimentos y la producción de conceptos desde los productos teóricos-ideológicos existentes. Actividades que integran teoría y praxis (UAM-X, 1994). Por lo tanto, esta modalidad de trabajo facilita la vinculación de la teoría con la práctica, así como compartir, profundizar y enriquecer la experiencia personal y grupal (Guajardo 1994, p 9).

Dentro del primer año de la Carrera de Cirujano Dentista de la FES Zaragoza, existe el Módulo Introducción al Proceso Salud-Enfermedad, Nutrición, Metabolismo y Bases Farmacológicas conformado por tres horas teóricas en donde se abordan temas generales de Microbiología, Bioquímica, Inmunología y Farmacología; así como dos horas prácticas.

Las horas prácticas se llevan a cabo durante el primer semestre en el laboratorio de Microbiología y en el segundo semestre dentro del laboratorio de Bioquímica. La primera parte cuenta con 13 prácticas y la segunda con 10, para hacer un total de 23 prácticas, las cuales están relacionadas directamente con los contenidos teóricos del módulo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	7/218

Este manual contiene las prácticas del módulo a fin de servir como una guía para que los estudiantes logren la vinculación de la teoría con la práctica para la producción y comprobación de su propio conocimiento. Además de los protocolos de prácticas, también contiene el objetivo del manual, el reglamento de cada uno de los laboratorios, así como el sistema de evaluación de la parte práctica del módulo.

Cada uno de los protocolos de prácticas se encuentra integrado por un objetivo, fundamento teórico, material y reactivo, equipo, servicios necesarios, procedimiento, guía de interpretación de resultados con un cuestionario y bibliografía que pueden consultar como apoyo para la integración de su reporte de práctica.

OBJETIVO

Dirigir al alumno a la aplicación de los conocimientos adquiridos en el componente teórico del módulo Introducción al Proceso Salud-Enfermedad Nutrición Metabolismo y Bases Farmacológicas, proporcionando los elementos para que el Cirujano Dentista en formación, relacione el proceso salud-enfermedad en cavidad bucal con los mecanismos inmunológicos de defensa contra microorganismos, entendiendo los procesos bioquímicos que se llevan en cavidad bucal y en la estructura dental mediante la implementación de prácticas que permitan demostrar los fenómenos ocurrido en cavidad bucal e interpretar los resultados orientándolos a aspectos relacionados con su práctica profesional.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	8/218

PRÁCTICA 1

MANEJO DEL MICROSCOPIO

OBJETIVO

Que el alumno conozca las partes del microscopio, su función, manejo y cuidados para conservarlo en las mejores condiciones de trabajo y así lograr el mayor provecho de sus prácticas de laboratorio.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Para llevar a cabo las prácticas del laboratorio de microbiología, se requiere de la observación de microorganismos y dado que éstos no se observan a simple vista, es necesario el uso del equipo adecuado, en este caso, el microscopio como apoyo para la identificación y comprensión de los objetivos planteados para cada una de las mismas.

El microscopio es el instrumento más utilizado y fundamental en el Laboratorio de Microbiología puesto que proporciona la amplificación gracias a la cual el hombre es capaz de ver organismos y estructuras que a simple vista son invisibles.

Se dispone de microscopios que permiten amplias escalas de aumento; se cuenta también con varios tipos de microscopios y se han ideado muchas técnicas por las cuales las muestras de microorganismos se preparan para el examen con máximo detalle.

Cada tipo de microscopio y cada método de preparar las muestras ofrecen alguna ventaja para demostrar algunos aspectos morfológicos.

Existen microscopios simples, que emplean una sola lente y microscopios compuestos, que utilizan dos o más lentes. El alumno utilizará un microscopio compuesto, por lo que se dará una descripción de éste. (Figura 1)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	9/218

Consta de varios sistemas:

1. Sistema de soporte
2. Sistema óptico
3. Sistema de ajuste
4. Sistema de iluminación

1. Sistema de soporte

1.1 Brazo

Es la parte del microscopio utilizada para transportarlo. Se sostiene con la mano izquierda y por el pie con la mano derecha.

1.2 Tubo de Microscopio

Comunica y sostiene el ocular con el revólver. Se desplaza en forma vertical por medio de dos tornillos: el macrométrico y el micrométrico.

1.3 Revólver

Se comunica con el tubo del microscopio y sostiene los objetivos: Es una pieza giratoria para seleccionar el objetivo y colocarlo en una posición vertical respecto al ocular. Generalmente contiene 3 a 4 objetivos.

1.4 Platina

Es la parte donde se coloca la preparación a observar; puede tener pinzas para sostener el porta objeto o bien un carro que se maneja con un tornillo que permite el desplazamiento hacia arriba y abajo y otro tornillo que desliza a la derecha e izquierda.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	10/218

1.5 Pie

Sostiene al microscopio

2. Sistema óptico

La claridad con la que se puede ver un objeto pequeño, la determinan dos características: el aumento y el poder de resolución. El aumento es la diferencia entre el tamaño de la imagen vista con el microscopio y el tamaño real del objeto. Los mejores microscopios ópticos normalmente amplían un objeto más de 1000 veces. La resolución o poder de resolución, es la capacidad para distinguir detalles finos en una imagen; se define como la distancia mínima entre dos puntos a la cual ambos se pueden ver separados y no como un único punto borroso. El poder de resolución depende de la calidad de las lentes y de la longitud de onda de la luz de iluminación. Mientras más pequeña es la longitud de onda, la resolución aumenta.

El microscopio compuesto, consta de dos sistemas de lentes:

2.1 Ocular

Está formado por un sistema de lentes, que aumenta la imagen producida por el objetivo. Está situado cerca del ojo del observador y lleva grabado el aumento que proporciona. Algunos microscopios son monoculares y otros binoculares.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	11/218

2.2 Objetivos

La resolución del microscopio, dependerá solo del objetivo. Son cuatro las clases de objetivos generalmente usados:

2.2.1 Objetivo 5X (lupa).

Es el objetivo explorador, se utiliza una visión de conjunto y para localizar estructuras grandes.

2.2.2 Objetivo 10X (seco débil).

También se llama seco débil. El área observada disminuye pero la amplificación es mayor. Se utiliza de preferencia para observar células o tejidos o bien para localizar estructuras más fácilmente y llevarlas al centro del campo para enfocarlas con el siguiente objetivo.

2.2.3 Objetivo 40X (seco fuerte).

También se conoce como seco fuerte. Se obtiene un mayor aumento y el campo se reduce, observándose los detalles de la estructura enfocada.

2.2.4 Objetivo 100x (de inmersión).

Conocido como objetivo de inmersión, ya que para su uso es necesario colocar a la preparación aceite de inmersión. Con este objetivo se obtiene una imagen más definida y más grande.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	12/218

Estas dos lentes, el ocular y el objetivo, están separadas por un tubo a una distancia tal que el ocular amplifica la imagen producida por el objetivo.

La amplificación total de un microscopio, es el producto del aumento que da el objetivo (con el que se observa), y el del ocular. Así la amplificación total de los objetivos 5X, 10X, 40X y 100X y con el ocular 10X, será de 50, 100, 400 y 1000 veces respectivamente.

Por ejemplo una célula o estructura que mide 6 micras al observarla con los diferentes objetivos tendremos que:

Lupa (5X) x ocular (3X ó 5X) x 6 micras = **150 micras**.

Seco débil (10X) x ocular (5X) x 6 micras = **300 micras**.

Seco fuerte (40X) x ocular (5X) x 6 micras = **1200 micras**.

De inmersión (100X) x ocular (5X) x 6 micras = **3000 micras = 3 mm**.

Como se demuestra el incremento de la imagen ya permite al ojo humano observar detalles en la estructura microscópica.

3. Sistema de ajuste

Está constituido por dos tornillos: el macrométrico y el micrométrico

3.1 Tornillo macrométrico

Permite el desplazamiento rápido y vertical del tubo del microscopio. Se localiza debajo de la platina. Se utiliza para hacer el ajuste grueso de la imagen que se desea observar.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	13/218

3.2 Tornillo micrométrico

Puede estar localizado debajo del tornillo macrométrico o ser la parte central de éste. Permite el desplazamiento lento y vertical del tubo del microscopio hasta que la imagen se aclara y queda bien definida. Se utiliza para obtener un ajuste preciso y enfocar los diferentes planos de la estructura observada.

4. Sistema de iluminación

Consta de tres partes: la lámpara, el condensador y el diafragma.

4.1 Lámpara

Consta de un foco cuya intensidad luminosa puede regularse por medio de un transformador o bien ser constante.

4.2 Condensador

En su estructura presenta un sistema de lentes que sirven para concentrar los rayos luminosos en el campo de observación.

4.3 Diafragma

Situado en la parte inferior del condensador. Está compuesto de laminillas metálicas que se abren o se cierran para regular la cantidad de luz necesaria a la observación y así lograr una imagen más definida.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	14/218

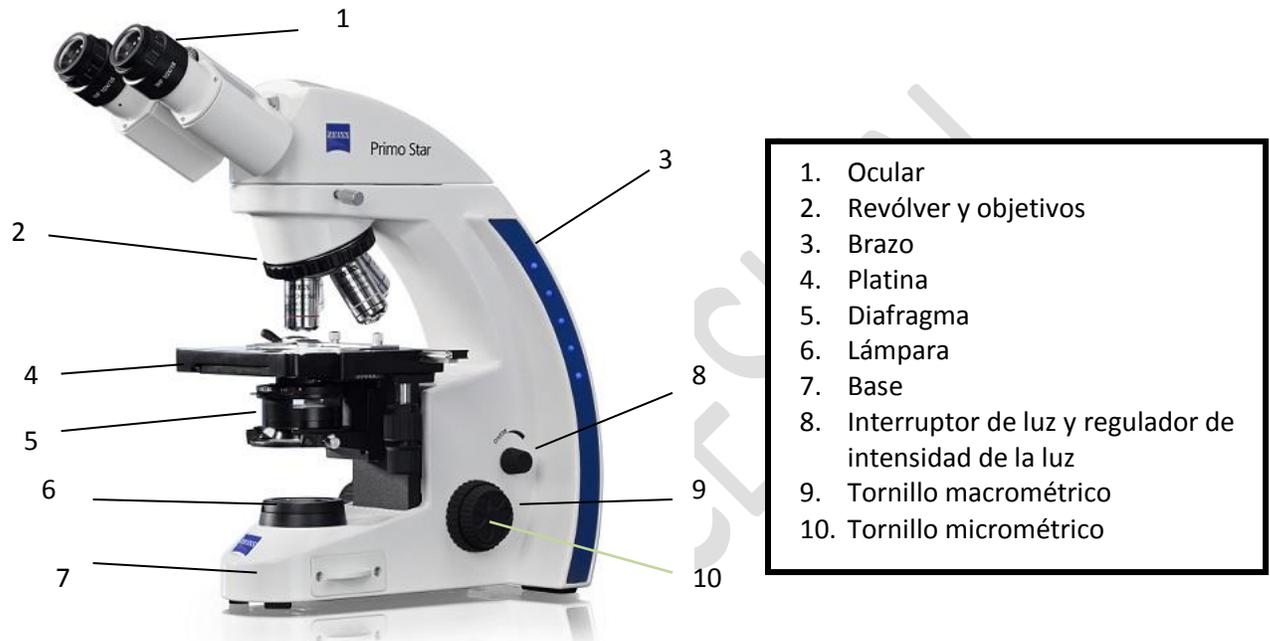


Figura 1. Esquematización de las partes del microscopio compuesto.

Técnica para observar al microscopio.

1. Colocar la preparación en la platina
2. Ver lateralmente para bajar el tubo del microscopio con el tornillo macrométrico cerca de la preparación y utilizar el objetivo de menor aumento.
3. Observando por el ocular, subir el tubo del microscopio hasta localizar el objeto de observación con el macrométrico
4. Mover lentamente el micrométrico, para precisar la imagen
5. Girar el revólver para colocar el objetivo seco fuerte, observar por el ocular y detallar la imagen con el tornillo micrométrico.
6. Para observar con el objetivo 100X o de inmersión, seguir los pasos siguientes:
 - a) Después de observar con seco fuerte (40X), gire el revólver para colocar el objetivo de inmersión y antes de concluir esta operación, colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación.
 - b) Bajar el tubo del microscopio usando el tornillo macrométrico observando del lado hasta que el objetivo entre en contacto con el aceite de inmersión y posteriormente se ajuste el enfoque por medio del tornillo micrométrico.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	15/218

Cuidados del microscopio

Para una mejor observación, se requiere mantener al microscopio en perfectas condiciones mecánicas, limpio y manejarlo correctamente. Para lograr esto, hay que tener en cuenta las siguientes indicaciones:

1. Si no está en uso, debe mantenerse en su estuche o funda protectora
2. Debe alejarse de la acción de ácidos y líquidos corrosivos.
3. Debe transportarse con cuidado en forma vertical y por medio del brazo y de preferencia colocando la otra mano debajo del pie.
4. Limpiarlo antes y después de usarlo, para el caso de las lentes, utilizar papel seda.
5. Al terminar la observación, colocar el objetivo de menor aumento y guardar el microscopio en su estuche o cubrirlo con su funda.

MATERIAL

- 1 Microscopio óptico
- 1 Preparación de frotis sanguíneo
- 2 Preparaciones de frotis de microorganismos
- 1 Preparación de letras de papel periódico
- 1 Preparación de parásito
- Aceite de inmersión
- Papel seda

EQUIPO

- Microscopio

SERVICIOS

- Agua y luz



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	16/218

PROCEDIMIENTO

1. Bajo la supervisión del profesor, adiestrarse en el conocimiento del microscopio haciendo un repaso y reconocimiento de las partes del microscopio, identificando su manejo.
2. Enfocar a seco débil, seco fuerte e inmersión, las preparaciones proporcionadas
3. Después de utilizar el microscopio entregarlo al laboratorio considerando los cuidados necesarios.

RESULTADOS

Reportar los resultados obtenidos y hacer dos esquemas de cada una de las observaciones realizadas con el microscopio: una que demuestre lo observado con el objetivo 40X o seco fuerte y la otra con el objetivo de 100X u objetivo de inmersión.

BAJO CONFECCIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	17/218

RESULTADOS





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	18/218

CUESTIONARIO

1. Defina índice de refracción.
2. ¿Cuál es la función del aceite cuando se usa el objetivo de inmersión?
3. ¿Con cuál de los objetivos hizo una mejor observación?
4. ¿Qué aplicaciones se obtienen con el microscopio de luz?
5. Explique que es el poder de resolución de un microscopio



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	19/218

- ¿Cómo se determina el grado de amplificación?; determínelo con cada uno de los objetivos que utilizó.
- ¿Cuál es la diferencia entre resolución y aumento?
- ¿Qué aplicación puede darle el odontólogo al microscopio en el consultorio dental?

BIBLIOGRAFÍA

- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología médica. Jawetz, Melnick y Adelberg. 25ª ed. México: Mc Graw Hill; 2010.
- Freeman BA. Microbiología de Burrows. 22ª ed. México: Interamericana; 1986.
- Carpenter PL. Microbiología. 4ª ed. México: Interamericana; 1996.
- García-Rodríguez JA, Picazo JJ. Compendio de microbiología médica. Madrid: Harcourt Brace; 2000.
- Elemer W, Koneman MD. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2001.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	20/218

PRÁCTICA 2

ESTRUCTURA BACTERIANA

OBJETIVO

Identificar algunos elementos estructurales de bacterias presentes en cavidad bucal, reconociendo que no todas las bacterias son morfológicamente iguales.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias son microorganismos procariotas que pueden producir alteraciones a nivel sistémico y en cavidad bucal; se nutren principalmente por absorción, y su tipo de organización es unicelular pudiendo formar colonias.

En la célula procariota el material genético, usualmente una fibra única de DNA se encuentra libre en el citoplasma y no presenta organelos del tipo de las mitocondrias o los cloroplastos. La membrana citoplasmática se continúa en muchas bacterias hacia el interior del protoplasto (membrana intracitoplasmática).

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico, aunado a ello la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea imposibilita su visualización a menos que se aumente el contraste mediante la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células bacterianas o para revelar la presencia de determinados constituyentes estructurales como: flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

Cápsula

Cubierta estructural altamente viscosa y firmemente adherida a la pared celular de ciertas especies bacterianas, ***Streptococcus salivarius***, produce una cápsula de polisacáridos. La cápsula protege al microorganismo de la desecación y de la fagocitosis, además puede proporcionarle la capacidad de adherirse a las superficies, ***Streptococcus mutans*** y ***Streptococcus sanguis***, forman un material muy parecido a la cápsula en presencia de sacarosa que permite que se adhiera a la superficie dental e inicien la formación de la placa microbiana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	21/218

Pili

También denominados fimbrias (del latín flecos). Estructura muy pequeña y delgada, rígida, recta, constituida por una proteína llamada pilina. Varía en número; se asocia principalmente con bacterias Gram negativas, móviles e inmóviles. Participa en la conjugación en el paso de información genética

Flagelos

Son filamentos protéicos delicados, largos y ondulados, sirven para el movimiento bacteriano. Se originan de la membrana citoplásmica y poseen un cuerpo basal localizado en la membrana y pared celular.

Los organismos se pueden clasificar según la localización de sus flagelos:

- 1) **Polar:** Localizados en uno o en ambos extremos de la bacteria.
- 2) **Peritricos. (del griego trichos, pelo)** Localizados en toda la superficie del organismo.

Pared celular

Es una estructura rígida, responsable de dar forma a la bacteria y proteger a la membrana plasmática de la presión osmótica intracelular y del medio. Todas las bacterias al ser despojadas de la pared, toman una forma esférica y se llaman protoplastos. **Ver tabla I**

Pared celular	Gram positiva	Gram negativa
Complejidad	menor	mayor
Lípidos	0-2 %	10- 20 %
Polisacáridos	35-60 %	15-20 %
Ácidos teicoicos	+	-
Lipopolisacàridos	-	+

Tabla I Diferencias entre la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	22/218

Membrana plasmática

Es la estructura más externa de la porción viva de la célula; constituida por fosfolípidos y proteínas. Presenta selectividad y controla el paso de nutrientes y productos de desecho entre el medio y el citoplasma. Algunas enzimas respiratorias y oxidativas están asociadas con la membrana, además de las enzimas que sintetizan la pared celular.

Citoplasma

Es el material viviente de la célula constituido principalmente por agua. En células jóvenes aparece homogéneo, en viejas es granular. En él se encuentran mesosomas, ribosomas, gránulos y material nuclear que se encuentran incluidos en una matriz que contiene iones, aminoácidos y proteínas, entre otros.

Mesosomas

Son invaginaciones de la membrana citoplasmática; sirven para dar sostén al material nuclear para su síntesis. Los mesosomas laterales tienen funciones excretoras y secretoras. Pueden presentar forma vesicular, concéntrica o lamelar.

Ribosomas

Son complejos articulados de proteínas y RNA (ácido ribonucleico). Responsables de la síntesis de proteínas. En las células bacterianas, se pueden disociar en subunidades 50S y 30S (grandes y pequeñas respectivamente).

Material genético

El DNA en forma de cromatina se encuentra disperso en el citoplasma. Algunas bacterias pueden tener material extracromosómico en forma de plásmidos.

Endosporas

Algunos géneros bacterianos (*Clostridium* y *Bacillus*), producen en su interior formas de resistencia denominadas endosporas. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.) formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la Célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	23/218

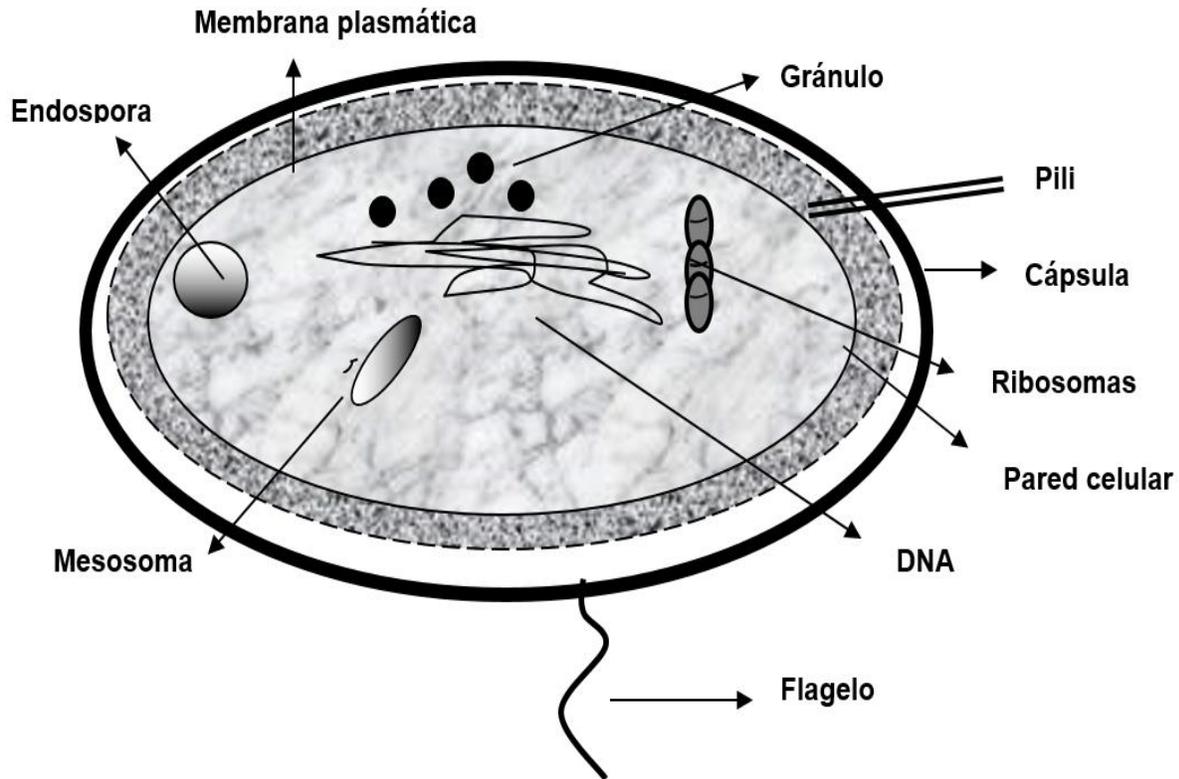


Figura 1. Estructura bacteriana tipo.

Tinciones

Las bacterias son incoloras y refringentes de tal manera que se necesita el uso de tinciones para observarlas al microscopio de luz. Los colorantes además de tener la propiedad de impartir color, deben ser resistentes a la luz y al lavado, así como también la propiedad de unirse a un material por medio de una reacción química o depositarse sobre dicho material.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	24/218

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente (ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos).

Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente (proteínas).

Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de depósitos de grasa.

En el laboratorio, suelen utilizarse dos tipos de tinciones para estudiar la estructura de los microorganismos:

- Tinciones simples. son aquellas que utilizan un solo colorante, con objeto de distinguir únicamente la forma del organismo.
- Tinciones diferenciales o compuestas. son las que ponen de manifiesto diferencias entre las células bacterianas o partes de una célula bacteriana.

La retención de determinados colorantes por las bacterias depende grandemente de la estructura celular de la bacteria, principalmente de la pared celular.

En la técnica de tinción de Gram, se utilizan dos colorantes, por tanto, es un método de tinción diferencial; esta técnica, divide a las bacterias en dos grandes grupos (**Tabla II**): las bacterias Gram negativas, que toman el colorante de contraste que es la safranina y las bacterias Gram positivas, que toman el colorante primario, el cristal violeta. Esta técnica se considera una tinción diferencial.

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	25/218

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
<i>Actinomyces israelii</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Corinebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium matruchotii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Nocardia spp</i> <i>Peptococcus spp</i> <i>Peptostreptococcus spp</i> <i>Propionibacterium acné</i> <i>Rothia dentocariosa</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Bacteroides oralis</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Porphyromona gingivalis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Vellonella alkaliscens</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Neisseria spp</i>

Tabla II. Microorganismos Gram positivos y Gram negativos de mayor importancia en cavidad bucal.

El procedimiento de la tinción de Gram se inicia con la tinción de las células bacterianas previamente fijadas al calor, con el colorante básico, cristal violeta. Posteriormente, la adición de lugol genera un precipitado con el cristal violeta, que está en gran parte aislado en la malla de peptidoglicano de la pared bacteriana. El lavado con alcohol/acetona, extrae los lípidos de la pared celular de la célula Gram (-), aumentando la porosidad lo que permite que el pp sea eliminado; por el contrario, el peptidoglicano de la célula Gram (+) intacta, retiene el precipitado dentro de la célula. Finalmente, la tinción de contraste permite visualizar las bacterias Gram (-) que perdieron el colorante primario, usando safranina o también fucsina como colorante secundario.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	26/218

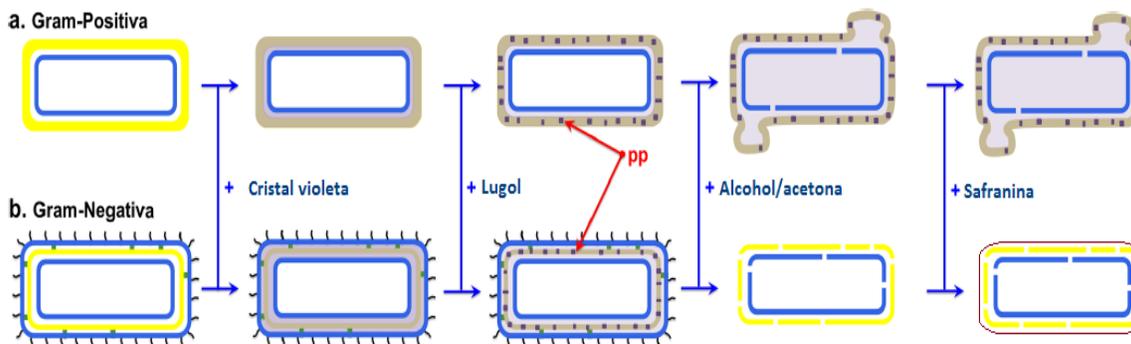


Figura 2. Esquema del mecanismo molecular del protocolo de tinción de Gram para secciones transversales de bacterias Gram (+) y Gram (-). Tomado y modificado de Wilhelm et al., 2015.

MATERIALES Y REACTIVOS

Cepas bacterianas:

Bacillus anthrax
Bacillus subtilis
Corynebacterium sp
Klebsiella pneumoniae
Staphylococcus aureus
Streptococcus mutans

Colorantes:

Alcohol-acetona
Colorante de Albert
Cristal violeta
Fucsina
Lugol (Yodo de Gram)
Mordiente de cápsula
Mordiente de Knaysi
Rojo congo
Safranina al 0.5 %
Tinta china
Verde de malaquita al 5 %



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	27/218

Material

Portaobjetos
Cubreobjetos
Asa bacteriológica
Aplicador
Mechero bunsen
Pinzas de disección

EQUIPO

Microscopio
Refrigerador

SERVICIOS

Electricidad, Agua corriente, gas.

PROCEDIMIENTO

Preparación del frotis para tinción de Gram

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de ***Klebsiella pneumoniae***.
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y repetir el procedimiento con ***Staphylococcus aureus*** y colocarlo en la misma gota de agua con muestra de ***Klebsiella pneumoniae*** con el fin de realizar una mezcla bacteriana de Gram (+) y Gram (-).
5. Esterilizar el asa al terminar.
6. Fijar el frotis por calor directo, pasando el portaobjetos por la flama del mechero 2 o 3 veces (sin calentar mucho).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	28/218

Tinción de Gram

1. Agregar **crystal violeta** al portaobjetos de manera que el frotis se cubra perfectamente y dejar actuar por 60 segundos.
2. Lavar con agua de la llave, procurando que no pegue de lleno el agua sobre la preparación.
3. Agregar **Lugol** a la preparación y dejar actuar por 60 segundos.
4. Lavar con agua corriente, retirar el exceso de agua agitando el portaobjetos.
5. Agregar **alcohol – acetona** a la preparación y dejar actuar por 30 segundos.
6. Lavar con agua corriente y retirar el exceso de agua agitando el portaobjetos.
7. Colocar **safranina** cubriendo completamente la preparación por 30 segundos.
8. Lavar con agua corriente, retirar el exceso de agua agitando el portaobjetos y secar al aire.
9. Colocar el portaobjetos en el microscopio y ubicar la preparación a 10x y 40x.
10. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar a 100x.
11. Bacterias de color azul se consideran Gram (+), bacterias de color rosa/rojo se consideran Gram (-)

Demostración de cápsula

Método de tinta china – frotis húmedo

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado coloque 1 gota de agua.
2. Trabajando cerca del mechero, esterilizar el asa bacteriológica por calor directo y tomar una muestra de ***Klebsiella pneumoniae***, haciendo una suspensión .
3. Colocar a un lado, una gota de tinta china.
4. Homogenizar con el asa, y esterilizar, colocar encima un cubreobjetos y presionar con un fragmento de papel secante.
Si el cubreobjetos no es presionado suficientemente, los microorganismos tienden a ser conducidos a todas direcciones por la tinta y pueden ser enmascarados por las capas de tinta, si se presiona demasiado, las cápsulas pueden distorsionarse.
5. Observar en los objetivos 10x, 40x y colocar una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y observar a 100x.
6. Las cápsulas aparecen como zonas claras entre el contorno de las células y el fondo oscuro.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	29/218

Método de rojo congo

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado coloque 1 gota de colorante rojo congo
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar el asa bacteriológica por calor directo y tomar una muestra de *Klebsiella pneumoniae*, haciendo una suspensión y posteriormente esterilizar el asa bacteriológica.
3. Adicionar mordiente de cápsula y dejar actuar por 1 minuto.
4. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire
5. Observar en los objetivos de 10x, 40x y colocar una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y observar a 100x.
6. Las cápsulas aparecen como una zona clara entre el contorno de la bacteria de color rojo en un campo azul oscuro.

Demostración de pared celular

Técnica de Knaysi

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de *Bacillus ánthrax*.
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica
5. Fijar por calor directo la preparación pasando el portaobjetos por la flama del mechero 2 o 3 veces (sin calentar mucho).
6. Colocar mordiente de Knaysi durante 10 minutos.
7. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
8. Colocar una gota de fucsina e inmediatamente colocar un cubre objetos, procurando la no formación de burbujas de aire.
9. Observar la preparación a 10x, 40x
10. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y observar a 100x.
11. La pared se observa brillante bien delimitada alrededor de la bacteria.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	30/218

Demostración de gránulos metacromáticos

Técnica de Albert

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de ***Corynebacterium sp.***
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica
5. Fijar por calor directo la preparación pasando el portaobjetos por la flama.
6. Cubrir el frotis con colorante de Albert durante 5 minutos.
7. Con la ayuda de unas pinzas de disección pasar el portaobjetos por el mechero para calentar la preparación por 30 segundos. No permita que hierva el colorante.
8. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
9. Aplicar solución de lugol durante 1 minuto.
10. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
11. Observar la preparación a 10x y 40x.
12. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar a 100x.
13. Los gránulos metacromáticos aparecen de color azul oscuro y el citoplasma verde pálido

Demostración de endosporas

Técnica de Schaeffer-Fulton

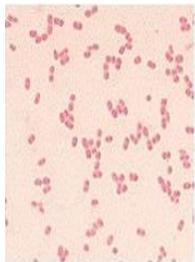
1. En un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar una pequeña gota de agua con el asa bacteriológica.
2. Trabajar cerca del mechero, esterilizar por calor directo el asa bacteriológica y tomar una muestra de ***Bacillus subtilis.***
3. Extender la muestra de bacterias/agua sobre el portaobjetos.
4. Esterilizar por calor directo el asa bacteriológica.
5. Fijar por calor directo la preparación pasando el portaobjetos por la flama.
6. Cubrir la preparación con solución verde de malaquita al 5 % y con la ayuda de una pinza de disección, calentar hasta la formación de vapores durante 1 minuto.
7. Lavar con agua corriente y agitar para retirar el exceso.
8. Adicionar solución acuosa de safranina al 0.5 % durante 30 segundos.
9. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.
10. Observar la preparación a 10x y 40x.
11. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar a 100x.
12. Las esporas se tiñen de color verde y el citoplasma rojo



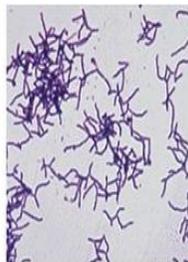
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	31/218

TINCIONES REPRESENTATIVAS

GRAM



Gram-negativo



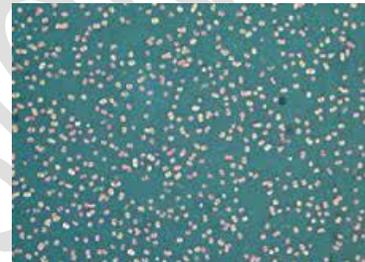
Gram-positivo

TINTA CHINA



Cápsula

ROJO CONGO



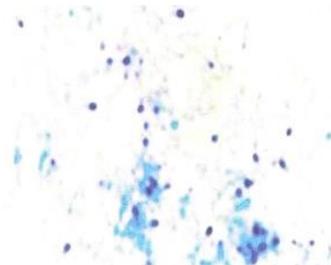
Cápsula

KNAYSI



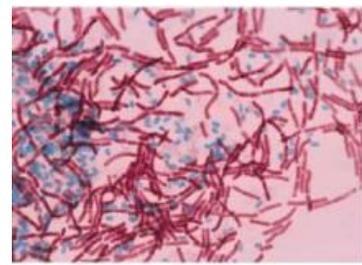
Pared celular

ALBERTS



Gránulo metacromático

SCHAEFFER-FULTON



Endosporas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	32/218

RESULTADOS

Formato para el reporte de resultados.

Demostración de Gram (+)

Klebsiella pneumoniae

Tinción de Gram

Imagen

Demostración de Gram (-)

Staphylococcus aureus

Tinción de Gram

Imagen

Demostración de cápsula

Klebsiella pneumoniae

Método de tinta china

Imagen

Método de rojo congo

Imagen



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	33/218

Demostración de pared celular

Bacillus magaterium
Técnica de Knaysi

Imagen

Demostración de gránulos metacromáticos

Corynebacterium sp.
Técnica de Albert

Imagen

Demostración de endosporas

Bacillus subtilis
Técnica de Schaeffer-Fulton

Imagen

Gram (+) y Gram (-)

K.pneumoniae y *S.aureus*
Tinción de Gram

Imagen

BAJO COMPRESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	34/218

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es un mordiente y cuál se utiliza en la técnica en la técnica de Gram?
2. Definir colorante.
3. ¿Cuál es el colorante primario utilizado en la técnica de Gram. ¿Puede ser sustituido por otro colorante?
4. ¿En qué se basa la técnica de Albert y cuál es su utilidad?
5. ¿Cuáles son las diferencias principales entre bacterias Gram (+) y Gram (-)?
6. ¿Qué estructuras son utilizadas para la identificación de una bacteria?
7. ¿Qué función tienen las esporas?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	35/218

8. ¿Qué función tienen la cápsula

9. ¿Qué función tiene la pared celular?

BIBLIOGRAFÍA

- Liébana, J. Microbiología oral. *Granada: Mc Graw Hill Interamericana*. 2002. 22-24
- Negrón, M. Microbiología estomatológica. Buenos Aires Ed. Médica Panamericana. 2000: 481-488
- Brooks, G. Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica 25a. México McGraw Hill. 2011, 11-13
- Nolte, W. A. Microbiología odontológica. México Editorial Interamericana, SA. 1971 19-46
- Wilhelm, M. J., Sheffield, J. B., Sharifian Gh, M., Wu, Y., Spahr, C., Gonella, G., ... & Dai, H. L. Gram's stain does not cross the bacterial cytoplasmic membrane. *ACS chemical biology*, 2015; 10(7), 1711-1717.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	36/218

PRÁCTICA 3

CULTIVO DE BACTERIAS

OBJETIVO

Conocer los factores de nutrición que requieren los microorganismos para su crecimiento a través diferentes medios de cultivo de acuerdo a su composición y su uso en el laboratorio, así como las diferentes técnicas de siembra de los mismos y estructura morfológica colonial.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los microorganismos incluye aquellos que pueden estar involucrados con problemas de salud, por ello es necesario conocer las características de nutrición, crecimiento y fisiología de los mismos, en esta práctica se revisarán medios de cultivo que facilitarán el crecimiento bacteriano a partir de técnicas específicas de laboratorio.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Con el objetivo de estudiar los microorganismos y determinar su relación con enfermedades infecciosas es necesario conocerlos mediante técnicas específicas de laboratorio. Para lograr esto es preciso conocer los nutrientes y las condiciones físicas que requieren, ya que muchos de los microorganismos pueden sintetizar sus componentes orgánicos a partir de fuentes de carbono simples, mientras que otros requieren de fuentes más complejas para crecer.

Existen nutrientes esenciales para los organismos que son metabolitos que no pueden sintetizar por ellos mismos y que por lo tanto tienen que provenir de fuentes externas proporcionados con los medios de cultivo.

Sólo las bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y protozoarios pueden crecer por medios de cultivo artificiales, es decir *in vitro*, mientras los virus, rickettsias, y clamidias requieren de cultivos *in vivo* (de células vivas como embrión de pollo o animales) para su crecimiento y reproducción.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	37/218

Clasificación de microorganismos

Para su estudio, los microorganismos se clasifican de acuerdo a diferentes características como tipo de nutrientes, temperatura, pH y requerimientos de oxígeno.

En el caso de su forma de nutrición, se sabe que para su crecimiento o reproducción, cada organismo requiere de diferentes nutrientes dependiendo de sus sistemas enzimáticos, por lo cual de acuerdo a su forma de nutrición se clasifican en:

- 1- Autótrofos: Viven y se multiplican en un ambiente inorgánico, poseen sistemas enzimáticos que los hacen capaces de metabolizar sustancias inorgánicas para formar sus componentes celulares. Algunos son fotosintéticos y otros quimiosintéticos.
- 2- Heterótrofos: Requieren de materia orgánica preformada para la síntesis de sus componentes celulares. Aquí se incluyen los microorganismos de la flora normal humana.
- 3- Hipótrofos: Requieren de células vivas para poder crecer, ya que han perdido los sistemas enzimáticos para reproducirse por los que son parásitos obligados.

Otro factor que influye también en el crecimiento de los microorganismos, es la **temperatura** y pueden clasificarse de acuerdo a la temperatura óptima que requieren para poder crecer en:

- a) Psicrofílicos. Son microorganismos que crecen mejor a bajas temperaturas: 10 a 15°C y 2 a 4°C.
- b) Mesofílicos. Son los microorganismos que tienen sus temperaturas óptimas de crecimiento entre 25 y 40°C. Muchos de los microorganismos mesofílicos que causan enfermedad, tienen las óptimas entre 35 y 37°C.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	38/218

- c) Termofílicos. Presentan temperaturas óptimas de crecimiento entre 50 y 60°C, no son de importancia para la salud humana, se encuentran en el suelo.
- d) Termodúricos. Son aquellos que resisten temperaturas mayores a 60°C

Finalmente, el grado de acidez o alcalinidad (referido como pH) del medio, es otro factor que también influye de manera importante en el crecimiento de los microorganismos. Muchas bacterias patógenas, crecen a un pH ligeramente por encima del neutro (pH =7) (neutrófilos). Otros como lactobacilos, cándida, y hongos en general, crecen mejor a un pH de 5 (ácido) (ácidofilos). Mientras otros crecen a un pH alto (basófilos).

Por otra parte, algunos organismos requieren de oxígeno para poder crecer, mientras que otros necesitan de CO₂ para estimular su crecimiento.

Medios de cultivo

Un medio de cultivo es una sustancia que se prepara en el laboratorio con los nutrientes necesarios para facilitar la reproducción de microorganismos. Todo medio de cultivo consta de una fuente de carbono para construir los esqueletos de las moléculas y aportar energía; una fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas y una fuente de hidrógeno.

El crecimiento microbiano es exponencial, mientras no disminuyan las fuentes de nutrientes y en cuanto esto sucede, el crecimiento se hace más lento, llegando a una fase estacionaria, para seguir con una fase de declinación o muerte. Lo anterior se puede demostrar mediante una curva de crecimiento:

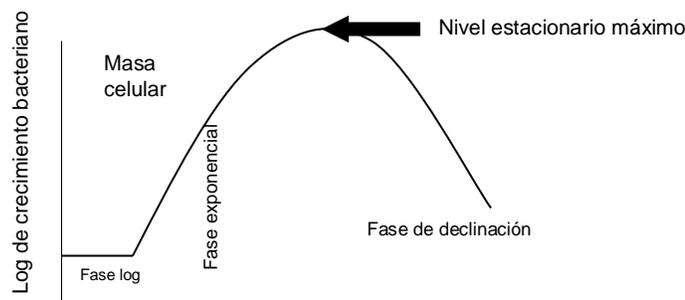


Figura 3.1 Curva de crecimiento microbiano.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	39/218

Para su estudio se pueden clasificar de acuerdo a su composición química, usos y consistencia.

Clasificación de medios de cultivo por su composición química

Medios naturales: Se obtienen a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como carne, vísceras, leche, papa, entre otros, por ello su composición no puede ser constante, varía de un organismo a otro.

Medios sintéticos: Son aquellos en los que sus componentes están químicamente definidos cuyos nutrientes permiten el desarrollo de microorganismos no exigentes en cuanto a su requerimiento nutricional por ejemplo agar nutritivo.

Medios semisintéticos: También llamados empíricos son aquellos medios a los cuales se les agregan nutrientes naturales de origen natural, animal, vegetal o de otros microorganismos por ejemplo papa, extracto de carne o de verdura lo que hace que su composición sea exacta variando de un lote a otro son los de mayor uso en el laboratorio, por ejemplo agar sangre, caldo infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés).

Clasificación de medios de cultivo por sus usos

Medios simples: Son los que constan de todas las fuentes nutritivas mencionadas en forma de compuestos simples.

Ejemplo: Caldo nutritivo, agar nutritivo.

Medios ricos: Constan de fuentes nutritivas complejas. Están enriquecidos con tejidos orgánicos como sangre, extracto de carne, líquido de ascitis. En ellos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	40/218

Pueden crecer mayor cantidad de bacterias en los medios simples, especialmente de difícil crecimiento.

Ejemplo: Agar sangre, agar soya tripticasa.

Medios de enriquecimiento: Por lo general se trata de medios líquidos; contienen además fuentes nutritivas complejas, agentes selectivos para un tipo de microorganismos.

Ejemplo: Caldo selenita, que sirve para enriquecer una muestra sospechosa de Salmonella; contiene selenito de sodio que es un tóxico para bacterias de otros géneros.

Medios especiales: Son medios a los cuales se les adiciona factores de crecimiento como vitaminas, hemina, entre otros, los cuales son necesarios para el crecimiento de determinados microorganismos.

Ejemplo: Medio de Levinthal.

Medios diferenciales: Son medios que revelan características específicas, sin inhibir el crecimiento de algún microorganismo son muy útiles para identificación de bacterias.

Ejemplo: EMB, Endo, MacConkey, agar sangre.

Medios selectivos: los microorganismos que existen en la población, pueden ser separados favoreciendo su crecimiento por inhibición de otros mediante la adición de sustancias inhibidoras o pH, entre otros

Ejemplo: estafilococo 110 (S110) para estafilococos, agar rogosa para lactobacilos, agar mitis salivarius para estreptococos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	41/218

Clasificación de medios de cultivo por su consistencia

Medios líquidos. Permiten el estudio del crecimiento bacteriano en términos de masa celular, lo cual se puede evidenciar por turbidez a simple vista o por medio de un fotocolorímetro.

Medios sólidos. Estos medios constan esencialmente de agar, gelatina o albúmina. El agar es un polisacárido extraído de varias algas rojas, contiene galactosa con un derivado sulfatado. El agar es una sustancia ideal para hacer medios sólidos, ya que a una concentración de 1.5 a 2% no es tóxico para las bacterias, la superficie del agar es lo suficientemente húmeda para soportar el crecimiento y lo suficientemente seco para mantener las colonias separadas. Sólo los microorganismos móviles como *Proteus* requieren de 5% de agar. Los usos del medio sólido son: contar células viables, aislamiento, diferenciación e identificación de microorganismos.

Medios semisólidos: Contienen de 1 a 1.5 % de agar. Son especialmente útiles para observar movilidad y para conservar vivas las cepas de los cultivos por largos periodos.

Ejemplos de medios de cultivo

Agar nutritivo.

Contiene extracto de carne, (pulverizado que brinda hidratos de carbono, compuestos nitrogenados, vitaminas hidrosolubles, levadura y sales), peptona (obtenida como producto de la digestión de sustancias proteicas sirve como fuente de carbono, nitrógeno y energía) y agar, (da solidez al medio de cultivo se obtiene de algas marinas y no sirve como nutriente ya que es resistente a la hidrólisis bacteriana que generalmente se agrega a los medios de cultivo en concentraciones de 1 al 2%. Se usa como medio de cultivo general para la mayoría de las bacterias no demasiado exigentes como agar base. Este medio se vende ya preparado y deshidratado; para utilizarlo es necesario resuspender 23grs. de medio en 1000ml de agua destilada y calentar hasta completa disolución y dejar hervir un poco. Se esteriliza y se vacía a placas o tubos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	42/218

Agar sangre.

Contiene infusión de corazón, triptosa, cloruro de sodio, agar y sangre de carnero. (Aporta factores de crecimiento). Se prepara un medio base al cual se le adiciona sangre de carnero con el objeto de cultivar bacterias más exigentes, patógenas. El crecimiento en éste medio es generalmente exuberante y en él se puede observar diferentes grados de hemólisis, que es característica diferencial de algunos organismos. Para prepararse se resuspenden 40grs. De medio base deshidratado en 1000ml. De agua destilada y calentar a ebullición para disolver el medio. Esterilizarlo y dejarlo enfriar a aproximadamente a 45- 50°C, agregar sangre desfibrinada en condiciones asépticas en proporción del 5%.

Agar Endo.

Contiene peptona, lactosa, fosfato dipotásico, agar, sulfito de sodio fucsina básica. Es un medio diferencial utilizado para bacterias intestinales (coliformes).

Se usa en el diagnóstico de enfermedades intestinales para aislar agentes patógenos y en Microbiología Sanitaria.

La fucsina se usa como indicador para diferenciar los organismos fermentadores de la lactosa de los no fermentadores. Los organismos que son fermentadores de la lactosa aparecen como colonias blancas o incoloras y las que la fermentan dan colonias rosas.

Medio Estafilococo 110

Contiene extracto de levadura, triptona, gelatina, lactosa, manitol cloruro de sodio, fosfato dipotásico, este agar es un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos. La selectividad de éste medio consiste en su alta concentración de cloruro de sodio, la cual no soportan los demás microorganismos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	43/218

Medio SIM

Contiene extracto de carne, peptona, hierro peptonizado, tiosulfato de sodio y agar. Se utiliza como medio de rutina para la identificación de miembros de los medios de ***Salmonella y Shigella***, por la producción de ácido sulfhídrico, indol y movilidad. Estas características junto con otras son importantes para la identificación de miembros Gram negativos del grupo entérico. Este medio es semisólido, para permitir la movilidad de organismos flagelados; la identificación del ácido sulfhídrico se identifica por un precipitado de color negro y la producción de indol se identifica por la adición del reactivo de Kovacs o de Ehrlich: el color rojo indica producción de indol.

MATERIAL POR EQUIPO

1 Paquete con 3 hisopos estériles

Asa y porta asa

Mechero

Cepas:

1 Tubo con agar simple con ***Staphylococcus aureus***

1 Tubo con agar simple con ***Klebsiella pneumoniae***

1 Tubo con agar simple con ***Escherichia coli***

1 Caja con agar EMB (Eosina azul de metileno)

1 Caja con agar sangre

1 Caja con agar estafilococo 110

1 Caja con agar simple

1 Tubo con agar simple inclinado

1 Tubo con caldo nutritivo

1 Tubo con medio SIM

Reactivo de Kovacs

Equipo

Refrigerador, incubadora

SERVICIOS

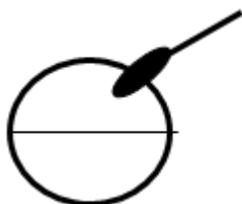
Agua, Luz y Gas

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	0	44/218

PROCEDIMIENTO

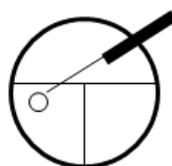
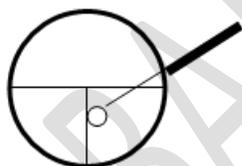
1. Con diferentes hisopos estériles, se tomarán las siguientes muestras y sembrar por el método de estría cruzada (figura 3.1) como sigue:

- Exudado faríngeo Sembrar en agar sangre
- Exudado faríngeo Sembrar en agar estafilococo 110
- Exudado de mano Sembrar en agar simple
- Escherichia coli*** Sembrar en agar EMB (Sembrar con asa bacteriológica)



1. Tomar la muestra con el hisopo y depositarla en la parte superior de la caja, sembrando masivamente hasta cubrir la mitad de la caja

2. Quemar el hisopo y desecharlo en la basura



3. Con el asa previamente esterilizada y enfriada, realizar el segundo cuadrante de estrías, tomando solo una vez parte de la muestra colocada en el segmento anterior.

4. Esterilizar el asa, enfriar y hacer el tercer cuadrante de estrías, sin tocar el primer cuadrante. Incubar durante 24 horas a 37°C.

Figura 3.1 Esquematación de la técnica de estría cruzada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	45/218

2. A partir de cultivos puros de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* hacer resiembras en tubos con agar simple inclinado (sólido), caldo simple (líquido) y medio SIM (semisólido) como sigue:

Nota: Primeramente hay que asegurarse de que los tubos no tienen los tapones pegados, girando suavemente y destaparlos cerca del mechero. Deben marcarse con la cepa que se va a sembrar y la fecha.

A) Siembra en medio inclinado (Agar simple)

1. Esterilizar el asa a la flama del mechero hasta que se ponga al rojo vivo.
2. Enfriar el asa cerca del mechero o bien sumergiéndola en un trozo de agar no sembrado.
3. Tomar una asada del cultivo de *Staphylococcus aureus* y sembrar por estría simple, deslizando el asa desde el fondo del medio. (Figura 3.2)
4. Al terminar la siembra, esterilizar el asa.
5. Incubar a 37°C. durante 24 horas.

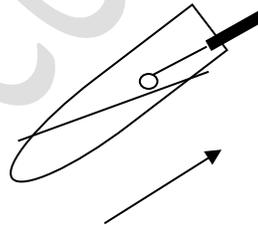


Figura 3.2 Técnica de siembra por estría simple en medio inclinado

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	46/218

B) Siembra en caldo

1. Repetir los pasos 1 y 2 del inciso A
2. Tomar una asada del cultivo de *Staphylococcus aureus* y sembrar el caldo mediante agitación del asa dentro de él. (Figura 3.3)
3. Esterilizar el asa.
4. Incubar a 37°C. durante 24 horas.

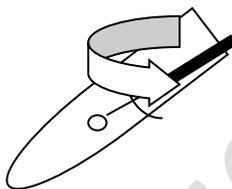


Figura 3.3 Técnica de siembra por agitación en medio líquido.

C) Siembra por picadura (Medio SIM)

1. Realizar los pasos 1 y 2 del inciso A
2. Con el asa totalmente recta, tomar una asada de *Klebsiella pneumoniae* y sembrar en el tubo con medio SIM en posición vertical, tratando de meter y sacar el asa por el mismo lugar para que la picadura quede recta. (Figura 3.4)
3. Esterilizar el asa
4. Incubar a 37°C. durante 24 horas. (Agregar reactivo de Kovac's en el momento de leer frente a mechero)

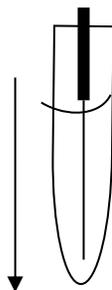


Figura 3.4 Técnica de siembra por picadura en medio líquido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	47/218

3. Realizar la lectura de la Morfología Colonial que presenten las bacterias en los siguientes medios de cultivo: Agar sangre, estafilococo 110, EMB y agar simple. Leer tamaño de las colonias, color, forma, elevación, bordes, superficie, textura, y solo en el medio de agar sangre reportar tipo de hemólisis. Observar y reportar los cambios obtenidos en los tubos con medios de cultivo ya sembrado.

RESULTADOS

- a. Realizar esquemas de cada una de las técnicas de sembrado que realizó, especificando la utilidad de cada una.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	48/218

b. Hacer una tabla de la morfología colonial bacteriana observada en los diferentes medios de cultivo.

	Agar sangre	Agar S-110	Agar nutritivo	Agar EMB
Tamaño				
Color				
Forma				
Elevación				
Borde				
Superficie				
Textura				
Hemólisis		---	---	----

---- No presenta

c. Contesta (+) positivo o (-) negativo para las características de crecimiento en los siguientes medios de cultivo

Caldo nutritivo

Crecimiento _____

Descripción:

Agar nutritivo inclinado

Crecimiento _____

Descripción:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	49/218

SIM

Ácido sulfhídrico _____

Indol _____

Movilidad _____

CUESTIONARIO

1. Definir el concepto de medio de cultivo.
2. Mencione tipos de cultivo según su composición y defina cada uno
3. ¿Qué clase de nutrientes proporciona cada uno de los ingredientes del caldo y agar nutritivo?
4. ¿Qué objeto tiene la regulación del pH en los medios de cultivo?
5. ¿Qué es una colonia bacteriana?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	50/218

6. ¿Qué significa esterilización?

7. ¿Qué es un cultivo puro?

8. De las técnicas que utilizó ¿Cuál emplearía para aislar microorganismos de cavidad bucal?

BIBLIOGRAFÍA

1. Liébana-Ureña J. Microbiología oral. 2ª ed., Madrid España: Mc Graw Hill; 2002.
2. Negroni M. Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2ª ed., Buenos Aires: Médica Panamericana, 2014.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	51/218

PRÁCTICA 4

METABOLISMO MICROBIANO

OBJETIVO

Identificar algunos requerimientos nutrimentales de bacterias presentes en cavidad bucal, reconociendo que no todas las bacterias son metabólicamente iguales.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de la fisiología bacteriana permite comprender el funcionamiento de los procesos bacterianos y sus reacciones, los cuales pueden tener repercusión en el organismo causando alteraciones a diversos tejidos. Las bacterias al igual que todos los seres vivos tienen requerimientos naturales y condiciones de crecimiento específico, para ello requieren llevar a cabo reacciones de asimilación y desasimilación conocidas como metabolismo.

La utilización de oxígeno o dióxido de carbono por parte de las bacterias conocidas como oxidaciones biológicas, permiten clasificarlas en dos grandes grupos a aquellas que utilizan el oxígeno como aceptor son conocidas como aerobias. y los que sobreviven en presencia de bióxido de carbono se llaman anaerobios.

Los carbohidratos se utilizan para la síntesis de sustancias celulares y la conversión a glicógeno como reserva alimenticia formando gránulos para la degradación de carbohidratos la vía que utilizan es la glucólisis y la vía de Embden-Meyerhoff en la cual la glucosa se convierte en ácido pirúvico y es degradado a bióxido de carbono y agua por el ciclo de Krebs obteniéndose durante este proceso 38 moléculas de ATP por moléculas de glucosa. En condiciones anaerobias la glucosa no se oxida completamente, sino que se obtienen productos finales como ácido láctico, acético, propiónico y alcohol entre otros (fermentación).

Cuando se trata de proteínas el proceso de degradación es conocido como proteólisis. Las enzimas proteolíticas son factores de invasividad muy importantes ya que la composición de los tejidos y las sustancias intercelulares es principalmente proteica como en el caso de la colágena que rodea la raíz de los órganos dentarios y un microorganismo proteolítico que produzca la enzima colagenasa puede dar como resultado movilidad, pérdida de los dientes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	52/218

MATERIALES Y REACTIVOS

Cepas:

Bacillus subtilis

Escherichia coli

Salmonella typhi

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus mutans

- 1 Caja con agar nutritivo
- 2 Tubos con caldo glucosa y rojo de fenol
- 2 Tubos con caldo sacarosa y rojo de fenol
- 2 Tubos con medio SIM
- 2 Tubos con leche tornasol
- 2 Tubos con medio agar Citrato de Simons
- 1 Tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* con sello de nujol
- 1 Tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* sin sello de nujol
- 2 Tubos con agar urea de Christensen
- Mechero
- Asa bacteriológica
- Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3 %
- Reactivo de Kovac's

EQUIPO

Refrigerador, incubadora

SERVICIOS

Electricidad
Agua corriente
Gas natural

PROCEDIMIENTO

Utilización de citrato como fuente de carbono

1. Sembrar por estría simple ***Escherichia coli*** en un tubo con medio agar Citrato de Simons.
2. Sembrar por estría simple ***Salmonella typhi*** en un tubo con medio agar Citrato de Simons.
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar si hubo cambio de color del medio de cultivo.
5. Reportar como positivo si es azul o negativo si permanece verde.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	53/218

Degradación de leche tornasol

1. Sembrar por agitación *Bacillus subtilis* en un tubo con leche tornasol.
2. Sembrar por estría simple *Streptococcus mutans* en un tubo con con leche tornasol.
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar que bacterias son positivas para fermentación de lactosa, acidificación o alcalinización del medio de cultivo, coagulación, peptonización y formación de gases

Detección de ácido sulfhídrico, indol y movilidad:

1. Sembrar por picadura *Salmonella typhi* en un tubo con medio SIM.
2. Sembrar por estría simple *Escherichia coli* en un tubo con medio SIM.
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Adicionar 2 gotas de reactivo de Kovac's y observar la aparición de un anillo color rojo en la superficie lo que es indicativo de producción de indol.
5. Observar que bacterias son positivas para crecimiento fuera de la estría (movilidad) y formación de un precipitado negro (sulfuro de hierro).

Producción de ureasa:

1. Sembrar por estría simple *Klebsiella pneumoniae* en un tubo con agar urea de Christensen
2. Sembrar por estría simple *Staphylococcus aureus* en un tubo con agar urea de Christensen
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar que bacterias hidrolizan la urea un cambio de color rosa indica reacción positiva, sino presenta cambio será una reacción negativa.
5. Sembrar por agitación *Escherichia coli* en un tubo con caldo sacarosa y rojo de fenol y un tubo con caldo glucosa y rojo de fenol.
1. Sembrar por agitación *Streptococcus mutans* en un tubo con caldo sacarosa y rojo de fenol y un tubo con caldo glucosa y rojo de fenol.
2. Incubar a 37° C durante 24 horas.
3. Observar que bacterias metabolizan sacarosa y cuales glucosa como fuente de energía, si el indicador de pH (rojo de fenol) vira a color amarillo es indicativo de que el carbohidrato se metabolizó en ácidos orgánicos, de lo contrario no cambia de color (permanece rojo).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	54/218

Oxidación o fermentación de la glucosa:

1. Sembrar por picadura ***Staphylococcus epidermidis*** un tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* sin sello de nujol
2. Sembrar por picadura ***Staphylococcus aureus*** un tubo con medio *manitol Hugh-Leifson* con sello de nujol
3. Incubar a 37° C durante 24 horas.
4. Observar que bacterias metabolizan el manitol en presencia de oxígeno (oxidación) y cuáles en ausencia de éste (fermentación).

Actividad de la catalasa:

1. En un porta objetos se divide a la mitad y se colocan dos gotas de peróxido de hidrógeno de cada lado.
2. Tomar una muestra ***Staphylococcus aureus con el asa y extender*** en uno de los lados del portaobjetos sobre la gota. (Al tomar la bacteria no olvidar esterilizar el asa antes y después).
3. Tomar una muestra ***Streptococcus mutans*** con el asa extender del otro lado del portaobjetos sobre la gota de peróxido de hidrógeno.
4. Observar que bacterias son positivas para la presencia de la catalasa. La cual se manifiesta por efervescencia (formación de burbujas de oxígeno).

RESULTADOS

Formato para el reporte de resultados.

	Citrato como fuente de carbono	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
Positivo		
Negativo		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	55/218

Esta prueba nos permite diferenciar un grupo de bacterias que son capaces de crecer con citrato (citrato de sodio) como única fuente de carbono y sales amónicas inorgánicas (fosfato de amonio) como única fuente de nitrógeno, provocando la alcalinización del medio. Sólo las bacterias capaces de metabolizar citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con el metabolismo del citrato, genera una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH (azul de bromotimol) de verde a azul.

	Degradación de leche tornasol	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
fermentación de lactosa		
Acidificación		
alcalinización		
Coagulación		
Peptonización		
formación de gases		



MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	56/218

La prueba de degradación de leche tornasol nos permite observar varias funciones metabólicas: fermentación de lactosa, coagulación, peptonización y formación de gases. La leche tornasolada presenta un color púrpura con un pH = 6,8. Si el microorganismo fermenta la lactosa con producción de ácido láctico, el descenso de pH hace virar el indicador cristal violeta. Si la bacteria no fermenta la lactosa, y por su metabolismo se alcaliniza el medio, el indicador vira a púrpura azulado. La coagulación puede deberse a la precipitación de la caseína por la formación de ácidos, o por la conversión de la caseína en para-caseína por la enzima renina.

En el primer caso, el coágulo es firme y gelatinoso, no se separa de las paredes del tubo y se disuelve en medio alcalino. En el segundo caso, el coágulo es blando, se separa de las paredes del tubo dando un líquido grisáceo (suero).

La peptonización o digestión del coágulo, se observa como una retracción del coágulo y se produce si la bacteria posee la enzima caseinasa. La formación de gases (burbujas) es un producto final de la degradación (fermentación) de la lactosa.

	Medio SIM	
	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
ácido sulfhídrico		
Indol		
Movilidad		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	57/218

El medio semisólido SIM permite verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro ferroso, en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasas. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7,2

	Medio manitol Hugh-Leifson	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
	glucosa	glucosa
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
Oxidación		
Fermentación		

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	58/218

Las bacterias utilizan carbohidratos por uno de dos procesos metabólicos, fermentación u oxidación para obtener energía. La principal diferencia es la necesidad de oxígeno atmosférico y una fosforilación inicial. Por prueba se inoculan dos tubos de medio y uno de ellos se sella con aceite mineral o parafina para impedir la entrada de oxígeno.

La fermentación requiere de una fosforilación inicial, utiliza las vías de la glucólisis, de las pentosas fosfato y Entner-Doudoroff. La oxidación de la glucosa produce ácido pirúvico por una vía de derivación (Shunt), ocurre en condiciones aerobias y no requiere de fosforilación inicial. La producción de ácido se observa por el viraje del indicador de pH de color verde a color amarillo. En los tubos positivos puede haber generación de gas.

	Metabolismo de carbohidratos	
	<i>Escherichia coli</i>	
	Sacarosa	Glucosa
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
Positivo		
Negativo		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	59/218

Metabolismo de carbohidratos		
<i>Streptococcus mutans</i>		
	Sacarosa	Glucosa
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
Positivo		
Negativo		

Producción de ureasa		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
Positivo		
Negativo		

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	60/218

Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar indicador de pH (rojo de fenol) de color amarillo al rojo/rosa intenso. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea, como especies de *Enterobacter* o *Klebsiella*.

	Actividad de la catalasa	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
	<i>Imagen</i>	<i>Imagen</i>
Positivo		
Negativo		

El peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de los carbohidratos. La acumulación del peróxido es muy tóxica por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando a *Streptococcus* sp. producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno obteniendo agua y oxígeno.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	61/218

Cuestionario

1. Defina metabolismo
2. ¿Cuál es la importancia del metabolismo microbiano en las enfermedades bucales?
3. ¿Qué es una enzima y cuál es su función?
4. ¿Qué tipo de enzima es la catalasa y cómo se demuestra su presencia?
5. ¿Cuál prueba principal se realizó en laboratorio para distinguir 2 géneros de bacterias importantes de cavidad bucal?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	62/218

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Liébana, J. Microbiología oral. *Granada: Mc Graw Hill Interamericana*. 2002. 22-24
- Negroni, M. Microbiología estomatológica. Buenos Aires Ed. Médica Panamericana. 2000, 481-488
- Brooks, G. Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica 25a. México McGraw Hill. 2011, 11-13
- Nolte, W. A. Microbiología odontológica. México Editorial Interamericana, SA. 1971, 19-46
- Davis, B. D. D., Eisen, R., Ginsberg, H. N., & Davis, H. S. B. D. (). Tratado de microbiología: con inclusión de genética molecular (No. 180 DAV). 1984, Madrid. Editorial Masson. 1996: 74-59

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	63/218

PRÁCTICA 5

DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LISOZIMA COMO MECANISMO DE DEFENSA INESPECÍFICO

OBJETIVO

Al término de esta práctica, el alumno comprenderá la función e importancia de la lisozima como mecanismo de defensa inespecífico del organismo y de cavidad bucal.

I

FUNDAMENTO TEÓRICO

Al ser la cavidad bucal una de las principales vías de entrada microbiana al organismo, es de suma importancia para el cirujano dentista conocer los mecanismos de defensa inespecíficos presentes en el sistema estomatognático, así como sus funciones, incluyendo la lisozima.

Los mecanismos de defensa de nuestro organismo son diferentes y se pueden dividir en:

- Específicos
- Inespecíficos

La cavidad bucal tiene ambos mecanismos de defensa, los cuales como su nombre lo indica son los encargados de cuidar y preservar la salud y bienestar de nuestro organismo.

Los mecanismos de defensa locales o inespecíficos reciben su nombre porque actúan contra cualquier agente extraño sin distinguir su tipo y estos se dividen en:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	64/218

A. Barreras físicas o mecánicas.

- Mucosas: Las cuales están constituidas en cavidad bucal por los tejidos que forman una superficie continua de epitelio plano estratificado que protege a los tejidos profundos funcionando como una barrera mecánica la cual se ve apoyada para su función defensiva por la descamación y la queratinización.
- Flujo salival y movimientos de la boca: los cuales impiden la proliferación y adherencia de microorganismos y detritus.
- Esmalte dental: El cual también es una barrera anatómica de gran importancia para defender órganos dentarios.
- Anatomía y posición dentaria.
-

B. Barreras bioquímicas:

- Tiocianato
- Lisozima
- Peroxidasa
- Lactoferrina
- Mucopolisacáridos
- Complemento
- Capacidad amortiguadora salival
- Fluido gingival

C. Barreras biológicas:

- Leucocitos que participan en fagocitosis
- Trasudación de fluido gingival.

D. Barreras bacterianas:

- Flora microbiana normal.
(Relaciones ecológicas microbianas)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	65/218

En 1927, Fleming reportó la presencia de una sustancia en la secreción nasal que causaba destrucción de *Micrococcus lysodeikticus*, esta sustancia fue nombrada lisozima. La cual está ampliamente distribuida en los tejidos y fluidos corporales incluyendo la saliva, tejido y fluido gingival, surco gingival, y a nivel general se encuentra en orina, lágrimas, sudor, calostro, líquido prostático, secreción vaginal, nasal, intestinal y bronquial etc.

La lisozima es una enzima que actúa sobre el peptidoglicano de la pared celular de ciertas bacterias principalmente Gram positivas. Las fuentes de lisozima en saliva, surco gingival, etc. son las glándulas parótida, mandibular, sublinguales y los leucocitos salivales en degeneración.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 Caja de agar Soya Trypticaseína
- 1 Tubo con *Micrococcus lysodeikticus*
- 1 Asa bacteriológica
- 1 Tubo con 5 discos de papel filtro estériles
- 1 Pinza de curación
- 1 Mechero
- 1 Gradilla
- 1 Tubo con solución salina estéril

EQUIPO

- Refrigerador
- Incubadora

SERVICIOS

- Luz, agua y gas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	66/218

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar con *Micrococcus lysodeikticus* en forma masiva con el asa bacteriológica la caja con Agar Soya Trypticaseína.
2. Colocar distribuidos en la caja de Petri previamente etiquetada un disco humedecido con:
 - a) saliva
 - b) sudor
 - c) lágrimas
 - d) secreción nasal
 - e) solución salina estéril
- Las muestras deben ser de un mismo donador para cada caja (1 por equipo)
3. Incubar a 37° C por 24 horas.
4. Leer y medir halos de inhibición de crecimiento por acción de la lisozima. Identificar a que secreción pertenece cada halo.

RESULTADOS.

Realizar una tabla con los siguientes datos:

Secreción	Halo de inhibición en mm.	Eficacia en cruces
Saliva		
Sudor		
Lágrima		
Secreción nasal		
Solución salina		

- **Analizar sus resultados en cuanto a la actividad de la lisozima presente en cada secreción y su eficacia.**



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	67/218

CUESTIONARIO

1. ¿A qué se le llama mecanismos de defensa inespecíficos?
2. Explique dos mecanismos de defensa inespecíficos en cavidad bucal diferentes a la lisozima.
3. Escriba cuál es la importancia de los mecanismos de defensa inespecíficos en cavidad bucal.
4. Explicar la causa por la que se produce la enfermedad paradontal con relación a los mecanismos de defensa inespecíficos?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	68/218

BIBLIOGRAFÍA

1. Nolte, W.A. Microbiología odontológica. 4^o ed. México. Edit. Nueva Editorial Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V.
2. Liébana Ureña J. Microbiología Oral. 2^o ed. España. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana de España. 2002
3. Jawetz, E. Microbiología Médica. 16^a ed. México. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 1999

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	69/218

PRÁCTICA 6

FAGOCITOSIS

OBJETIVO

Al concluir esta práctica, el alumno conocerá la importancia de la fagocitosis como mecanismo de defensa inespecífico del organismo y de cavidad bucal.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de una de las reacciones de nuestro organismo y de la cavidad bucal ante la entrada de agentes extraños es de suma importancia para el cirujano dentista, y la fagocitosis es una de las reacciones primarias que el organismo tiene para defenderse de estos agentes.

Los fagocitos o células fagocíticas están ampliamente distribuidas en el cuerpo, pudiéndose encontrar en sangre, médula ósea hígado, tejido conectivo, tejido nervioso, cavidades cerosas, estas células forman parte del mecanismo de defensa y participan en los fenómenos inmunológicos tempranos o primarios.

Elie Metchnikoff en 1892 denominó a estas células macrófagos por ser capaces de dirigir grandes partículas. La fagocitosis se puede definir como La ingestión y destrucción de células vivas o antígenos no viables por células fagocíticas, y consta de varias etapas que son:

- Reconocimiento
- Quimioatracción o quimiotaxis
- Opsonización
- Ingestión
- Muerte
- Exocitosis



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	70/218

Al penetrar una partícula extraña, por ejemplo una bacteria, primeramente las células de defensa de nuestro cuerpo identifican y/o reconocen a esta, por lo que los macrófagos son atraídos al sitio donde se encuentra (quimiotaxis o quimioatracción) mediante la liberación de sustancias conocidas como opsoninas (opsonización) que hacen atractiva a la partícula extraña, entonces los macrófagos engloban a esta partícula (endocitosis) y la meten en su interior (ingestión), después liberan diferentes enzimas que destruyen dicha partícula (digestión) provocando la muerte o destrucción de la partícula y los restos de dicha partícula son enviados al exterior del macrófago (exocitosis).

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

MATERIALY REACTIVOS

- Preparaciones fijas de fagocitosis
- Aceite de inmersión

EQUIPO

Microscopio

Refrigerador, incubadora

SERVICIOS

Luz, agua

PROCEDIMIENTO

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



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	71/218

RESULTADOS

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

CUESTIONARIO

1. Defina enzima
2. Mencione que enzimas y sustancias intervienen en la destrucción de partículas extrañas durante la fagocitosis.
3. Defina pinocitosis
4. Mencione que células participan en el proceso de la fagocitosis



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	72/218

BIBLIOGRAFÍA

1. Nolte, W.A. Microbiología odontológica. 4^o ed. México. Edit. Nueva Editorial Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V.
2. Liébana Ureña J. Microbiología Oral . 2^o ed. España. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana de España. 2002.
3. Jawetz, E. Microbiología Médica. 16^a ed. México. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 1999

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	73/218

PRÁCTICA 7

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

OBJETIVO

Que el alumno identifique a la aglutinación como una de las técnicas inmunológicas que existen en el laboratorio para cualificar o cuantificar antígenos y anticuerpos para comprender el fundamento de diferentes pruebas diagnósticas que se basan en ellas.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de las diferentes reacciones que pueden presentarse in vitro entre un antígeno y un anticuerpo, son importantes desde el punto de vista diagnóstico para la detección de enfermedades o para la identificación de elementos o sustancias que se encuentran en el organismo por diversas causas, de aquí la importancia de conocer de manera básica, estas reacciones y algunas de sus aplicaciones. La presente práctica ilustra de manera muy general, la reacción de aglutinación.

Esta práctica, está basada en una técnica inmunológica humoral (también llamada serológica) la cual recibe este nombre debido a que el efector inmunológico que reacciona con el antígeno es un anticuerpo, es de tipo cualitativa porque solo se detecta la presencia del antígeno y también es indirecta, ya que el anticuerpo se encuentra en una fase sólida (partícula de látex). Las reacciones antígeno y anticuerpo forman parte de los mecanismos de defensa del cuerpo humano, sin embargo, muchas sustancias que forman parte del organismo han sido usadas como antígenos y han sido inoculadas en modelos animales para estimular la producción de anticuerpos, que una vez formados, son obtenidos para utilizarlos con fines de diagnóstico y/o identificación en orina, suero o en sangre humanos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	74/218

Se denomina aglutinación a la interacción secundaria in vitro de un antígeno particulado (por lo general células) con su anticuerpo específico. Cuando la molécula antigénica con la que interacciona el anticuerpo específico no forma parte de la estructura nativa de la partícula, sino que se incluye artificialmente en su superficie, la aglutinación que tiene lugar se denomina genéricamente aglutinación pasiva o indirecta, los soportes utilizados pueden ser inertes como partículas de látex.

Un ejemplo claro de esta reacción es la determinación de grupos sanguíneos, cuya prueba se basa en la identificación de la presencia o ausencia de dos antígenos o aglutinógenos A y B, en los glóbulos rojos de la sangre, y dos aglutininas: Alfa o Anti-A, y Beta o Anti-B en el suero o plasma, de donde alfa resulta específico por A, y beta para B.

De acuerdo a la distribución de los isoantígenos A y B en los eritrocitos, la sangre de toda persona queda incluida entre los cuatro grupos que son denominados A, B, AB y O, según tengan un antígeno (A o B), o los dos (AB) o carezcan de ellos (O). Toda persona pertenece a uno de los cuatro grupos del sistema.

En 1940 Landsteiner y Wiener descubrieron que el suero inmune de un conejo inoculado con sangre de monos Rhesus era capaz de aglutinar los glóbulos rojos de la población humana, por lo que determinaron la existencia de otro antígeno distinto de los hasta entonces conocidos. Lo denominaron factor Rh.

Las personas que presentaron el factor Rh se llamaron Rh positivos y los que no lo poseían Rh negativos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	75/218

MATERIAL Y REACTIVOS

- Torunda con alcohol
- 2 lancetas estériles
- 2 portaobjetos
- 2 aplicadores de madera
- 1 frasco de suero hemotipificador "A"
- 1 frasco de suero hemotipificador "B"
- 1 frasco de suero hemotipificador Rh o "D"
- 1 bote con cloro

EQUIPO

Refrigerador

SERVICIOS

Luz y agua

PROCEDIMIENTO

Limpiar el área del dedo con una torunda, donde se hará la punción con una lanceta estéril.

Colocar en un portaobjetos limpio tres gotas de sangre separadas.

En la primera gota de sangre colocar una gota de suero anti-A, en la segunda gota de sangre, una gota de suero anti-B y en la tercera una gota de suero anti-D.

Mezclar perfectamente con ayuda del palillo.

Esperar resultados y observar la reacción de aglutinación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	76/218

RESULTADOS

Dibuja tus resultados

- lapso de minutos, indica la unión antígeno – anticuerpo, por lo tanto quiere decir que la prueba es positiva.
- La ausencia de grumos indica que no existe reacción de aglutinación.
- Se observará en cual hubo aglutinación, reportando como grupo sanguíneo “A” si hubo aglutinación en el suero anti-A, o como grupo sanguíneo “B” si hubo aglutinación con el suero anti-B, si aglutina en ambos grupos sanguíneos se reporta como grupo sanguíneo “AB”, y si no aglutina grupo sanguíneo “O”.

Si aglutina con el anti-“D”, Rh positivo, si no aglutina Rh negativo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	77/218

CUESTIONARIO

1. Defina aglutinación
2. Defina precipitación
3. Indique la diferencia entre precipitación y aglutinación
4. Mencione por lo menos otra prueba diagnóstica que implique una reacción de aglutinación y cuál es su importancia.
5. Dé tres ejemplos de técnicas inmunológicas de aglutinación: una con saliva, otra con suero y con orina, explicando su uso.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	78/218

BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks, Butel, Morse. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelbert. 16º ed. Editorial el Manual Moderno. México 1999.
2. Negroni Marta. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina, 1999.
3. Tristram G.I. Parslow, Daniel P. Stites, Abba I Terr, John B. Imboden. Inmunología Básica y Clínica. 10º ed. Editorial El Manual Moderno. México 2001.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	79/218

PRÁCTICA 8

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS PRESENTES EN SALIVA

OBJETIVO

Que el alumno conozca el número aproximado de bacterias viables presentes en la saliva humana, así como el tipo de flora de la cavidad bucal.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El conocimiento de que existen microorganismos en la cavidad bucal, es de fundamental importancia para el cirujano dentista, al igual que conocer el tipo de flora que existe, ya que dependiendo del tipo de flora que se instala, esta puede ser considerada como factor de riesgo para patologías en la cavidad bucal.

La presente práctica facilitará al alumno el aislamiento de microorganismos en saliva y le permitirá a través de la técnica de Gram identificar de manera general, su clasificación y morfología

La saliva como un fluido corporal tiene principalmente dos funciones: digestión y protección.

1. Digestión: Los alimentos sólidos y semisólidos son disueltos en la saliva como un prerequisite para el comienzo de la digestión, amilasa, que es una enzima que hidroliza los almidones es el mayor componente proteico de la saliva.
Las secreciones mucinosas y serosas que conforman la saliva se encargan de lubricar las estructuras orales con lo cual ayudan a la masticación, deglución y fonación.
2. Actividad protectora: Los amortiguadores (Buffers) salivales evitan los cambios extremos del pH ocasionados por alimentos ácidos o productos bacterianos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	80/218

También la saliva contiene enzimas antimicrobianas que pueden ocasionar gran impacto al desafío o ataque bacteriano externo, aunque a la flora microbiana normal de cavidad oral no la perjudique.

Algunos componentes minerales de la saliva juegan papeles importantes en los mecanismos de protección de los dientes ante los ataques de ácidos que provocan la desmineralización y remineralización del esmalte.

Las secreciones mucinosas son muy importantes para la protección de las membranas mucosas evitando la deshidratación.

Aproximadamente 700-800 ml. De saliva son secretados y tragados por día, siendo la saliva un factor importante en la conservación del agua para el organismo.

Al mismo tiempo como la saliva pasa por todas las regiones de la cavidad bucal como son los carrillos, lengua, dientes, surco gingival, placa bacteriana, entre otros. Realiza un barrido parcial de la flora microbiana que se aloja en cada una de estas zonas, por lo que es muy fácil encontrar en un cultivo de saliva a microorganismo como: estreptococos, peptoestreptococos, veillonella, corynebacterium, neiserias, nocardia, fusobacterium, bacteroides, actinomyces, lactobacilos, espiroquetas, levaduras, protozoarios y otros.

Al realizar un cultivo de saliva obtenemos un número aproximado de bacterias presentes en cavidad bucal, pero esto no quiere decir que al realizar el cultivo vamos a tener la certeza del tipo de microorganismos de la flora microbiana bucal.

Al realizar estudios de la flora microbiana bucal, nos vamos a encontrar con varios problemas, pues la flora microbiana presenta cambios progresivos hasta que madura y aun así seguirá cambiando a causa de la edad, cambios hormonales, problemas sistémicos, dieta, incluso la hora de la toma de la muestra de saliva nos va a variar el resultado o conteo microbiano en un mismo individuo, es por esto que da cifras exactas de número de bacterias en saliva no es conveniente, por eso se dan aproximaciones en cuanto a cantidad y tipo de microorganismos existentes en cavidad oral.

Nolte, menciona que en 1 ml de saliva de un adulto podemos encontrar aproximadamente 6,000 millones (6×10^9) de bacterias.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	81/218

Para el estudio de bacterias de cavidad bucal, se han utilizado principalmente dos técnicas el frotis directo y el cultivo en placa.

El frotis directo nos va a decir que tipo de bacterias estamos viendo al microscopio más no el número de ellas.

El cultivo en placa nos va a determinar el número de colonias o (CFU) unidades productoras de colonias que se encuentran en 1 ml. de saliva, aunque si recordamos lo que se refiere Nolte, es imposible cuantificar seis mil millones una caja de Petri, por lo que se hace necesario la utilización de diluciones decimales antes de la siembra.

Antes de realizar la siembra debemos tomar en cuenta otros factores como son en que medio vamos a sembrar y con qué técnica.

Referente al medio de cultivo debemos tener bien claro si queremos cuantificar el total de bacterias o si queremos solo un tipo de ellas; en este caso queremos conocer el total de bacterias por lo tanto, vamos a utilizar un medio de cultivo como el Agar Soya Trypticasa, que es un medio rico para el crecimiento de todas las bacterias.

Respecto a la técnica, vamos a utilizar el vaciado en placa, porque solo utilizaremos 1 ml. de saliva y esta técnica favorece la diseminación de las bacterias en todo el Agar. Recordamos que vamos a cuantificar no a aislar.

MATERIAL

1 tubo estéril para coleccionar la saliva
6 pipetas de 1ml estériles
3 cajas de Petri estériles
1 matraz con Agar Soya Trypticasa
6 tubos con 4.5ml de solución salina estéril
1 equipo de tinción de Gram
Hisopos estériles
Portaobjetos
Mechero

EQUIPO

Microscopio
Refrigerador, incubadora



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	82/218

SERVICIOS

Luz
Agua
Gas

PROCEDIMIENTO

1. Hacer un frotis de alguna de las zonas o regiones de la cavidad bucal (carrillo, lengua, etc.) con un hisopo estéril, fijarlo al calor y teñirlo de Gram.

TÉCNICA DE GRAM

1. Cubrir el frotis con Cristal Violeta60 seg.
2. Lavar con agua
3. Aplicar Lugol60 seg.
4. Lavar con agua
5. Decolorar con Alcohol-Acetona.....2 a 4 seg.
6. Lavar con agua
7. Cubrir con Safrina al 0.5%30 seg.
8. Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio, con aceite de inmersión.

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

1. Preparar seis diluciones decimales de saliva colectada en condiciones de esterilidad de la siguiente manera:

Tubo 1 ...0.5ml. de saliva + 4.5ml. de sol. salina=1:10 (10-1)

Tubo 2 ...0.5ml. de dilución 1:10+4.5ml. sol. salina=1:100 (10-2)

Tubo 3 ...0.5ml. de dilución 1:100+4.5ml. sol. salina=1:1000 (10-3)

Tubo 4 ...0.5ml. de dilución 1:1000+4.5ml. sol. salina=1:10000 (10-4)

Tubo 5 ...0.5ml. de dilución 1:10000+4.5ml. sol. salina=1:100000 (10-5)

Tubo 6 ...0.5ml. de dilución 1:100000+4.5ml. sol. salina=1:000000 (10-6)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	83/218

2. Pipetear 1.0 ml. de las tres últimas diluciones (tubos 4, 5 y 6) en tres cajas de petri estériles previamente etiquetadas con los tubos correspondientes (caja 4 para tubo 4 etc.)
3. Adicione a cada caja 15 o 20 ml. de agar soya triptica previamente fundido y a temperatura de aproximadamente 37°C., homogenizar el medio con la saliva y dejar solidificar.
4. Incubar a 37°C por 24 Hrs.
5. Constar el número de colonias en las placas, en caso de ser demasiado el crecimiento en las cajas, dividir en cuatro y contar las de un cuadrante multiplicar el resultado por cuatro y así tenemos el resultado de toda la caja, después multiplicar este resultado por la inversa de la dilución correspondiente, y obtener de esta forma el número de bacterias por mililitro de saliva.

RESULTADOS

1. Reportar el tipo de microorganismos Gram + y Gram – que predominan en la región seleccionada de la cavidad bucal.
2. Reporta el número de bacterias por ml. de saliva o unidades formadoras de colonias por ml. de saliva.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	84/218

CUESTIONARIO

1. ¿Qué importancia cree que tenga el hallazgo de un número de bacterias por mililitro de saliva superior al normal en un paciente?
2. Enliste las características más importantes de la saliva.
3. ¿Cuál es el pH normal en saliva y que problemas sistémicos lo pueden variar?
4. Explique brevemente de que forma ayuda la saliva en las siguientes funciones: Fonación, Deglución y Masticación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	85/218

BIBLIOGRAFÍA

1. Ross Holbrook, Microbiología Bucal y Clínica, Editorial PLM Científica, Agosto 1989, México.
2. George W. Burnett, Henry W. Scherp, George S. Schuster, Manual Moderno de Microbiología y Enfermedades Infecciosas de la boca, Ediciones Ciencia y Técnica S.A. Tomo 2 México 1987.
3. Paller Morton, Marcel Dekker, Inc, Oral Hygiene Products and Practice, Capitulo 3, New York 1988.
4. W. Nolte, Microbiología Odontológica, Editorial Interamericana, 4ta Edición México 1985.
5. Negroni Marta. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y Guía práctica, Editorial Médica Panamericana 1ªed. 3ª reimpresión. Buenos Aires, Argentina. 2004.

BAJO CONCEPTO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	86/218

PRÁCTICA 9

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DENTAL “IN VITRO”

OBJETIVO

Conocer la capacidad de algunos microorganismos de cavidad oral, para adherirse a superficies sólidas en y ausencia de carbohidratos, identificando por medio de la tinción de Gram a los que componen la placa microbiana.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La caries dental y la enfermedad periodontal comparten un origen común conocido como placa bacteriana, de aquí que el conocimiento y la comprensión de los mecanismos involucrados en la formación de ésta son importantes para el odontólogo, ya que le permiten implementar medidas preventivas y de control.

La cavidad bucal proporciona diferentes sitios para la colocación y crecimiento microbiano entre los que se encuentran saliva, labios, mejillas, paladar, lengua, encía y dientes.

Las características anatómicas y la composición bioquímica de los dientes pueden favorecer la instalación proliferación de microorganismos (principalmente bacterias) para dar origen la placa Bacteriana Bucal.

El inicio en la formación de placa dental es la formación de película adquirida que se da gracias a glucoproteínas principalmente derivadas de la salival, que se depositan sobre la superficie de los dientes a partir de las cargas eléctricas de ambos (Figura 1A).

Sobre la superficie del esmalte, comienza a depositarse una película delgada amorfa que oscila entre 0.1 y 1.0 micras de espesor. Los mecanismos que intervienen en la formación de la película sobre el esmalte incluyen fuerzas electrostáticas, tipo Van der Waals e hidrófobas. Es por ello, que en la superficie de la hidroxiapatita que posee grupos fosfato con carga negativa, interactúa con proteínas y glucoproteínas salivales y del fluido crevicular con carga positiva. La película formada adquiere funciones protectoras al proporcionar lubricación a las superficies e impidiendo la pérdida de humedad del tejido. Además, posee moléculas que funcionan como sitios de unión para la adherencia de microorganismos y enzimas de origen salival. Las glucoproteínas que se encuentran en la película adquirida derivan de la saliva y entre ellas se encuentran la amilasa, histatinas, estaterinas, lisozima, anticuerpos (principalmente Ig A), entre otras.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	87/218

Una vez que se forma la película adquirida, es colonizada por microorganismos que residen en la cavidad bucal. Las bacterias se adhieren a las glucoproteínas de la película en forma casi inmediata. Algunos mecanismos por los cuales las bacterias se unen a las superficies dentales es mediante receptores específicos de la película mediante moléculas bacterianas específicas llamadas adhesinas lo que facilita su adherencia y proliferación. Las principales adhesinas son: a) la capa mucosa, b) la cápsula c) las glucosiltransferasas (GTF), d) proteínas que fijan glucanos, e) proteínas o glucoproteínas que se fijan a la película que recubre materiales como prótesis o los dientes, g) los ácidos teicoicos, en forma especial los lipoteicoicos de las paredes celulares bacterianas h) los polisacáridos del antígeno O e i) las fimbrias. Estos elementos bacterianos van unidos al cuerpo de la célula, pero otras veces se separan y excretan del mismo (p.e. capa mucosa o glucosiltransferasas) o están incluidos en las vesículas superficiales (que también pueden desprenderse de las bacterias) que forman las bacterias Gram negativas o a expensas de su membrana externa. Figura 1B.

Los receptores son compuestos del hospedero que interactúan con las adhesinas, y pueden ser: a) elementos celulares (p.e. glicocalix, proteínas y glucoproteínas de la membrana citoplasmática, b) sustancias existentes en el origen del medio celular (p.e. fibronectina o mucina) y c) superficies lisas a través de la película adquirida que las recubre.

Algunos autores mencionan que otro factor que permite la unión de los microorganismos o las superficies dentales es la formación de puentes de calcio con carga positiva, que permiten la unión de componentes bacterianos con carga negativa a la superficie dental que también posee carga negativa. Figura 1C.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	88/218

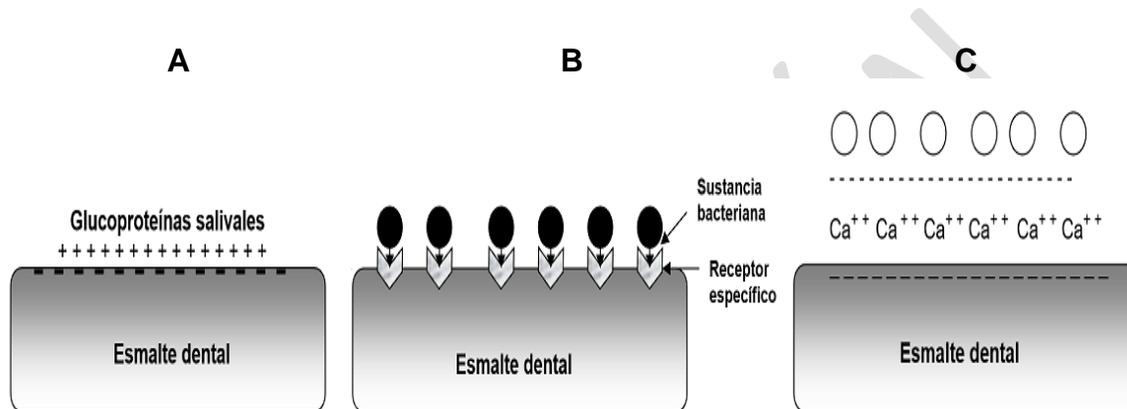


Figura 1.A) Muestra la afinidad de las cargas de las glucoproteínas salivales y su afinidad por el esmalte dental. B) Muestra las sustancias bacterianas y los receptores específicos para ellas. C) Muestra la unión de las bacterias a la película adquirida mediante puentes de calcio.

La colonización microbiana específica comprende diferentes momentos que incluyen la adherencia, agregación, coagregación (fenómeno que consiste en la adherencia de una nueva capa de microorganismos sobre los ya instalados. Estas interacciones suceden específicamente a través de proteínas específicas de tipo lectinas y menos específicas resultantes de las fuerzas hidrofobas, electrostáticas y de Van der Waals), crecimiento y reproducción de los microorganismos que se adhieren a la película adquirida. Figura 2.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	89/218

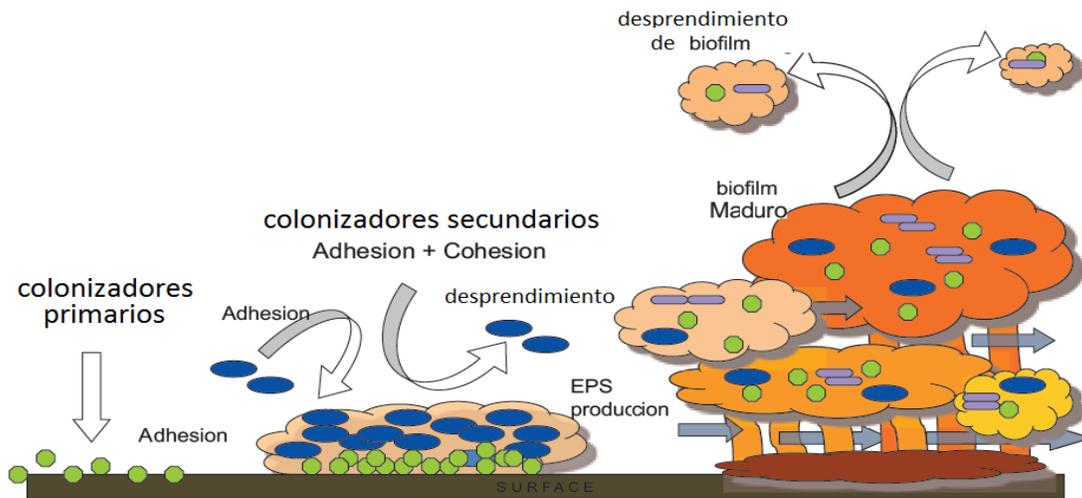


Figura 2. Secuencia de desarrollo de placa microbiana. Tomado de Seneviratne et al., 2011

MATERIALES Y REACTIVOS

- 1 Tubo de 16x150 con tapón de hule con 15 ml de medio base rojo de fenol más sacarosa al 5 %
- 1 Tubo de 16x150 con tapón de hule con 15 ml de medio base rojo de fenol.
- 1 Tubo de 13x10
- 1 Paquete con 4 hisopos estériles.
- Alcohol-acetona
- Cristal violeta
- Lugol (Yodo de Gram)
- Portaobjetos
- Mechero
- Asa bacteriológica
- Pipeta de 1 ml
- Pinza de disección

Reactiv

- 1 ml de saliva
- 1 ml de solución salina



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	90/218

EQUIPO

Microscopio
Refrigerador, incubadora.

SERVICIOS

Electricidad
Agua corriente
Gas natural

PROCEDIMIENTO O TÉCNICA

Sembrado de biofilm:

1. Colectar en un tubo de 13x10, 1 ml de saliva de una persona que no se haya efectuado limpieza dental y que vaya a donar muestra de placa dental.
2. Raspar con un hisopo estéril un sitio de acumulación de biopelícula dental
3. Sembrar por agitación la muestra del hisopo en un tubo sin sacarosa y en otro tubo con sacarosa
4. Adicionar 0.5 ml de saliva a cada uno de los tubos
5. Tapar los dos tubos con un tapón de hule *.
6. Incubar a 37° C durante 24 horas.
7. Monitorear durante 7 días la formación de placa bacteriana

* El tapón de hule tiene un alambre suspendido el cual servirá de matriz sólida para la acumulación de microorganismos y posteriormente formación de la placa bacteriana.

NOTA: Los tubos nunca deberán ser agitados, de lo contrario no se observará formación de placa.

Este material será utilizado para la práctica siguiente de aislamiento de microorganismos de la biopelícula dental (práctica 7).

Frotis de placa bacteriana:

1. Tomar con un nuevo hisopo estéril una muestra de placa bacteriana del mismo donador de saliva.
2. En un portaobjetos limpio y desengrasado, realizar un frotis y fijar la preparación por calor directo.
3. Teñir mediante la técnica de Gram.
4. Evaluar la presencia de bacterias según morfología y positividad a Gram. Guardar en el interlaboratorio por una semana, esta preparación (microorganismos de placa bacteriana in situ) sirve de control para comparar el tipo bacterias de placa bacteriana que crecen in vitro (práctica 7).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	92/218

CUESTIONARIO

1. Mencione ¿cuáles son los microorganismos cariogénicos y cuales los relacionados con la enfermedad periodontal?
2. Mencione ¿a qué se debe el cambio de color del medio en los tubos sembrados y la producción de burbujas?
3. Explique ¿qué es y a que se debe la formación de una película blanca alrededor del alambre en su experimento? Si no se forma explique sus causas.
4. ¿Qué es el tártaro dentario?

BIBLIOGRAFÍA

- Liébana, J. Microbiología oral. *Granada: Mc Graw Hill Interamericana*. 2002. 22-24
- Negroni, M. Microbiología estomatológica. Buenos Aires Ed. Médica Panamericana. 2000, 481-488
- Brooks, G. Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica 25a. México McGraw Hill. 2011, 11-13
- Burrows, W. Tratado de microbiología (No. 576 B877 1979.). Interamericana. 1974
- Mouton Christian, Robert Jean-Claude, Bacteriología Bucodental. Barcelona. Editorial Masson S.A. P.p19-46
- Seneviratne, C. J., Zhang, C. F., & Samaranayake, L. P. (2011). Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res*, 14(2), 87-94.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	93/218

PRÁCTICA 10

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE BIOPELÍCULA DENTAL

OBJETIVO

Identificar a los microorganismos presentes en la biopelícula por medio de medios de cultivo específicos, destacando la morfología colonial y microscópica de cada uno de ellos.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La placa dental fue descrita por primera vez en 1898 por Black, como una masa microbiana que recubría las lesiones cariosas. En 1976, Bowen define a la placa dental como depósitos blandos que forman una biopelícula que se adhiere a la superficie dentaria o a otras superficies duras de la boca. En el año 2000, Marsh y Martín, definen a la placa dental como una comunidad microbiana compleja que se encuentra en la superficie de los dientes, embebida en una matriz de origen microbiano y salival.

La biopelícula se clasifica según su localización en supragingival y subgingival, según sus propiedades en adherente y no adherente, y por su potencial patogénico en cariogénica y peridontopatogénica. La biopelícula supragingival está constituida principalmente por microorganismos Gram positivos capaces de producir azúcares relacionados con la caries dental; esta placa se puede extender hacia el surco gingival y entrar en contacto con la encía denominándose placa marginal.

La biopelícula que se encuentra en el interior del surco gingival es la que recibe el nombre de biopelícula subgingival y está constituida principalmente, por microorganismos de tipo anaerobio proteolíticos Gram negativos periodontopatogénicos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	94/218

La biopelícula es un medio donde se realiza intensa actividad metabólica por parte de los microorganismos que en ella se encuentran dando por resultado alteraciones en los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal donde se localiza.

Según Marsh, *Streptococcus sanguis* es el primer microorganismo en colonizar la película adquirida y posteriormente se une a *Actinomyces viscosus* lo cual para algunos autores es prerequisite para la posterior colonización de especies como *Veillonella* y *Fusobacterium*. Otras bacterias involucradas en el proceso de colonización son estreptococos del grupo oralis (*Streptococcus oralis* y *Streptococcus mitis*), *Actinomyces sp.*, *Neisserias sp.*, y *Haemophilus sp.*

Se han descrito coagregaciones entre *S. sanguis* con *A. viscosus* y entre *Capnocytophaga ochracea* con *A. viscosus*. También entre especies Gram positivas con Gram negativas como *Streptococcus sp.* o *Actinomyces sp.* con *Prevotella sp.* y *Porphyromonas sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella sp.*, y entre especies Gram negativas como *Prevotella melaninogenica* con *F. Nucleatum*. En las últimas fases de formación de la placa, es probable que predomine la coagregación entre especies Gram negativas anaerobias como *F. nucleatum* con *Prevotella gingivalis*, este fenómeno provee las condiciones para la interacción patógena característica de las infecciones periodontales.

La matriz intercelular de la placa dental madura, está formada por productos microbianos, células (epiteliales y leucocitos), materiales orgánicos (polisacáridos, proteínas y glucoproteínas) e inorgánicos (calcio y fósforo) derivados de la saliva y el fluido gingival (crevicular). Esta matriz intercelular es el medio donde se producen las interacciones metabólicas entre las diferentes especies microbianas).

Durante la fase de colonización primaria de los microorganismos existe multiplicación activa, posteriormente, existe una disminución en la velocidad de crecimiento de algunos de ellos y se incorporan otros que son transportados por los mismos mecanismos que utilizaban los primeros que llegaban a la película adquirida. No obstante, aunque se siguen dando los procesos adhesivos, lo más característico de esta etapa, son los fenómenos de agregación y en especial de coagregación, siendo estos últimos los que incluyen uniones heterotípicas entre especies pertenecientes a géneros diferentes entre las que destacan las de tipo lectina-carbohidrato.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	95/218

De esta forma, la estructura de la placa cambia sensiblemente, hay un incremento de formas bacilares y aparecen las típicas imágenes de forma de mazorca de maíz (coagregación de cocos sobre bacilos) y mixtas.

La síntesis de polisacáridos extracelulares especialmente mutanos, por estreptococos del grupo mutans, contribuyen de manera importante a la integridad de la placa, estos polisacáridos extracelulares junto con dextranas y levanas de estos y otros estreptococos, siguen originando microcolonias que cada vez se harán más confluentes. Es importante mencionar que después de pasado cierto tiempo los estreptococos a partir de la glucosiltransferasas habrán tenido la oportunidad de producir mayor cantidad de polisacáridos adherentes por lo que los lactobacilos disponen ya de mallas más complejas para quedar retenidos.

MATERIAL y REACTIVOS

- 1 Tubo de 16 x 15 con 15 ml. de medio base rojo de fenol más sacarosa al 5% más placa microbiana y saliva.
- 1 Caja con agar sangre
- 1 Caja con agar Staphylococcus- 110
- 1 Caja con agar Rogosa
- 1 Caja con Agar Streptococcus- mitis- salivarius (SMS)
- 1 Mechero
- Porta objetos
- Asa bacteriológica
- 1Equipo de Gram

EQUIPO

- Microscopio
- Incubadora
- Refrigerador

SERVICIOS

- Luz, agua, gas

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	96/218

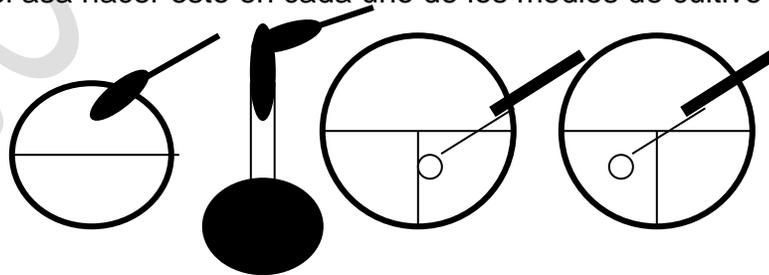
PROCEDIMIENTO

1. Sin agitar, tomar muestra con un hisopo esteril (donde hubo formación de placa microbiana)
del tubo con medio de sacarosa 5% + placa bacteriana + saliva y sembrar por estría cruzada, para el aislamiento de microorganismos en los siguientes medios de cultivo:
 - a. Agar sangre (medio enriquecido)
 - b. Agar Staphylococcus-110 (medio selectivo para Staphylococcus)
 - c. Agar Rogosa (medio selectivo para Lactobacillus).
 - d. Agar Streptococcus-mitis salivarius (SMS). (medio selectivo para Streptococcus).

Método de estría cruzada:

- a. Con un hisopo, sembrar en el primer cuadrante del medio de agar, procurando de hacer estrías juntas y de no picar el medio. Hacer esto en los 4 medios de cultivo.
- b. Una vez sembrado, el primer cuadrante de todos los medios, con el asa estéril calor, sembrar el segundo cuadrante ; volver a esterilizar el asa y sembrar el tercer cuadrante realizando pocas estrías y separadas y esterilizar por último el asa hacer esto en cada uno de los medios de cultivo

ESQUEMA:



1. Incubar a 37°C durante 24 horas.
2. Realizar un frotis de la placa microbiana formada, tomando la muestra con un hisopo estéril, en un porta objeto limpio y desengrasado, fijar al calor y teñir mediante la técnica Gram. Observar al microscopio con los objetivos 40x y 100x.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	97/218

RESULTADOS

1. Reportar si hay crecimiento en los 4 medios de cultivo.
2. Si hubo crecimiento, registrar en una tabla la descripción de la morfología colonial en cada uno de los medios, además del tipo de hemólisis en el medio de agar sangre.
3. Describir e ilustrar la observación del frotis de placa bacteriana en el objetivo 100x.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	98/218

CUESTIONARIO

1. ¿Qué papel juegan los microorganismos anaerobios en la placa dental?
2. ¿Qué papel se atribuye a Veillonella, dentro de la placa microbiana?
3. ¿Por qué se considera necesario evitar el desarrollo de la placa?
4. Si en alguno de los medios de cultivo, no hubo crecimiento, explique porque.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	99/218

BIBLIOGRAFÍA

1. Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid España. Editorial Mc Graw Hill. 2002: 541-559
2. Marta Negroni. Microbiología Estomatológica Fundamentos y Guía práctica. 1ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1999: 89-217
3. Mouton Christian, Robert Jean-Claude, Bacteriología Bucodental.
4. Barcelona. Editorial Masson S.A. P.p19-46



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	100/218

PRÁCTICA 11

IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS FACTORES DE RIESGO PARA CARIES DENTAL

OBJETIVO

Al término de esta práctica el alumno comprenderá la multifactorialidad del proceso de caries y estará en posibilidad de identificar a pacientes con riesgo para padecerla en el futuro mediano a través de la realización de un “Cariograma”.

FUNDAMENTO TEÓRICO

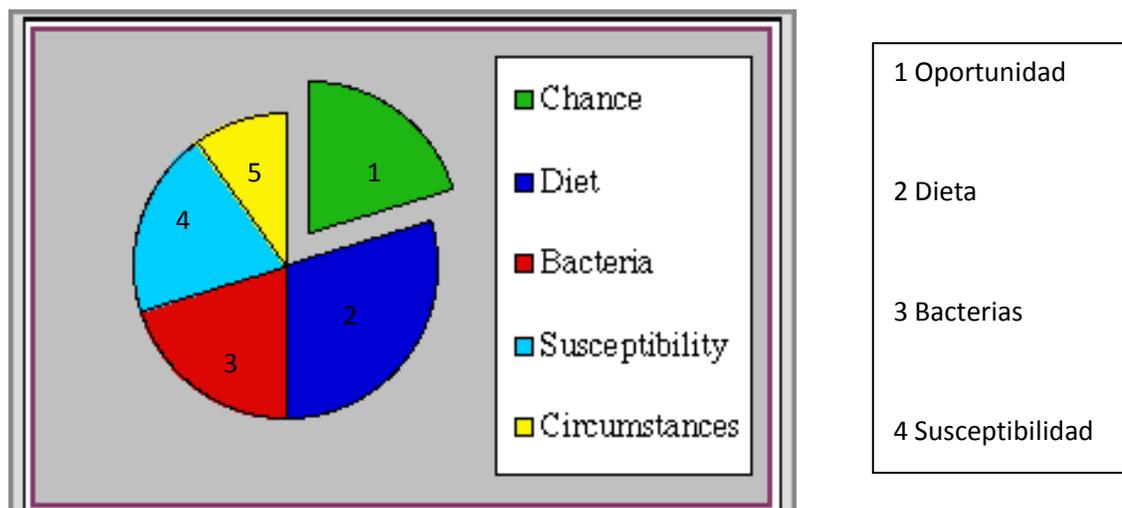
La caries dental es un proceso infeccioso de etiología microbiana, ampliamente diseminado en la población, que por sus características de evolución, se considera una de las principales enfermedades que son la causa de la pérdida de los órganos dentarios. De aquí el interés de los profesionales de la salud bucal en prevenirla y prueba de ello, son todas las acciones que hasta la fecha se promueven de forma general a la población en diferentes servicios de salud y las campañas nacionales de salud bucal organizadas por la Secretaría de Salud.

Los factores que están relacionados con este proceso son muchos como: genéticos, presencia de microorganismos cariogénicos, dieta anatomía, posición y composición dental, característica y composición de la saliva y hábitos higiénicos, entre otros.

El Dr. Brathall y colaboradores en la Facultad de Odontología de la Universidad de Malmö en Suiza, diseñaron un método para predecir el “futuro mediano” (del momento en que se realiza hasta un año aproximadamente) del estado de caries en un individuo, basado en diferentes factores considerados de riesgo relacionados entre sí, al que le dieron el nombre de “Cariograma”, el cual incluye diferentes variables incluidas en un círculo:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	101/218



- 1.- OPORTUNIDAD: la posibilidad de evitar la aparición de nuevas lesiones de caries
- 2.- DIETA: La ingestión de alimentos así como su contenido
- 3.- BACTERIAS. La cantidad de placa acumulada y el tipo de bacterias.
- 4.- SUSCEPTIBILIDAD: se refiere a la resistencia del diente (fluoruros) y las características de la saliva.
- 5.- CIRCUNSTANCIAS: la experiencia pasada de caries (CPO), la presencia de enfermedades sistémicas y sus condiciones.

Los puntos más importantes a considerar cuando se utiliza el “Cariograma” para evaluar el riesgo son:

La posibilidad de evitar la aparición de nuevas lesiones cariosas debe ser entre 0 y 100% (no puede ser negativa o mayor al 100%)

Las circunstancias son importantes sumadas a la dieta, bacterias y susceptibilidad.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	102/218

La predicción basada en los puntos anteriores es posible ajustarla al “ojo clínico”.

DIETA. En cuanto a la dieta los puntos más importantes a considerar para calcular o medir el porcentaje son:

La frecuencia de los alimentos. En 1940, Stephan hizo un estudio donde demuestra que después de la ingestión de los alimentos, (sobre todo aquellos que contienen azúcares) existe una disminución temporal del pH salival, lo cual condiciona el “ataque o bombardeo” de ácido salival que puede desmineralizar los órganos dentarios.

La concentración de sacarosa en los alimentos. La sacarosa es considerada por muchos autores como el “azúcar asesino”, ya que está compuesta por glucosa y fructuosa, que son el sustrato adecuado para que los microorganismos produzcan ácidos que promueven la desmineralización de los órganos dentarios.

SUSCEPTIBILIDAD. Para medir la susceptibilidad, se deben considerar aspectos mensurables (medibles) de los dientes y la saliva como: Si existen en los dientes anatomía y/o posición adecuadas, integridad del esmalte, presencia de aditamentos o restauraciones adecuadas o inadecuadas, entre otros. En cuanto a la saliva: si la secreción es adecuada en cantidad (1,500ml por día aprox.), si posee o no mecanismos de defensa como capacidad amortiguadora o presencia de enzimas antimicrobianas, entre otros.

CIRCUNSTANCIAS. Aquí, se consideran la experiencia pasada de caries (índice CPO), la presencia de enfermedades sistémicas que pueden estar relacionadas por sí mismas (como la diabetes) o por su tratamiento (como la hipertensión) con el riesgo de padecer caries. Por ejemplo en el caso de la diabetes, existe una descompensación del balance hídrico, lo que hace que la cantidad de saliva que normalmente se secreta por día, se disminuya, situación que favorece la instalación y metabolismo de microorganismos en las superficies dentales para la producción de caries; en el caso del tratamiento de pacientes que padecen hipertensión arterial, requieren de la toma periódica de



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	103/218

antihipertensivos y se ha comprobado que algunos de ellos, producen resequedad bucal, lo que al igual que en el caso anterior, favorece la instalación y el metabolismo microbiano en las superficies dentales con la subsecuente desmineralización de los mismos.

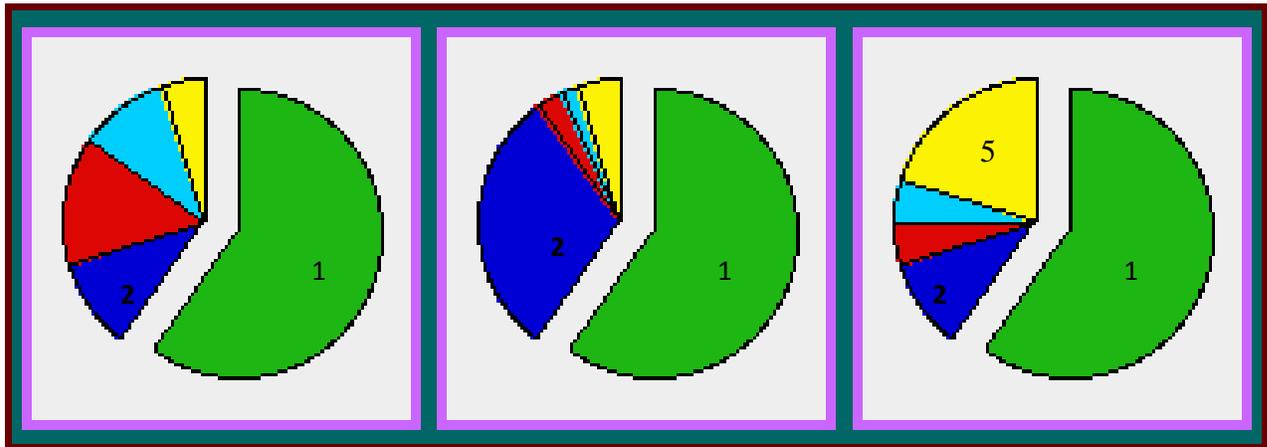
BACTERIAS. El porcentaje de este rubro se marca con base en la cantidad de placa acumulada en las superficies dentales (IHOS) y el tipo de bacterias presentes en la saliva (recuento de estreptococos mutans y lactobacilos o recuento total de bacterias en saliva). En esta práctica con relación al número de bacterias, se llevará a cabo el recuento de estreptococos mutans en saliva por la técnica de Matsukubo y col. Modificada (descrita en la metodología), para considerarlo en el espacio correspondiente a bacterias, con una asignación de porcentaje.

De 0 a 100% con base en el resultado obtenido en los tubos correspondientes. Esta técnica ha recibido gran aceptación, y a nivel comercial, ya existen pruebas para hacer el recuento no solo de estreptococos sino también de lactobacilos en saliva, que se pueden llevar a cabo en el consultorio dental, lo que facilita al profesional, llevar a cabo esta prueba como un medio predictivo con relación al proceso de caries en un individuo y aplicar o prescribir medidas preventivas, que permitan el control de este padecimiento, modificando en la medida de lo posible los factores relacionados con el mismo.

En esta práctica se realizará un ensayo de “cariograma”, para determinar con base en las variables antes mencionadas, el riesgo para la aparición de nuevas lesiones de caries en un futuro mediato (un año aproximadamente). Mientras más pequeños sean cada uno de los espacios correspondientes a cada una de las variables exceptuando la oportunidad, menor será la probabilidad de que existan nuevas lesiones de caries, así por ejemplo:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	104/218



- 1.- OPORTUNIDAD DE NO PADECER CARIES
- 2.- DIETA
- 3.- BACTERIAS
- 4.- SUSCEPTIBILIDAD
- 5.- CIRCUNSTANCIAS

BAJO RIESGO DE CARIES MENOS DE 60% DE OPORTUNIDAD DE EVITAR LA APARICIÓN DE NUEVAS LESIONES.

IZQUIERDA: Todos los factores están reducidos, resultando en un riesgo para caries reducido.

EN MEDIO. La dieta es poco favorable, pero los otros factores la compensan.

DERECHA. Las circunstancias en general, son las poco favorables, ya que por ejemplo, existe un CPO muy elevado (gran experiencia pasada de caries), pero el resultado en los otros factores, ha permitido que la situación se encuentre bajo control.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	105/218

Con base en el ejemplo anterior, podemos darnos cuenta de que los factores involucrados en el “cariograma”, pueden ser tan diferentes, que puede existir gran cantidad de combinaciones, que den lugar al mismo número de predicciones.

MATERIAL y REACTIVOS

- 1 Explorador
- 1 Espejo dental
- 1 Punta de pipeta Ependorff limpia
- 1 Tubo con caldo mitis salivarius con bacitracina y telurito de potasio
- 1 Mechero
- 1 Tubo de kahn limpio
- 1 gradilla

EQUIPO

- Refrigerador
- Incubadora

SERVICIOS

- Luz, agua, gas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	106/218

PROCEDIMIENTO

1. Una persona del equipo (de preferencia la misma a la que se le tomó la muestra de placa microbiana), colocará una muestra de saliva pequeña en el tubo de Kahn.
2. Tomar de la muestra de saliva, 100 microlitros y sembrarlos en el tubo de caldo mitis salivarius.
3. Incubar a 37°C durante 24 horas con una inclinación de 60° aproximadamente.
4. Después de 24 horas, colocar el contenido del tubo escurriéndolo bien y de una sola intención en un recipiente esterilizable.
5. Frente a una fuente de luz adecuada, se procede a contar el número de colonias en las paredes del tubo, reportando los resultados de la siguiente manera:

- a. Si no aparecen colonias en las paredes del tubo.....0= corresponde a no infectado (no existe S. mutans identificable en la saliva)

PORCENTAJE PARA EL CARIOGRAMA = 0

- b. Si el número de colonias es menor de 10+ = baja infección(menos de 30,000 células de S. mutans en saliva)

PORCENTAJE PARA EL CARIOGRAMA = 25

- c. Si el número de colonias es mayor a 10 pero menor de 100.....++= moderada infección (entre 30,000 y 100,000 células de S. mutans en saliva)

PORCENTAJE PARA EL CARIOGRAMA = 50

- d. Si el número de colonias es mayor de 100 pero menor de 300..... +++= alta infección (más de 100,000 células de S. mutans en saliva, pero menos de 1, 000 000)

PORCENTAJE PARA EL CARIOGRAMA = 75

- e. Si el número de colonias es mayor de 350 dándole al tubo la apariencia de un cristal nevado..... ++++ = más de 1,000 000 de células de S. mutans en saliva).

PORCENTAJE PARA EL CARIOGRAMA = 100



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	107/218

6. Levantar el IHOS a la persona que donó la muestra de saliva.
7. Levantar el índice CPO a la persona que donó la muestra de saliva.
8. Interrogar al donador acerca del padecimiento de enfermedades sistémicas y si actualmente se encuentra bajo tratamiento y en caso de ser afirmativo cual es el medicamento que está tomando y en que dosis.

RESULTADOS

Reportar los datos obtenidos y hacer una aproximación del cariograma con los mismos.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	108/218

CUESTIONARIO

1. Mencione por lo menos dos factores de riesgo para caries no considerados en este documento.
2. Diga a qué se debe que los estreptococos se adhieran a las paredes del tubo.
3. En el caso de que la prueba se hubiera realizado en un niño de 10 años de edad, cuya dentición mixta se encuentra presente y el resultado del cariograma fuera de alto riesgo para caries, ¿cuál sería su actitud profesional con el paciente?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	109/218

BIBLIOGRAFÍA

1. Anders Thylstrup, Fejerskov Ole. Caries. Edit. Ediciones Doyma Barcelona, 1988
2. Silverstone. Caries Dental etiología patología y prevención. México. Edit. El Manual Moderno 1985.
3. Macfarlane T. Wallace, Samaranayake Lakshman P. Oral Microbiology. London Edit. Butterworth & Co. Publishers. 1989
4. Matsukubo T. et al. A semicuantitativa Determination of **Streptococcus mutans** using the Adherent Ability in a Selective Medium Caries. Caries Res. 1981 15, p.p 40-45.
5. Rodríguez Miró M.J. et al. Streptococcus mutans. Su relación con la Actividad Cariogénica. Rev. Cubana Estomatológica. 1989. 26 jul-sept. P.p 191-206.
6. <http://www.db.od.mah.se/car/data/riskprincip.html>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	110/218

PRÁCTICA 12

DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA DE ALGUNOS AGENTES DESINFECTANTES

OBJETIVO

Que el alumno conozca la acción que estos agentes tienen sobre el crecimiento bacteriano, para que pueda en el futuro escoger el tipo de agentes adecuados para ciertos propósitos desinfectantes en su práctica profesional.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El uso de agentes químicos como medio de prevenir infecciones se introdujo por primera vez en el campo de la medicina. En 1847, Semmlweis notó la muy alta frecuencia de muerte por fiebre puerperal en la clínica y creyó que los médicos y practicantes eran los responsables por contaminar a los pacientes, lo cual disminuyó bastante la mortalidad al introducir el uso de una solución clorinada mezclada con limón. Lister, el padre de la cirugía aséptica, introdujo el uso de soluciones acuosas de fenol para tratamiento de heridas y para desinfectar el material quirúrgico, también para desinfectar la piel antes de operar.

La exposición de los microorganismos a concentraciones bajas, moderadas o altas, de agentes germicidas producen varios efectos que van del estímulo a la muerte. Esta variación en la actividad de los agentes germicidas sobre los microorganismos se refiere al espectro desinfectante, el cual puede ser separado en 3 zonas de acuerdo con el efecto del germicida. A extremadamente bajas concentraciones el agente puede no afectar al microorganismo. A concentraciones ligeramente más altas puede haber una estimulación del crecimiento. A concentraciones mayores se obtiene inhibición del crecimiento.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	111/218

Una bacteria se considera muerta si es incapaz de multiplicarse en un ambiente óptimo. Cuando los microorganismos se exponen a ciertos agentes químicos como los mercuriales orgánicos por periodos cortos, pueden ser revividos si se cultivan en un medio que contenga grupos sulfhidrilo libres, por tanto la acción de los mercuriales bajo estas condiciones, se considera bacteriostática. Un agente bacteriostático es el que inhibe la reproducción microbiana. Un agente bactericida es el que tiene una acción irreversible que resulta en muerte de la célula microbiana. Los germicidas y desinfectantes actúan como agentes bactericidas si se usan en concentraciones adecuadas, mientras que los antisépticos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos. La diferencia básica entre estos dos tipos de acción está determinada por la concentración y tiempo de exposición.

Las propiedades deseables de agentes químicos recomendados para desinfección son:

1. Habilidad para destruir a los microorganismos a bajas concentraciones en pocos minutos, poseer amplio espectro microbiano.
2. Permanecer estables en agua y otros vehículos sin perder su poder de matar.
3. Que no sean tóxicos para los tejidos (relativamente).
4. Buen poder de penetración a superficies donde se aplique y que no se combine con la materia orgánica.
5. Que no sean corrosivos y que no tiñan.

AGENTES QUÍMICOS

ÁLCALIS ACIDOS

Son activamente bactericidas, la presencia de moléculas no disociadas altamente permeables promueve la penetración del ácido dentro de las células.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	112/218

SALES:

El cloruro de sodio se ha usado por muchos años como preservativo de carnes y pescados por impedir el crecimiento bacteriano.

METALES PESADOS:

Entre ellos Hg^{++} y Ag^+ encabezan la lista, siendo efectivos a menos de 1 ppm. Su acción antimicrobiana se debe a la combinación del ión metálico con ciertas proteínas de la célula microbiana; estas se inactivan, precipitan y finalmente producen la muerte

HALOGENOS (IODO)

Se combina irreversiblemente con proteínas, es un agente oxidante, es bactericida y se utiliza en la desinfección de piel o para heridas menores

AGENTES ALQUILANTES

Como el formaldehído o el óxido de etileno que reemplaza el débil enlace H de los grupos -NH₂ y -OH abundantes en proteínas.

Las reacciones del formaldehído son en parte reversibles, para la alta energía de los puentes epóxido de etileno permiten reacciones irreversibles. Estos agentes alquilantes en contraste con otros desinfectantes son tan activos contra esporas como con células vegetativas.

FENOL:

Su acción bactericida involucra la lisis celular. Los compuestos fenólicos son más activos mezclados con jabones que incrementan su solubilidad y promueven su penetración



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	113/218

ALCOHOLES:

La acción desinfectante de los alcoholes alifáticos incrementa con la longitud de su cadena. Su mecanismo de acción consiste en la desnaturalización de proteínas por inhibición de la producción de metabolitos esenciales. Aunque el alcohol etílico ha recibido mayor uso es mejor el alcohol isopropílico ya que es menos volátil y no está sujeto a las restricciones del alcohol etílico por poderse ingerir. Es más efectivo en la solución acuosa al 50 o 70% que absoluto.

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO:

Su nivel de desinfección es alto. La acción antimicrobiana se debe fundamentalmente a la oxidación de los componentes de la célula microbiana.

El peróxido de hidrógeno en concentraciones del 6% y 10% posee altos niveles de actividad bactericida y esteriliza químicamente en inmersión durante 30 minutos, aunque en esas concentraciones es irritante para los tejidos y corrosivo para el instrumental.

En solución al 3% aún cuando su acción es limitada por la presencia de materia orgánica e inhibida por la catalasa de las bacterias y los tejidos, es útil en la antisepsia de las heridas y elimina mecánicamente restos de tejidos y microorganismos atrapados en ellas por el burbujeo que genera la liberación de oxígeno.

MATERIAL y REACTIVOS

Yodo, Lugol 5%
Benzal 5%
Alcohol 70%
Fenol 10%
Peróxido de hidrógeno al 3%
Jabón líquido de manos
2 Cajas de agar nutritivo
1 tubo con discos de papel filtro estériles
1 asa bacteriológica
1 gradilla



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	114/218

CEPAS

Salmonella typhi

Staphylococcus aureus

EQUIPO

Incubadora, refrigerador

SERVICIOS

Luz . agua y gas

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar masivamente con una asa estéril Salmonella typhi, en una caja de agar nutritivo etiquetar con el nombre de la cepa, y la otra caja con Staphylococcus aureus.
2. Humedecer 1 disco de papel filtro, con una de las soluciones desinfectantes proporcionadas.
3. Colocar el disco humedecido sobre una porción de la caja sembrada masivamente. Realizar el paso 2 y 3 con cada una de las soluciones y repartir los discos alrededor de la caja, etiquetando previamente con el nombre de cada solución.
4. Incubar durante 24 horas a 37°C. Observar si hubo inhibición de crecimiento bacteriano.

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	115/218

RESULTADOS

Reportar el tamaño del diámetro del halo de inhibición que se presenta en las cajas de Petri.

MICROORGANISMO	LUGOL	BENZAL	H ₂ O ₂ 3%	FENOL	JABÓN	ALCOHOL
<i>Salmonella typhi</i>						
<i>Staphylococcus aureus</i>						

Concluya acerca de la acción de los agentes químicos utilizados de acuerdo a sus resultados



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	116/218

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es el coeficiente fenólico y cuál es su utilidad?
2. ¿Cuál es la diferencia entre agente bactericida y bacteriostático?
3. ¿Qué características debe tener un desinfectante para esterilizar instrumental y cuáles para desinfectar piel?

BIBLIOGRAFÍA

1. -D.Davis; Dulbecco Renato; N.Eisen H; Ginsberg HS. Tratado de Microbiología. 4ª ed. Editorial Masson. Barcelona. 1996: 58-59
2. -Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. Microbiología Médica de Jawetz 16ª ed. Editorial El Manual Moderno. México, 1999. 179-216.
3. Ryan K.J. Ray C.G Sherris Microbiología Médica 4ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. México 2004. 193-202
4. <http://www.encolombia.com/medicina/ginecologia/obste52101-ignaz.htm>
5. Marta Negroni. Microbiología Estomatológica Fundamentos y Guía práctica. 1ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1999: 85-100



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	117/218

PRÁCTICA 13

ESTRUCTURA EUCARIÓTICA DE HONGOS Y PARASITOS

OBJETIVO

- Conocer la diferencia entre los organismos eucariotes y procariotes
- Conocer los principales hongos y parásitos que se encuentran o se pueden encontrar en cavidad bucal.
- Conocer la utilidad de la técnica de laboratorio del microcultivo para la observación de hongos.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los hongos se encuentran dentro del reino Fungi de la clasificación de Whittaker, ya que presentan células de tipo eucariótico (con núcleo rodeado por membrana), se nutren por absorción y su forma de agrupación es unicelular (como las levaduras) o multicelular y/o multinucleada. Estos se asemejan a las plantas, pero no presentan clorofila.

Los protozoarios, se encuentran en el reino Protista. Estos organismos son eucariotes, ya que presentan un núcleo verdadero, con membrana nuclear, cromosomas múltiples y un aparato mitótico. En la tabla I se encuentran las principales diferencias entre organismos eucariotes y procariotes



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	118/218

CARACTERÍSTICAS	PROCARIOTES	EUCARIOTES
Glucopéptidos en pared celular	+	-
Esteroides en membrana celular	-	+
Mesosomas	+	-
Membrana nuclear	-	+
División celular	-	+
Cromosomas	UNO SOLO	MÚLTIPLES
Complejo DNA-histona	-	+
Organelos citoplásmicos	-	+
Nucleolo	-	+

TABLA I. Principales diferencias entre células procariotes y eucariotes

Los mohos presentan un cuerpo vegetativo compuesto de filamentos largos ramificados; Cada filamento es llamado Hifa y el conjunto de hifas se llama micelio. Las hifas poseen una rígida pared de quitina, la cual puede presentar septos formando una hifa septada o no presentar septos formando una hifa no septada o cenocítica, que contiene muchos núcleos. Las paredes transversalmente divididas, dan la apariencia de un filamento compuesto de células.

El micelio se divide en dos porciones: el micelio vegetativo, que proporciona al moho los nutrientes y el micelio aéreo, que contiene las estructuras reproductoras.

En el esquema No 4. Se encuentran las estructuras de hifas, esporas y cuerpos fructíferos.

La pared celular de los hongos no poseen ácido murámico, que es característico de bacterias, algunos tienen quitina o celulosa en sus paredes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	119/218

Los hongos se dividen en grupos, basándose en el tipo de micelio (septado o cenocítico) y el tipo de reproducción, que se clasifica según sus esporas en sexual (tabla II) o asexual (tabla III). Las esporas difieren mucho en color, forma y tamaño; pueden contener más de un núcleo. Su morfología y origen, constituyen la base principal para la clasificación de los hongos que carecen de reproducción sexual. Algunas especies producen un tipo de espora y otros hasta cuatro.

Las esporas asexuales externas se conocen con el nombre genérico de conidios y se observan con frecuencia en hongos de interés médico. Pero con más frecuencia, este término se reserva para aquellas esporas que se forman por un proceso semejante a la gemación de los extremos de las hifas especializadas que reciben el nombre de conidióforos.

ESPORAS SEXUALES:

ESPORA

1) Ascosporas.

Descripción

Se forman dentro de un saco denominado asca, que resulta de la fusión sexual de dos células especializadas. Cada asca tiene 4 a 8 esporas, propias de los Ascomycetes.

2) Basidiosporas.

Se forman en el basidio, que es el resultado de la fusión de dos células especializadas; son propias de los Basidiomycetes.

3) Oosporas.

Se forman por la unión de dos células generalmente diferentes; son características de los Oosporas.

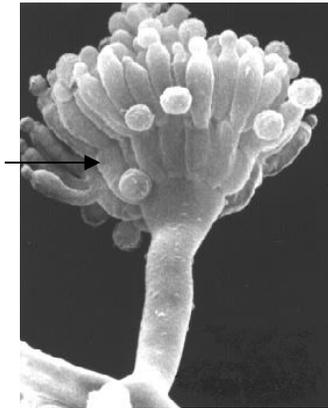
4) Zygosporas.

Forman por la unión de dos células generalmente similares; son características de los Zygomycetes.

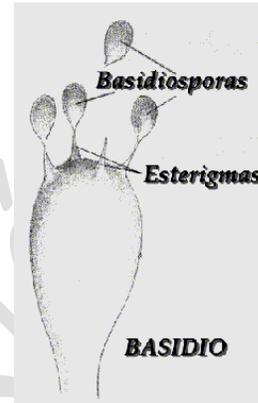
TABLA II. Diferentes esporas sexuales que pueden presentar los hongos

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	120/218

BASIDIOSPORAS



Esquema 2



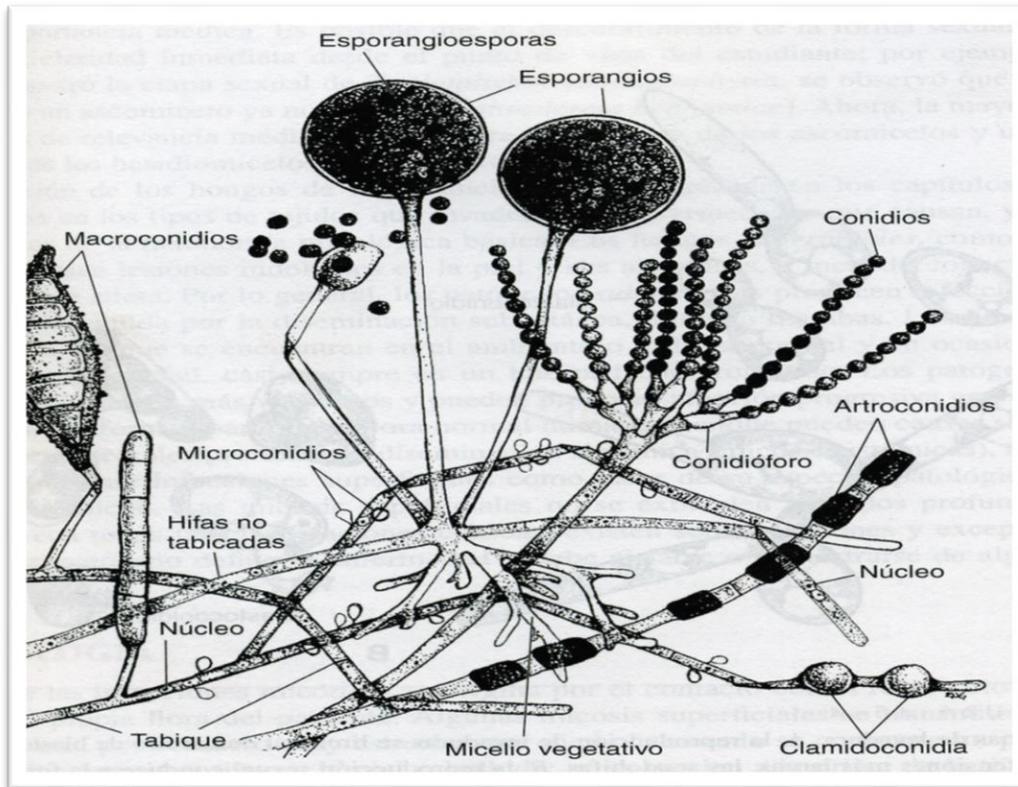
Esquema 3

TABLA III. ESPORAS ASEXUALES:

ESPORA

	Descripción
1. Artrosporas (del griego arthron, articulación)	Se forman de la fragmentación de una hifa separada
2. Blastosporas (del griego blastos, brote, yema)	Formadas por pseudomicelio en levaduras. Presentan gemación
3. Clamidosporas (del griego chlamy, manto)	Formadas por fragmentación del micelio; es una espora de pared gruesa, muy resistente al calor y la desecación.
4. Conidiosporas (del griego Konis, polvo)	Cadenas de esporas que se extienden aéreamente en las hifas reproductoras llamadas conidióforos.
5. Esporangiosporas (del griego angeion, vasos)	Son similares a las conidias, pero son formadas dentro de sacos llamados esporangios que están en el extremo de filamentos llamados esporangióforos.
6. Aleuriosporas. (del griego aleuron, harina de trigo)	Esporas que carecen de conidios, pero que se desarrollan sobre cortas ramas laterales o directamente sobre las hifas, más que en conidióforos especializados.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	121/218



ESQUEMA No. 4



Artrosporas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	122/218

En la clase Funghi Imperfecti o Deuteromycetos, no existen esporas sexuales, que incluye algunas levaduras patógenas como Candida.

Las levaduras como Candida albicans, son cuerpos unicelulares ovales que pueden producir pseudomicelio. Estas levaduras se dice que son dimórficas porque producen levaduras unicelulares y micelio multicelular. Su reproducción puede ser sexual o asexual; generalmente se reproducen por gemación.



La estructura de los protozoarios es muy simple ya que son organismos unicelulares que se incluyen en varios subphylum; los protozoarios de importancia en cavidad bucal, son: Mastigophora o Flagelados, como Entamoeba gingivalis.

Otros organismos eucarióticos, que ejercen algún efecto en cavidad bucal, son los nemátodos, que son gusanos redondos, multicelulares, más complejos con aparatos más o menos organizados. Ejemplo: Trichinella spiralis.

En la tabla IV se muestran los principales organismos eucarióticos y su relación con patologías de la cavidad bucal.



MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	123/218

ORGANISMO	MORFOLOGIA	ENFERMEDAD EN CAVIDAD ORAL
	<u>HONGOS</u>	
MICROSPORIUM	Macroconidias fusiformes al final de la hifa	Dermatitis Labial
TRICHOPHYTON	Microconidias en forma de racimo de uvas.	Dermatitis Labial
EPIDERMOPHYTON	Macroconidias multiseptadas en grupos	Dermatitis Labial
CANDIDA ALBICANS	Levaduriforme unicelular con blastosporas, pseudomicelio.	Infección de canales de la raíz y al algodoncillo
GEOTRICHUM	Células rectangulares	Infección crónica de amígdalas
CRYPTOCOCCUS	Levaduriforme monofásica	Infección oportunista, úlcera del paladar, lesiones granulomatosas en lengua.
COCCIDIOIDES IMMITIS	Difásico, levaduriforme y micelio setado, artrosporas.	Papiloma labial y úlceras, granulomas.
BLASTOMYCES DERMATITIDIS	Difásico, levaduriforme y micelio setado . artrosporas.	Úlceras en mucosas oral
PARACOCCIDIOIDES BRAZILIENSIS	Difásico, levaduriforme, micelio con blastosporas y clamidosporas.	Granuloma dental después de extracción.
HISTOPLASMA CAPSULATUM	Difásico, levaduriforme, micelio con clamidosporas.	Úlcera de borde indurado en lengua, ápice dental y paladar .
ASPERGILLUS	Oportunista, monofásico micelio con conidioforo y conidiosporas	Lesiones en seno maxilar, sinusitis, paladar blando y epiglotis.
	<u>PROTOZOARIOS</u>	
<u>FLAGELADOS:</u>	Forma de pera 4 flagelos se alimenta de restos celulares	Se considera no patógeno, pero esta en gingivitis y úlcera gingival
TRICOMONAS TENAX	Cuerpos ovales dentro de células reticuloendoteliales.	Leishmaniasis muco cutánea de labios y carrillos
LEISHMANIA DONOVANI	Cuerpos ovales dentro de células retículo endoteliales	Kala-aza, transmitido por picadura de mosquito, lesión oronasal, paladar y fauces
<u>SARCODARIOS O AMIBAS:</u>	Flora normal, trofozoito unicelular con pseudópodos	Periodontitis, aislada de cálculo suave, lesión periodontal supurativa crónica y amigdalitis
ENTAMOEBAS GINGIVALIS	Cuerpos pequeños dentro de eritrocitos (esquizonte)	Trinquiniasis en lengua
<u>ESPOROZOARIOS:</u>	<u>HELMINTOS</u>	
PLASMODIUM MALARIAE	Larva enquistada en músculo esquelético	
NEMATODA TRICHINELLA SPIRALIS		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	124/218



Ejemplo de Candidiasis en Adulto



Ejemplo de Candidiasis en niño

(Fotos: cortesía de QFB. Patricia Vidal Millán, QFB. Pablo Juárez de los Santos)

MATERIAL Y REACTIVOS

Preparaciones fijas de las siguientes cepas de hongos:

- Trichophyton sp (Micelio y clamidosporas)
- Microsporium sp (Micelio y macroconidias)
- Geotrichum sp (Micelio y artrosporas)
- Aspergillus sp (Micelio, cuerpo fructífero, conidias)
- Alternaria sp (Micelio y macroconidias)

- Cepa de Candida sp
- Micro cultivo de Penicillium sp
- 1 tubo con crecimiento de una cepa de hongos
- 2 Portaobjetos
- 1 Cubreobjetos
- Asa bacteriológica
- 1 pinza de curación



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	125/218

I mechero
1 gradilla
1 frasco con azul de metileno
Formol 10%

EQUIPO

Microscopio
Refrigerador

SERVICIOS

Luz, agua, gas.

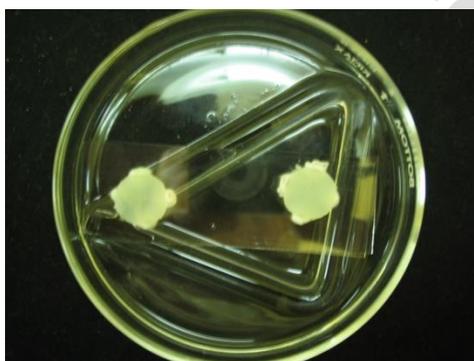
PROCEDIMIENTO

1. Observación microscópica de las preparaciones fijas de hongos.
2. Observación de la morfología colonial del tubo con crecimiento de una cepa de hongos.
3. A partir del microcultivo, practicar la tinción simple:
 - a. Con una pipeta Pasteur, desechar el glicerol y sustituirlo por formol al 10%. Dejar actuar por 1 hora.
 - b. Colocar una gota de azul de metileno en el centro de un portaobjeto limpio y desengrasado.
 - c. Con unas pinzas, separa el cubreobjetos del microcultivo
 - d. Colocar el cubreobjeto sobre la gota de colorante y presionar un poco sobre el cubreobjetos con el fin de eliminar las burbujas de aire. .
 - e. Observar al microscopio con los objetivos 10X y 40X.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	126/218

- f. A partir del porta objetos, se puede obtener otra preparación, quitando el medio de cultivo del porta objetos con una aguja de disección.
- g. Colocar una gota de colorante en el centro del crecimiento y colocar un cubre objeto limpio y presionar.
- h. Observar al microscopio



Ejemplo de microcultivo

(Foto: cortesía de QFB. Patricia Vidal Millán, QFB. Pablo Juárez de los Santos)

4. Observación de un hongo levaduriforme (Candida sp)

- a. En un porta objeto limpio, colocar una gota de agua con el asa.
- b. Cerca del mechero, tomar una asada del cultivo Candida sp. y homogenizar en la gota de agua, extendiendo procurando hacer un frotis delgado.
- c. Dejar secar al aire y fijar al calor, pasando dos o tres veces al portaobjetos por la flama del mechero.(rápido)
- d. Colocar una gota de azul de metileno sobre el frotis durante 1 minuto.
- e. Lavar con agua de la llave, procurando que el agua no caiga directamente sobre la preparación.
- f. Dejar secar al aire y observar al microscopio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	127/218

RESULTADOS

1. Haga esquemas de la morfología microscópica de los hongos observados, señalando cuales son levaduras, tipos de esporas y micelio.

2. Describa la morfología macroscópica del hongo observado en el tubo con crecimiento.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	0	128/218

CUESTIONARIO

1. Principal diferencia entre un moho y una levadura
2. ¿Qué es un microcultivo y para qué se utiliza?
3. ¿Qué es un protozoo y cuáles son los de importancia odontológica?
4. ¿Qué es una Tinción simple y cuál es su utilidad?
5. Compare entre las bacterias, hongos y parásitos que observó ¿cuáles son sus diferencias?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	129/218

BIBLIOGRAFÍA

1. Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid España. Editorial Mc Graw Hill. 2002: 11-43
2. Marta Negroni. Microbiología Estomatológica Fundamentos y Guía práctica. 1ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1999: 58-69
3. D.Davis; Dulbecco Renato; N.Eisen H; Ginsberg HS. Tratado de Microbiología. 4ª ed. Editorial Masson. Barcelona. 1996: 707-733
4. <http://www.mdpaquarium.com.ar/revista/explorando04-oct00.htm>
5. <http://www.cdeea.com/identificacion.htm>

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	130/218

PRÁCTICA 14

MANEJO DE MATERIAL DE VIDRIO EN LABORATORIO

OBJETIVO:

Reconocer y manejar en forma adecuada el material de vidrio del laboratorio por el alumno para el buen desarrollo de las prácticas de bioquímica

FUNDAMENTO TEÓRICO.

Para la realización de las prácticas en este laboratorio, es necesario recordar los nombres de los diversos instrumentos y equipo, así como también, su función, cuidados y modo de empleo, ya que dependerá de la habilidad, interés y buen uso que del material se haga, los resultados de las mismas.

El material de vidrio es delicado y requiere de una adecuada utilización, además del conocimiento de que para realizar una mezcla de soluciones, se utiliza ya sea un matraz volumétrico, que también nos sirve para medir una determinada cantidad de solución, o bien se puede emplear un matraz Erlenmeyer en caso de requerir además de mezclar, contener una determinada solución.

Cuando se requieran medidas exactas, entonces se podrán utilizar tanto pipetas, como probetas, entre otros.

El manejo de datos exactos en el laboratorio, está dado por la precisión con la que se miden las diversas sustancias con las que se realizan los procedimientos de laboratorio; la utilización del material de vidrio en forma adecuada permite en gran medida obtener datos confiables.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	131/218

Los estudios de laboratorio en los que se ven reflejados estos resultados pueden ser: biometría hemática, química sanguínea, concentración de algunas enzimas séricas, e identificación de algunos componentes dentales, entre otros

Estos instrumentos están hechos con materiales que soportan determinada presión y temperatura; por lo que se debe reconocer el material adecuado para realizar cada práctica.

Pipetas. Son cilindros de vidrio de pequeño diámetro y con abertura en sus dos extremos. Se pueden encontrar diversos tipos, dentro de los cuales están:

Volumétricas. éstas pueden ser aforadas por vertido, tienen un bulbo y limitan el volumen con una marca superior, pueden presentar una marca inferior, el extremo inferior termina en punta y el superior tiene un ensanchamiento con el fin de que los líquidos no alcancen la boca, se pueden encontrar en diferentes tamaños de acuerdo a su capacidad.

Serológicas. Consisten en un tubo de vidrio de diámetro uniforme marcado a intervalos regulares. Los intervalos entre las marcas de calibración dependen del volumen de la pipeta. Se llenan introduciendo la punta en el líquido y succionando por el otro extremo, con el pipeteador girando la rueda se logra un manejo preciso en la aspiración y dispensación de líquidos con el dedo y presionando la palanca lateral se logra un rápido dispensado del contenido completo. También se pueden pipetear por medio de succión de perillas de seguridad, las cuales por efecto de contracción, expulsan el aire de la pipeta y al dilatarse succionan el líquido,

Para vaciar las pipetas, se colocan en forma vertical tocando con la punta la pared de la vasija receptora y se mide el volumen observando la base del menisco de una marca a otra o hasta el límite requerido.

líquido en la punta, nunca se debe soplar para expulsarlo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	132/218

Buretas.- Es un recipiente de vidrio parecido a la pipeta graduada; puede estar graduada en cm^3 o en $1/10$ de cm^3 , con una llave de paso y pinza en su parte inferior. Se utiliza para medir en forma exacta cantidades variables de líquido. Para trabajar con ella primero se debe verificar que este perfectamente limpia y seca, colocarla en un soporte universal con unas pinzas para bureta con la punta hacia abajo y verificar que la llave está cerrada. Se deben llenar por la parte superior agregando el líquido mediante un embudo; al igualar a 0 se debe tener cuidado de que el desagüe de la bureta esté libre de burbujas y las lecturas se deben hacer unos 30 segundos después de haber extraído el líquido. Al igual que con las pipetas, la lectura se hace siempre con la parte inferior de menisco.

Matraz Aforado o volumétrico.- Es un recipiente en forma de pera, con base plana cuello largo, en el cual se encuentra la marca o aforo, de su capacidad, a diferencia de los otros utensilios volumétricos, no emite sino que contiene el volumen indicado. Los matraces volumétricos están calibrados para contener el volumen especificado a una temperatura dada, generalmente a 20°C . Un buen matraz tendrá un cuello estrecho, tapón esmerilado y una marca de nivel en el cuello, la cual permita ajustar bien el menisco para aforarlo exactamente. Todas las lecturas se hacen con la parte inferior del menisco.

Cuando se prepara una solución, es importante asegurarse de que los sólidos estén completamente disueltos antes de aforar el matraz.

Si un matraz aforado se calienta, deja de ser un aparato volumétrico para convertirse simplemente en un recipiente.

Matraz Erlenmeyer.- A diferencia del matraz volumétrico, este tiene la forma de un cono de base inferior y punta amplia. Se emplea mucho para hervir líquidos, ya que tiene una superficie grande de calefacción en la base, con lo que se logra que la ebullición sea más rápida. También se emplean en titulación y para preparar soluciones ya que por su forma, facilita la agitación sin que se derramen los líquidos tan fácilmente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	133/218

Probeta.- Es un cilindro de vidrio de un diámetro grande, sostenida por una base cilíndrica o hexagonal que puede ser de vidrio o de plástico. Su capacidad está dada por la última graduación, puede ser desde 5ml hasta 2000ml a 20°C Nos sirve para hacer mediciones rápidas con exactitud, sirve para trasvasar líquidos rápidamente. Es graduada para medidas de volumen, cuya escala está dividida según el volumen de la probeta. Para no cometer error de lectura se colocan en forma vertical y paralela a los ojos del observador

No se pueden usar en lugar de las pipetas o buretas, puesto que solamente miden el volumen aproximado.

Tubos de ensayo.- Los tubos de ensayo se utilizan en la práctica para diversos tipos de análisis. No se deben calentar por el fondo, sino cerca de la superficie del líquido y en forma inclinada para que éste no salga proyectado. Se les puede calentar directamente a la flama, retirándolos periódicamente para agitarlos y deberán estar secos por su cara exterior, ya que de lo contrario se romperían con suma facilidad. Para sostener los tubos se utilizan distintos materiales, según el caso: pinzas, gradillas o soportes de pie.

Vaso de precipitado.- Los vasos de precipitado o “beakers conocidos también como vasos de Berlín”, son los equivalentes en el laboratorio a las ollas en la cocina. Sirven para múltiples propósitos tales como contener, calentar, enfriar, disolver, mezclar, hacer reaccionar, entre otros. Estos recipientes son muy útiles y versátiles pero deben protegerse de los golpes accidentales, su principal causa de deterioro. Aunque tienen una graduación, su precisión es muy baja; se trata simplemente de vasos de vidrio con borde superior al estilo de jarra para facilitar el vertido de su contenido. Sus capacidades varían ampliamente desde los 50 hasta 5 000 ml.; son de forma cilíndrica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	134/218

Termómetro de Mercurio.- Se utiliza para medir la temperatura de un cuerpo o recinto y determinan temperaturas comprendidas entre 30 y 300°C, límites impuestos por la temperatura de solidificación y punto de ebullición del mercurio (-38.8°C/+357 °C). Algunas causas de error en la medida de la temperatura con termómetros de mercurio:

- 1) Envejecimiento del vidrio
- 2) La resistencia que opone el capilar al movimiento del mercurio.
- 3) Evaporación del mercurio cuando las temperaturas son altas.
- 4) La falta de tiempo para que la columna se estabilice.
- 5) Error debido a una falsa lectura o errores de paralaje.

Mecheros.- La calefacción es una de las operaciones más frecuentes en los trabajos de laboratorio, por lo cual la utilización del gas como medio de calefacción es el más generalizado y cómodo.

Existen diversos mecheros como el Bunsen y Fisher. Generalmente son metálicos, la altura y dimensión de los mismos varían desde los pequeños hasta los 18 ó 20 cm. De altura.

El mechero Fisher, se emplea para temperaturas muy elevadas. La temperatura máxima de la llama se logra regulando la entrada de aire de manera que sea algo mayor que la requerida, para producir llama no luminosa es aconsejable usar una rejilla metálica con tela de asbesto sobre un tripié cuando se calienta directamente un recipiente



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	135/218

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 pipeta de 0.1 ml
- 1 pipeta de 1.0 ml
- 1 pipeta de 5.0 ml
- 1 pipeta de 10.0 ml
- 4 tubos de ensayo de 13 x 100
- 4 tubos de ensayo de 18 x 150
- 1 gradilla
- 1 perilla de seguridad
- 1 vaso de precipitado de 50 ml
- 1 vaso de precipitado de 100 ml
- 1 matraz Erlenmeyer de 50 ml
- 1 matraz de Erlenmeyer de 100 ml
- 1 probeta de 100 ml
- 1 matraz aforado de 100 ml
- 1 embudo de vidrio
- 1 pinzas para tubo de ensayo
- 1 bureta de 50 ml
- 1 soporte universal
- 1 piseta



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	136/218

Reactivos: Cloruro de sodio
Solución Azul de metileno de concentración 10 mg/ml.
Ácido clorhídrico 0.1 M
Hidróxido de sodio 0.1 M
Solución Fenolftaleína
Agua destilada

SERVICIOS

Luz, Agua

PROCEDIMIENTO

1. Pipetear diversas cantidades de agua en los tubos de ensayo, y en la probeta, de acuerdo a las instrucciones del profesor.
2. Disolver los solutos según indique el profesor utilizando pequeñas cantidades de cloruro de sodio, adicionando agua en cantidades diferentes a los diversos matraces y vasos disponibles. Anote sus resultados.
3. Realizar una titulación, utilizando la bureta llena con ácido clorhídrico 0.1M colocada en un soporte universal, adicionándolo gota a gota en un matraz Erlenmeyer que a su vez contenga 15 ml de hidróxido de sodio 0.1M y 2 gotas de reactivo de fenolftaleína bajo las instrucciones del profesor.
4. Realizar un aforo a 100 ml con 2 ml de azul de metileno en un matraz aforado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	137/218

RESULTADOS

Reportar los resultados enfatizando las características de los diversos materiales empleados.

Realizar el esquema de la titulación y reportar la cantidad de ácido clorhídrico utilizado en la titulación

Esquematice el aforo del matraz con azul de metileno



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	138/218

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuál es el error de paralaje?
- 2.- ¿Qué es una titulación?
- 3.- ¿Cuáles son las diferencias entre los matraces y vasos de precipitados?
- 4.- ¿Cuál es la forma adecuada para manejar una pipeta? (Haga un dibujo)
- 5.- ¿Qué tipo de material se emplea para la fabricación del material de vidrio utilizado en el laboratorio?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	139/218

BIBLIOGRAFÍA

- Montes de Oca, P. Instrumentos de un laboratorio de química. México. Editorial VicMont; 1977.
- Oppenheim I. Manual para técnicos de laboratorio. México. Editorial Panamericana; 1973.
- Plummer D. Bioquímica práctica. México. Editorial McGraw-Hill Latinoamericana; 1981.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	140/218

PRÁCTICA 15

MANEJO DEL EQUIPO DE LABORATORIO

OBJETIVO.

El alumno debe conocer y aprender el funcionamiento, manejo y cuidados del equipo de laboratorio, con el propósito de que pueda realizar de manera adecuada sus prácticas de laboratorio.

FUNDAMENTO TEÓRICO.

La presente práctica permite al alumno integrar la función del laboratorio con los conceptos teóricos, ya que establece un vínculo de lo formativo a lo operativo, le permite reconocer la importancia del laboratorio clínico, como apoyo para integrar un diagnóstico nosológico.

Además de ubicar y reconocer los diferentes equipos de laboratorio.

Durante el desarrollo profesional y atención a los pacientes se cuenta con un valioso apoyo para poder llegar al diagnóstico final en varios casos; este apoyo es el laboratorio de análisis clínicos, que de acuerdo a las necesidades de cada profesional de la salud, se torna más versátil.

En el caso del cirujano dentista para la realización de procedimientos quirúrgicos es necesario solicitar por ejemplo: biometría hemática o bien determinación de



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	141/218

química sanguínea. Ambos estudios se realizan mediante la toma de muestra sanguínea, para posteriormente separar sus contenidos.

Para la cuantificación de biomoléculas, es necesaria una fuente luminosa (espectrofotómetro), que se orienta en forma específica sobre una superficie receptora (celdillas fotoeléctricas), que puede seleccionar la frecuencia o longitud de onda de dicha luz, además, cuenta con una celda o cámara en donde se coloca la muestra a medir (porta muestras) esta muestra tiene un color determinado que deberá de corresponder a la longitud de onda elegida para su lectura, siguiendo en forma lineal se encuentra un detector que mide la cantidad de la luz que logra pasar a través de la muestra, para ser medida y registrada.

De lo anterior se reconoce entonces una cantidad de luz absorbida (la que se encuentra dentro de la muestra), y una cantidad de luz transmitida (aquella que logra pasar a través de la muestra); la cantidad de luz absorbida depende directamente de la concentración de la sustancia que vamos a medir o registrar, a esta se le denomina absorbancia, por otra parte la fracción de luz que logra cruzar a través de la muestra se le denomina transmitancia.

Para que sea posible medir entonces una sustancia, se requiere de una coloración específica, ya coloreada dicha solución deberá de cumplir con una ley denominada de “**Lambert y Beer**”, en la cual se refiere que: “La cantidad de luz absorbida por una sustancia es directamente proporcional a la concentración del compuesto colorido de dicha sustancia”



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	142/218

El espectrofotómetro tiene dos escalas de medición una para la absorbancia y otra para la transmitancia, la característica de la escala de la transmitancia es que siempre será menor al valor de 100, en el caso de los analógicos, ya que los espectrofotómetros digitales dan el resultado directo.



Otro de los equipos empleados en el laboratorio es el **POTENCIÓMETRO**, que es un aparato para medir la fuerza eléctrica de las sustancias, dada por la difusión de los iones hidrógeno, al portar carga eléctrica dichos iones reciben el nombre de hidrogeniones.

Las partes del potenciómetro se reconocen fácilmente tiene un brazo móvil que porta dos tubos, uno de los tubos presenta su terminación con un bulbo sellado y en su interior contiene una solución ácida estable, sensible a los cambios de hidrogeniones que transmite su carga a través de un alambre de platino. El otro tubo tiene una terminación porosa que se pondrá en contacto con la solución a medir, y en el interior se encuentra un bulbo de mercurio con una pasta de calomel, que también transmite los cambios de cargas eléctricas a través de un hilo de platino que se encuentra sumergido en una solución de cloruro de potasio.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	143/218

Al sumergir ambos electrodos en una solución problema se establece un circuito eléctrico que capta la movilización de hidrogeniones de la solución problema, a través del electrodo poroso, transformando la energía química en energía eléctrica para poder medir dicha energía en una celda eléctrica y registrar el resultado.

Con el potenciómetro podemos medir el pH de la saliva, del sudor, de la sangre, la orina, así como también de los medicamentos y poder entender más fácilmente su aplicación clínica o bien estados patológicos que alteran a las funciones orgánicas con los cambios de pH.



Centrífuga clínica. Es empleada para la separación de solutos de líquidos y de sustancias no miscibles de una suspensión, como por ejemplo la sangre.

Se emplea la velocidad centrífuga que aunada al peso de cada sustancia que se coloca dentro de ella, sirve para separar sus componentes dada la aceleración provista por un motor y medida en un vástago central en la parte superior de la centrífuga.

Para su utilización es necesario recordar que el peso de las suspensiones a centrifugar se incrementa hasta en 716 veces, por lo que es sumamente peligroso su manejo en forma inadecuada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	144/218

Por lo menos se deberá de recordar que para introducir las soluciones a centrifugar debe observar lo siguiente:

- Introducir las suspensiones en un tubo de ensayo que a su vez deberá de colocarse dentro de una camisa metálica, siempre será en pares y colocando dichas camisas en polos opuestos.
- Se deberán de tarar las camisas ya con los tubos dentro de ellas, utilizando una balanza romana para que queden perfectamente equilibrados. Puede utilizar agua como equilibrante.
- Se deberá de colocar en el fondo una base de algodón o de hule para impedir la fractura de los tubos.
- Nunca abrir la tapa cuando esté en función el motor.**



BALANZA ANALÍTICA. Son balanzas que nos permiten pesar cantidades mínimas de sustancias, que pueden ser de gramos, decigramos, centigramos, miligramos y diezmilésima de gramo. Constan de un sistema de amortiguadores que son sumamente sensibles, las más actuales ya son digitales y facilitan grandemente el trabajo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	145/218

Dentro de los cuidados que debemos tener para su manejo están:

- a) Mantenerla libre de polvo.
- b) Debe estar colocada sobre una base que evite la vibración.
- c) Se debe verificar que esté nivelada antes de pesar.
- d) Se debe evitar el error de paralaje al momento de nivelar y de la lectura del peso.
- e) No pesar sustancias corrosivas o volátiles



MATERIAL Y REACTIVOS

Material:

Tubos de ensayo

Pisetas

Celdas para espectrofotómetro



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	146/218

Reactivos:

Carbonato de calcio

Solución de Azul de metileno de concentración 10mg/ml

Solución buffer para calibrar potenciómetro

Solución buffer problema.

EQUIPO

Balanza analítica

Balanza granataria (Romana)

Centrífuga clínica

Espectrofotómetro

Potenciómetro

SERVICIOS

Luz y agua



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	147/218

PROCEDIMIENTO

ESPECTROFOTÓMETRO

Construir una curva de calibración, mediante la utilización del espectrofotómetro de la siguiente manera:

* Calibrar el espectrofotómetro a 600 nm.		
* Pipetear en cada tubo de ensayo lo siguiente:		
Tubo Nº	agua (ml)	azul de metileno (ml)
1	5.0	---
2	4.5	0.5
3	4.0	1.0
4	3.5	1.5
5	3.0	2.0
6	2.5	2.5

* Vaciar uno por uno el contenido de cada tubo en orden creciente de concentración en una celda especial y leer cada absorbancia con el espectrofotómetro

* Anotar los resultados y construir la gráfica en un sistema cartesiano.

POTENCIÓMETRO

Calibrar el potenciómetro bajo la asesoría del profesor.

Medir el pH de saliva ó de una solución problema.

Anotar los resultados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	148/218

BALANZA ANALÍTICA:

Con la ayuda del profesor, verificar que la balanza está nivelada, tarar un papel y pesar 10mg de carbonato de calcio.

Anotar los resultados.

CENTRÍFUGA CLÍNICA

Hacer una suspensión con los 10mg de carbonato de calcio pesados en la balanza analítica más 10ml de agua.

Adicionar de dicha suspensión en 4 tubos 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 ml respectivamente.

Tarar los tubos para preparar e introducir a la centrífuga.

Centrifugar a 2000 revoluciones por minuto (RPM), durante 5 minutos.

Apagar la centrífuga, sacar los tubos y decantar, observar el resultado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	149/218

RESULTADOS

Anotar cada uno de los resultados obtenidos en el desarrollo de la práctica y discutirlos con sus compañeros de equipo y profesor.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	0	150/218

CUESTIONARIO

1. ¿A qué se refiere la Ley de Lambert y Beer?
2. ¿A qué se llama curva de calibración ó patrón?
3. ¿Cómo se hace una solución patrón?
4. Escriba dos ejemplos de condiciones que modifican el pH del cuerpo humano.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	151/218

5. ¿Cuáles son los diferentes pH de: saliva, bilis, sangre arterial, sangre venosa, jugo gástrico?

BIBLIOGRAFÍA

- Bhagavan N. Bioquímica. 2^o ed. México. Editorial Interamericana; 1978.
- Lehninger A. Bioquímica. 2^a ed. Barcelona. Ediciones Omega; 1979.
- Oppenheim I. Manual para técnicos de laboratorio. México. Editorial Panamericana; 1973.
- Plummer D. Bioquímica práctica. Latinoamérica. Editorial McGraw-Hill; 1981.
- Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 7^o ed. México. Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1989.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	152/218

PRÁCTICA 16

CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE LA SALIVA

OBJETIVO

Comprobar la capacidad de la saliva como solución amortiguadora; además, discutirá el papel que juegan la saliva y los alimentos en la producción de caries.

MARCO TEÓRICO

Las soluciones amortiguadoras (buffer) en los organismos se distribuyen en diversos compartimentos. En el extracelular se concentran la mayoría, dado que debe mantener el pH estable, lo que facilitará el equilibrio del pH, intracelular. Dicho equilibrio se denomina HOMEOSTASIS, para mantenerla, el organismo utiliza soluciones de carbonatos, fosfatos y proteínas, en lo que se refiere a la sangre, saliva, sudor y otras secreciones.

En esta práctica se estudia la capacidad amortiguadora en saliva debido a su relación con el ámbito profesional.

Se debe recordar además que las soluciones amortiguadoras citadas existen en los sistemas pulmonar y renal siendo este último de mayor importancia.

De acuerdo a la teoría de la caries de mayor difusión y aceptación, los alimentos ricos en sacarosa, favorecen la producción de la enfermedad dentocariosa, así como también, la mala higiene y/o técnicas de aseo bucal defectuosas, que no eliminan adecuadamente la fuente alimenticia de las bacterias cariogénicas.

La saliva es el primer mecanismo inespecífico de defensa de la cavidad bucal, además posee un sistema de regulación para evitar los cambios bruscos de pH. Éste sistema es más evidente en los procesos de masticación, que cuando no existe estimulación, sea olfatoria, visual o gustativa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	153/218

La saliva estimulada por sus componentes es un sistema amortiguador muy efectivo, dicho sistema de protección, puede alterarse cuando se afecta el estado de hidratación del individuo (falta de consumo de agua, diarrea, fiebre, entre otros), o bien cuando se está realizando algún estudio y las condiciones de recolección y manutención salival no son las adecuadas.

Diversos estudios reportan que los individuos con mayor capacidad amortiguadora en saliva, son menos propensos a la caries.

Las características fisicoquímicas de la saliva basal y estimulada son diferentes de acuerdo a su composición bioquímica, por ejemplo, la saliva basal contiene mayor cantidad de carbohidratos que la saliva estimulada, en tanto ésta última presenta abundantes proteínas y mayor cantidad de agua.

La saliva basal se produce principalmente en las glándulas submandibulares y sublinguales, en tanto que la estimulada en las parótidas.

El flujo salival es mayor durante la fase de estimulación cerebral, al igual que algunos de sus componentes.

MATERIAL Y REACTIVOS

1 Probeta de 50 ml

2 Vasos de precipitado de 50 ml

1 Bureta de 50 ml

1 Soporte universal con pinzas

1 Tira de parafina o un trozo de cera toda estación

Reactivos

1. Ácido clorhídrico 0.05N
2. Solución buffer pH 7 o disponible



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	154/218

EQUIPO

Potenciómetro

SERVICIOS

Luz y agua

PROCEDIMIENTO

- Al inicio de la práctica un (a) alumno (a), de cada equipo coleccionará saliva en un vaso de precipitado de 50 ml durante **15 minutos**.
 - En una bureta, **medirá exactamente** la cantidad producida y anotará el volumen total, vertiéndola nuevamente en el vaso de precipitado. (saliva basal)
 - **El mismo donador** de saliva, repetirá la recolección, pero masticando ahora un trozo de cera o una tira de parafina. Durante 15 minutos, midiendo y registrando el volumen recolectado. (saliva estimulada)
- Primero, el profesor ajustará y calibrará el potenciómetro
 - Medirá el pH inicial de cada una de las salivas
 - Realizará una titulación de volúmenes equivalentes con cada una de las salivas recolectadas.
- Para la titulación, los alumnos adicionarán 1 ml de ácido clorhídrico 0.05N a la saliva basal recolectada, previo enjuague del electrodo con agua destilada, para posteriormente medir el pH resultante; repetirán este paso hasta llegar a un pH de 3.0.
 - Al llegar al pH de 3.0 anotarán el volumen total del ácido utilizado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	155/218

Pipetear **la misma cantidad** de saliva basal utilizada, pero de saliva estimulada.

Repetirán el procedimiento a partir de la adición del ácido clorhídrico, previo enjuague del electrodo con agua destilada.

Nuevamente anotarán en volumen de ácido empleado para llegar al pH de 3.0.

- Levantarán el IHOS y CPO de los alumnos donadores de saliva, participantes en el grupo anotarán los resultados, y compararán los resultados de la capacidad amortiguadora y su posible relación con la caries.
- Calcular el volumen de saliva producido por minuto, por hora y por día de cada una de las muestras de saliva empleadas para la práctica.

RESULTADOS

Anotar los resultados en un cuadro comparativo entre saliva basal y estimulada de todo el grupo, resaltando los resultados de CPO e IHOS.

Analizar y concluir que paciente es más susceptible a caries, respecto la capacidad amortiguadora de su saliva.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	156/218

Comparar el resultado del volumen de saliva obtenido por día con el reportado en la literatura y efectuar un análisis, relacionándolo con el proceso de caries.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es una solución amortiguadora?
2. ¿Qué es el pH?
3. ¿Cuáles son los rangos del pH "normal" de la saliva basal y estimulada?
4. ¿Qué componentes de la saliva son los que producen el efecto amortiguador?
5. Escribe otros ejemplos de sistemas amortiguadores en el organismo.
6. Escribe otras condiciones que alteren el pH del organismo además de las citadas.
7. ¿Cuál es la relación directa de caries y capacidad amortiguadora de la saliva



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	157/218

BIBLIOGRAFÍA

- Jenkins G. Fisiología y Bioquímica Bucal. México. Editorial Limusa; 1983.
- Lehninger A. Bioquímica. 2ª ed. Barcelona. Ediciones Omega; 1979.
- Bloom & Fawcett. Tratado de Histología. 11ª ed. México. Editorial Interamericana McGraw-Hill; 1998.
- Williams E. Bioquímica dental básica y aplicada. 2ª ed. México. Editorial Manual Moderno; 1990.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	158/218

PRACTICA 17

RETENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA BOCA

OBJETIVO

El propósito de esta práctica es que el alumno compruebe la retención de azúcares en la cavidad bucal y discuta la relación que hay entre este hecho y el proceso carioso.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La Retención de azúcares en la cavidad bucal, es sin duda alguna un factor de riesgo para caries dental, ya que provee a los microorganismos el sustrato idóneo para la síntesis de ácidos que desmineralizan los tejidos dentales. En esta práctica, se pondrá de manifiesto la retención de azúcares en cavidad bucal, por medio de la utilización de la solución alcalina de Benedict.

Se llaman azúcares reductores a todos aquellos que presentan grupos aldehídos o cetónicos libres y pueden ser determinados por medio de la utilización de iones cúpricos en soluciones alcalinas.

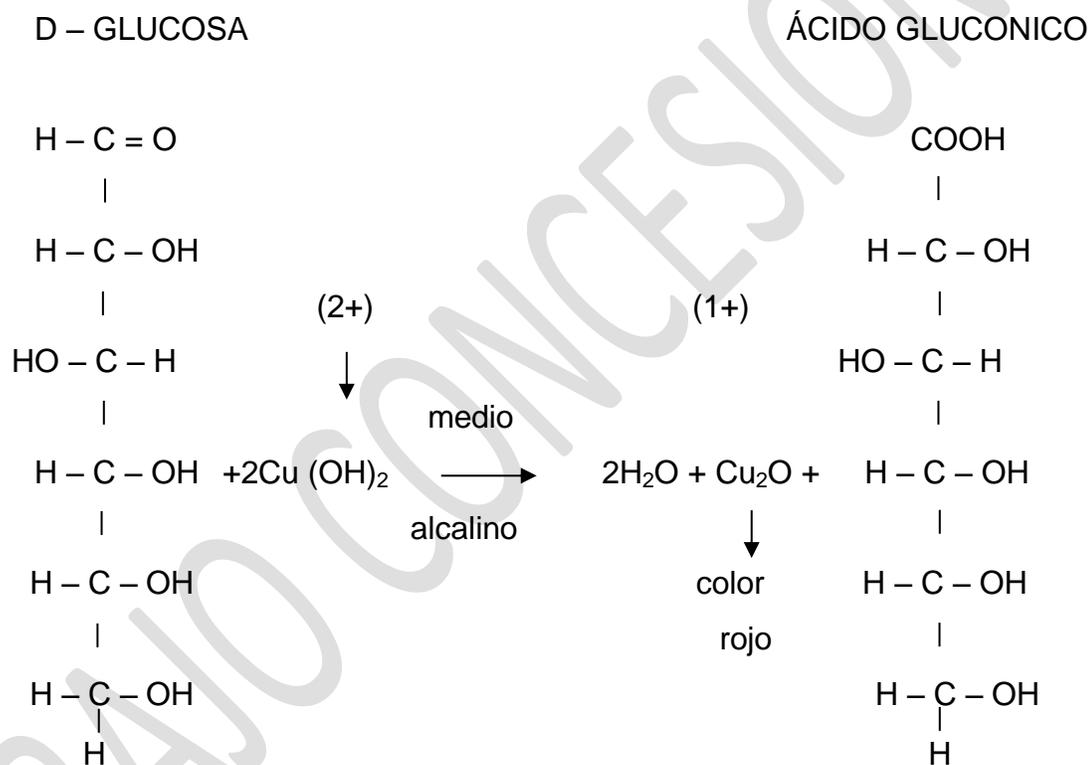
Al hacer reaccionar con el hidróxido de cobre son oxidadas hasta ácidos, manteniéndose el mismo número de átomos de carbono en la molécula (reacción 1). Mientras que las cetosas quedan divididas en ácidos con cadenas de carbono más cortas (reacción 2).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	160/218

El aumento del número de grupos reductores presentes en el azúcar, aumentan la velocidad y el grado de oxidación.

ALDOSA



Reacción 1



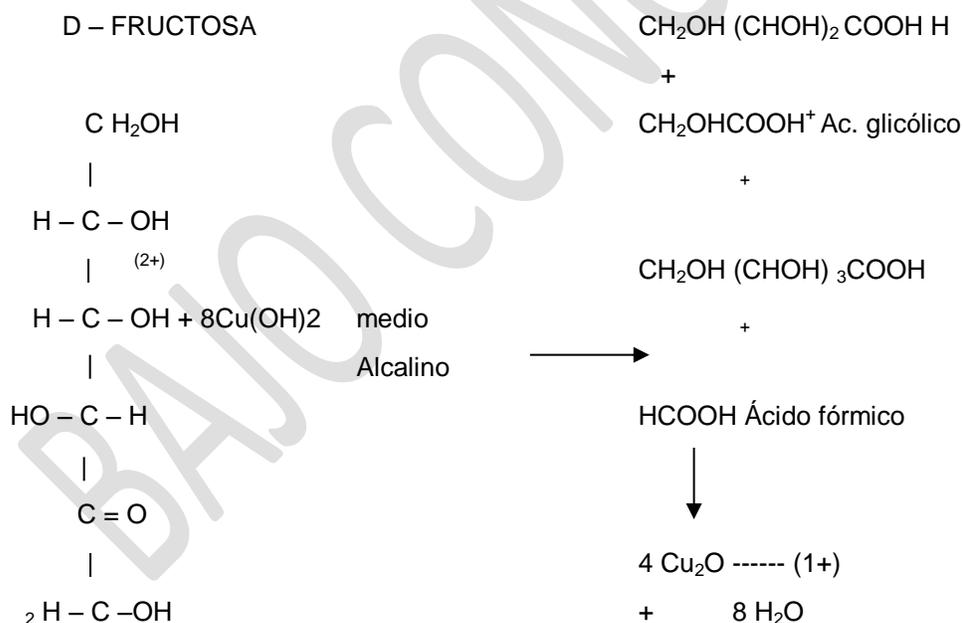
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	161/218

La presencia de carbohidratos entre ellas glucosa en cavidad bucal, favorece el metabolismo microbiano, ya que nos sirve como sustrato para su alimentación y para la producción de compuestos de gran importancia que pueden tener relación con enfermedades bucales.

Este grupo aldehído es oxidado fácilmente a ácido carboxílico en pH neutro por enzimas y agentes oxidantes moderados. Esta propiedad se utiliza para detectar y cuantificar monosacáridos, especialmente la glucosa en fluidos biológicos como la sangre, la orina y en este caso identificarse en saliva.

El ácido monocarboxílico que se forma, se conoce como un ácido aldehído (p.e el ácido glucémico de la sangre).

CETOSAS Reacción 2





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	162/218

Estas reacciones son importantes como una prueba cualitativa muy útil para establecer la presencia o ausencia de azúcares reductores mediante la estandarización cuidadosa de la técnica.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Material:

- 8 Tubos de ensaye
- 1 Vaso de precipitado
- 1 Pipeta de 10 ml

Reactivos:

1. Solución de azúcar (glucosa, fructosa o galactosa).
2. Solución cualitativa de Benedict

EQUIPO

- Baño maría
- Vortex

SERVICIOS

- Agua, luz.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	163/218

PROCEDIMIENTO

Etiquetar por lo menos 5 tubos de ensayo con masking tape en la porción más superior de cada uno, colocando el equipo y el número de tubo. Una vez etiquetados, se le adicionarán 5 ml de Solución de Benedict.

Cada alumno integrante del equipo procederá a enjuagarse la boca con 10ml. de solución de azúcar durante un lapso de 20 segundos y el momento en que la solución sea expulsada de la boca, se tomará como tiempo 0 (cero).

De manera inmediata, se colocará una muestra de saliva en el primer tubo, se agita y se calienta a durante 5 minutos a baño María.

A intervalos sucesivos de tres minutos, el mismo donador coleccionará saliva, colocándola en los siguientes tubos, que de igual forma, deberán ser agitados y calentados durante 5 minutos en baño María.

Una vez transcurridos los 5 minutos, se retiran del baño María y se observan.

La presencia de azúcar se determina por el cambio de color, que puede adquirir desde un tono rojizo, naranja, amarillo y verde, dependiendo de la cantidad de azúcares presente en el momento de la reacción.

La prueba se detiene cuando habiendo transcurrido los 5 minutos en baño María, no exista cambio de color, quedando en el mismo tono azul del reactivo de Benedict.

Nota: Durante el experimento no deberá tomarse agua.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	164/218

RESULTADOS

El tiempo final se establece cuando no haya cambio de coloración en la relación.
Registre el tiempo requerido para la desaparición de azúcares de la saliva.

Es necesario levantar los índices CPOD e IHOS del donador de la muestra de saliva para relacionar los resultados de la práctica con la posibilidad de tener un factor de riesgo para caries dental.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	165/218

CUESTIONARIO

1.-Menciones tres nombres de monosacáridos que sean azúcares reductores, describiendo su estructura química

2.-Diga si los disacáridos pueden ser azúcares reductores y ¿por qué?

3.-Menciones tres técnicas diferentes para la determinación de azúcares reductores en líquidos orgánicos.

4.-Diga qué importancia tiene con relación al proceso carioso la presencia de azúcares en cavidad bucal

BIBLIOGRAFÍA

- Conn, Stumpf; Bioquímica Fundamental 4ª edición. Editorial Limusa México, 2000.
- Bohinski, R. C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano, 1981.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	165/218

PRÁCTICA 18

IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS CONSTITUYENTES DE LA COLÁGENA.

OBJETIVO

Identificar algunos aminoácidos que constituyen a la colágena, destacando las funciones que esta cumple en cavidad bucal, para la mejor comprensión de su composición y sitios de la cavidad bucal donde se presenta

FUNDAMENTO TEÓRICO

La colágena es una proteína que está constituida en su tercera parte por glicina, se encuentra distribuida en todo el tejido conectivo del organismo; existen 19 tipos de colágena y su localización dependerá del tipo de la misma. La colágena constituye gran parte del parodonto, y es el principal medio de sostén del diente, además, es una proteína abundante en dentina y pulpa.

Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas, se unen mediante enlaces peptídicos, además, se pueden observar a otros aminoácidos NO constituyentes de proteínas. Las proteínas son biomoléculas, con diversas funciones, que van desde la conformación de las membranas celulares a la enzimática, la función biológica dependerá de su estructura.

La colágena es una proteína compleja de tipo fibroso, en su composición de aminoácidos, el principal de ellos es la glicina, ya que se encuentra en cada tercer aminoácido. Además, posee dos aminoácidos que no se encuentran en otras proteínas; hidroxiprolina e hidroxilisina, la composición de la colágena varía de acuerdo al tipo y función de la misma

La colágena del ligamento parodontal y la de la cámara pulpar es del tipo I, V y XII



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	166/218

Al hidrolizar a la colágena se obtienen sus aminoácidos, mismos que identificaremos mediante la utilización de un método de separación selectiva por medio de sus pesos específicos, dicho método consiste en la utilización de una placa con gelatina formada con sílice, en esta placa mediante adsorción los diferentes aminoácidos correrán hacia la parte superior, utilizando como vehículo una solución de ácido acético, butanol y agua; a éste método se le conoce como *cromatografía de capa fina*. La cual tiene dos fases, una fija que se da en la parte sólida y una móvil que se realiza dentro de una cámara de cromatografía, en donde se impregna la placa con los solventes citados anteriormente, dichos solventes de acuerdo a la polaridad de los aminoácidos los transportarán y cada aminoácido se detendrá de acuerdo a su peso molecular.

A la distancia específica que recorre cada aminoácido u otro compuesto se le denomina R_f, este valor se calculará utilizando la siguiente fórmula:

Distancia del origen al centro de la mancha.(mm)

R_f= -----

Distancia del origen al frente de disolvente.(mm)

Existen otros tipos de cromatografía para la identificación de sustancias, de mayor y menor exactitud, complejidad y metodología.

Tales estudios en la clínica se emplean por ejemplo: para la detección de fármacos en sangre (antidoping), para separar solutos de líquidos, (separación de proteínas del suero), determinación de la pureza de sustancias o bien determinación de la composición de materiales.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	167/218

MATERIAL Y REACTIVOS

1 Lámina para cromatografía (cromatograma).

1 Regla (deberá traerla el equipo).

Soluciones de aminoácidos

Solución problema

Solvente

Ninhidrina

EQUIPO

Cámara de cromatografía

Estufa

SERVICIOS

Luz y Agua

PROCEDIMIENTO

Con un lápiz, marcar a una distancia de 2 cm del borde de la placa, una línea, muy suavemente y sin tocarla con los dedos u otro material.

Dividir dicha línea en 6 puntos equidistantes.

Colocar 1 gota de aminoácido en cada punto incluyendo también el problema, con distribución al azar, anotando el sitio en que adiciona cada aminoácido en un cuaderno. Dejar secar la gota adicionada y repetir nuevamente hasta completar 3 gotas en cada punto, dejando secar entre cada una.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	168/218

Una vez terminado el procedimiento anterior, introducir los cromatogramas (placas) en las cámaras de impregnación, por lo que deberán de ser marcadas por cada equipo para distinguirlas al retirarlas de la cámara.

Sellar la cámara y dejar humedecer las placas (fase móvil), por lo menos hasta que cubran las 2/3 partes de la placa (1 hora).

Transcurrido el tiempo y/o distancia, extraer la placa y marcar hasta donde haya llegado el disolvente.

Proceder a secar la placa en estufa.

Colocar la placa en una cámara de extracción ó en una zona bien ventilada, para adicionar la Ninhidrina, rociando toda la placa.

Secar nuevamente la placa en la estufa.

Aparecerán unas manchas, debe circularlas, marcar el centro de cada una, identificar el color y anotarlo, además de medir del centro de la mancha hasta el punto en donde colocó inicialmente los aminoácidos y el problema, anotando el resultado en mm.

Calcular el R_f de cada mancha, anotando el nombre del aminoácido correspondiente, en el caso del problema puede aparecer más de una mancha, por lo que deberá de anotar los aminoácidos reconocidos mediante éste método.

RESULTADOS

Anotar los resultados obtenidos en el cromatograma, especificando los aminoácidos contenidos en la solución problema.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	169/218

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las funciones de la colágena en el organismo?
2. ¿Cuáles otros tipos de cromatografía existen?
3. ¿En qué sitios de la cavidad bucal existe colágena?
4. Escribe 3 ejemplos más de los tipos de colágena y su localización.
5. ¿Cuáles son las funciones de la colágena en los tejidos dentarios?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	170/218

6. ¿Cuál es la diferencia entre hidrólisis y desnaturalización?

BIBLIOGRAFÍA

- Bhagavan N. Bioquímica. 2^o ed. México. Editorial Interamericana; 1978.
- Martín D. Mayes P. Bioquímica de Harper. 15^a ed. México. Editorial El Manual Moderno; 2002.
- Fawcett B. Tratado de Histología. 12^o ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill; 1995.
- Lesson P. Texto y Atlas de Histología. México. Editorial Interamericana. McGraw-Hill; 1990.
- Pecsok R. Shields, L. Métodos Modernos de Análisis Químicos. México. Editorial Limusa; 1977.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	171/218

PRÁCTICA 19

ACTIVIDAD DE LA AMILASA SALIVAL

OBJETIVO

Relacionar la actividad enzimática con los cambios del pH, así como relacionar la actividad de la amilasa con el inicio de la digestión química de los alimentos

FUNDAMENTO TEÓRICO

Dentro del grupo de proteínas como biomoléculas del organismo, se encuentran las denominadas ENZIMAS, como ejemplo de ellas en la cavidad bucal encontramos entre otras, la **amilasa salival**, que tiene como función básica, la degradación de los carbohidratos de tipo almidón. En el desarrollo de esta práctica utilizaremos este sustrato para evaluar la función de la amilasa, de acuerdo a diferentes grados de acidez o alcalinidad.

Se conoce que la **actividad enzimática**, se modifica por las variaciones de temperatura, concentraciones de sustrato y modificaciones en el pH, en el caso de la cavidad bucal, estos factores se hacen evidentes con los cambios de dieta (**se modifica el pH**), con el tipo de respiración (el respirador bucal modifica la temperatura oral), o bien una deficiente técnica de cepillado (**incremento del sustrato**), por lo que será necesario evidenciar como afecta a la actividad enzimática la modificación de alguno de estos factores.

La amilasa salival es una enzima de tipo hidrolasa, es responsable de romper los enlaces glucosídicos en el almidón tales como, la amilosa y amelopectina (eritrodextrina y acrodextrina), hasta llegar a **maltosa**.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	172/218

La acción de esta enzima, consiste en iniciar la digestión de los carbohidratos de tipo almidón en cavidad oral, además, la masticación degrada principalmente a los alimentos, participando directamente en la formación del bolo alimenticio en donde la saliva adquiere sus características adhesivas, conferidas en parte, por los carbohidratos contenidos en ella.

Para determinar la degradación del almidón, es necesario hacer evidente dicha hidrólisis, por lo que se realizará una reacción colorida utilizando lugol, ya que el almidón al reaccionar con el yodo produce un color morado ó azul oscuro

La hidrólisis que realiza la amilasa salival, se verá afectada por las diversas soluciones de pH (soluciones buffer). De acuerdo con la teoría, las proteínas se desnaturalizan o hidrolizan cuando son sometidas a cambios de pH, por lo que la velocidad de acción es diferente para cada pH utilizado: a la velocidad de función de cada enzima se reconoce como **índice de actividad enzimática (IAE)**, dicha velocidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$IAE = \frac{1}{t} \times 100$$

En donde t es el tiempo correspondiente que tarda la amilasa en degradar totalmente el almidón hasta la maltosa, y en la práctica se demuestra llegando al **punto acrómico**, este punto se reconoce cuando al adicionar la solución de almidón +buffer + saliva diluida, ya no hay cambio de color con el lugol.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	173/218

MATERIAL

- 2 Placas de porcelana
- 8 tubos de ensayo 20 x 150
- 1 gradilla
- 1 pipeta Pasteur
- 2 pipetas de 5 ml
- 1 parrilla
- 1 vaso de precipitados de 500 ml

REACTIVOS

- Solución de almidón al 0.9%
- Reactivo de lugol
- Soluciones buffer de pH 3, 5, 6,6.5, 7, 8, y 10
- Muestra de saliva diluida 1:5 y 1:10

SERVICIOS

Luz y Agua



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	174/218

PROCEDIMIENTO

1. Dos integrantes de cada equipo adicionarán 1 ml de saliva en 1 tubo de ensaye cada uno, el primero debe diluir su saliva adicionando 4 ml más de agua destilada, etiquetando el tubo (1:5) y mantendrá su temperatura aproximadamente en 37° C, sea en su mano o el baño maría.
2. El segundo deberá diluir su saliva adicionando al ml del otro tubo de ensaye 9 ml de agua destilada, etiquetando dicha dilución (1:10), manteniendo la temperatura de aproximadamente 37° C en baño maría o calor corporal.
3. Mientras, otro integrante etiquetará los tubos de ensaye con los pH correspondientes de 3,5,6,6.5,7,8 y 10 y a los que adicionará 3.0 ml de cada solución buffer.
4. A cada tubo de solución buffer se le adicionan 2 ml de solución de almidón al 0.9%.
5. Se deben mantener los tubos a la temperatura de 37° C aproximadamente, sea en baño maría o calor corporal.
6. Preparar una placa de porcelana para cada saliva, adicionando 2 gotas de reactivo lugol.
7. Adicionar 1 ml de la saliva diluida a la solución buffer a medir, **inmediatamente** se mezcla con la pipeta Pasteur y se adicionan 2 gotas en una de las cavidades de la placa de porcelana, tomándose como tiempo inicial (0), se adicionará con intervalos de 30" a cada cavidad de la placa en orden secuencial, hasta llegar al punto acrómico, anotando el tiempo total para cada solución.

*Los pH de 5, 6, 6.5 y 7 se realizarán cada 30" y los de 3, 8 10

Cada 3 minutos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	175/218

RESULTADOS

El color azul, indica la presencia de almidón y la actividad de la enzima, se observa con los cambios de coloración que se dan a lo largo del tiempo, al agregar en cada intervalo, la muestra de saliva hasta llegar al punto acrómico (color amarillo del lugol).

Calcular el IAE de acuerdo a la fórmula y graficar en ejes cartesianos, anotando el pH óptimo para cada saliva medida y haciendo un cuadro comparativo de todo el grupo.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	1761/218

CUESTIONARIO

1.- ¿Cómo afecta la velocidad enzimática los cambios de temperatura y pH en el organismo?

2.- Escriba tres ejemplos de alteraciones orgánicas que alteran la actividad enzimática corporal.

3.- ¿Cuál es la relevancia de la amilasa salival en los procesos metabólicos?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	177/218

4,- Escribe tres ejemplos de alimentos ricos en almidón, que se consuman por el humano habitualmente.

5,-¿Cuál es efecto que producen las variaciones extremas de pH en la estructura de amilasa?

BIBLIOGRAFÍA

- Bhagaban, N. Bioquímica. 2º ed. México. Editorial Interamericana; 1978.
- Burnett G. Scherp H. Schuster, G. Oral Microbiology and infectious disease. 4ª ed. Baltimore U.S.A. Ed. The Williams 7 W. Co; 1976.
- Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 7º ed. México, 1989.
- Jenkins, G.N Fisiología y Bioquímica Bucal, 1ª edición, Editorial Limusa, México. Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1983.
- Williams E. Bioquímica dental básica y aplicada. 2º ed. México. Editorial Manual Moderno; 1990.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	178/218

PRACTICA 20

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN DIENTE

OBJETIVO

Identificar la presencia de proteínas totales en diente, además explicar la función e importancia de los mismos en cada parte de las estructuras del diente para apoyar los contenidos teóricos del programa académico.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El órgano dentario tiene estructuras constituidas por material orgánico e inorgánico, en diversas proporciones y cada uno de estos varía dependiendo de la estructura, por ejemplo: el esmalte contiene un 99% de material inorgánico y 1% de material orgánico, en tanto que la dentina y el cemento, poseen del 70 al 80% e material inorgánico y 20 al 30 % de material orgánico y la pulpa posee un predominio de material orgánico.

La función de la materia orgánica es básica, ya que es el molde estructural para la formación del diente, es necesario entonces conocer su composición, cual es su función y como participa en la formación del órgano dentario.

En la presente práctica, se podrá de manifiesto la presencia de proteínas en el diente por la técnica de Folin.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	179/218

La composición de los órganos dentarios en cada individuo varía por diversos factores tales como: sus características genéticas, nutricionales, edad, y raza, entre otros, incluso cada órgano dentario presenta variaciones de uno a otro, por ejemplo: canino, molar, incisivo.

Además dentro de los componentes orgánicos, se citan variaciones importantes de acuerdo a la edad del paciente, es mayor su contenido en los más jóvenes (diente en desarrollo) que en los adultos (diente maduro).

De acuerdo a la teoría de Miller, se produce una desmineralización ácida de la matriz orgánica del diente para producir la caries, lo que nos indica que la biopelícula dental puede utilizar a la materia orgánica de las estructuras dentales, para su uso metabólico, teniendo un efecto negativo en el paciente.

El promedio porcentual de proteína en diente también varía si es un órgano cariado o no. En el caso de los dientes sanos se han reportado las siguientes cantidades de proteínas.

- Esmalte _____ 0.2%
- Dentina _____ 20.0%
- Cemento _____ 22.0%

El factor anterior puede modificar los resultados de la práctica, ya que los dientes que se han molido para preparar son cariados o sanos y son diferentes (incisivos, caninos, premolares o molares).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	180/218

MATERIAL

7 Tubos de ensayo de 18 x 150
1 Gradilla
1 Pipeta de 10 ml
2 Pipetas de 1 ml
1 Matraz aforado de 100 ml
1 Píseta con agua destilada
Papel milimétrico
Calculadora

REACTIVOS

Solución alcalina (Na_2CO_3 al 4%, CuSO_4 al 2%, tartrato de Na o K al 4%)
Reactivo de Folin-Cicalteu diluido 1:2
Estándar de proteína de huevo de 1mg/ml.
Hidróxido de sodio 1.5N
Solución "O" (preparada previamente por el grupo –diente molido + 25ml de HCl en un matraz volumétrico de 100ml) – especifique el peso de diente, pesando en la balanza analítica)

EQUIPO

Espectrofotómetro
Vortex

SERVICIOS

Agua, luz



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	181/218

PROCEDIMIENTO

Aforar la solución "O" preparada con anterioridad a 100ml. De esta solución pipetear 5.0ml y transferir a un matraz aforado de 100ml, adicionar 5.0ml de Hidróxido de sodio 1.5N, homogeneizar esta solución y anotar las características físicas, aforar esta solución y etiquetar como solución "C" (solución problema).

Preparar una serie de 7 tubos etiquetando del 1 al 7 de la siguiente manera:

Tubo	Agua destilada (ml)	Estándar de proteína(ml)	Solución "C" (problema) (ml)
1	1.0	--	--
2	0.5	--	0.5
3	--	--	1.0
4	0.9	0.1	--
5	0.8	0.2	--
6	0.7	0.3	--
7	0.5	0.5	--



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	182/218

Adicionar 5 ml de solución alcalina a cada tubo y mezclar. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Adicionar 0.5 ml de RFC y mezclar después de cada adición. No adicionar RFC a más de un tubo, sin mezclar inmediatamente, ya que se podría alterar el curso de la reacción. Dejar 30 minutos para desarrollo del color a temperatura ambiente. Calibrar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm y utilizando el tubo número 1 como blanco usando 0% de absorbancia. Leer la absorbancia de cada uno de los tubos.

Construir la curva patrón en el papel milimétrico utilizando el eje de las ordenadas para graficar la concentración de proteína y el de las abscisas para las absorbancias obtenidas.

RESULTADOS

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "C"
3. Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos 2 y 3
4. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de proteínas en cada uno de los tubos problema (2 y 3).
5. Reportar la concentración en mg de proteína en la solución "C" así como el porcentaje.
6. Reportar la concentración en mg de proteína en la solución "O" así como el porcentaje.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	184/218

2. Realizar una curva patrón con los datos obtenidos en el espectrofotómetro

Para realizar una curva patrón es necesario tener un cuadro con dos elementos: el primer dato son los miligramos de proteína que contiene cada tubo y que se obtienen mediante una regla de tres utilizando el estándar (STD) que se encuentra en los reactivos de cada práctica. Para este ejercicio, el STD = 1mg/mL. El tubo 1 no contiene proteína, mientras que el 2 y 3 al no conocerlo lo debemos obtener de la curva patrón.

Tubo	Proteína (mL)	Proteína (mg)
1	0	0
2	-	-
3	-	-
4	0.1	0.1
5	0.2	0.2
6	0.3	0.3
7	0.5	0.5

Tubo 4

STD 1mg --- 1mL

x --- 0.1mL

$0.1 \times 1 / 1 = x = 0.1 \text{mg}$

Tubo 5

STD 1mg --- 1mL

x --- 0.2mL $0.2 \times 1 / 1 = x = 0.2 \text{mg}$

Tubo 6

STD 1mg --- 1mL

x --- 0.3mL $0.3 \times 1 / 1 = x = 0.3 \text{mg}$

Tubo 7

STD 1mg --- 1mL

x --- 0.5mL $0.5 \times 1 / 1 = x = 0.5 \text{mg}$

En este ejemplo hay equivalencia entre los miligramos y mililitros de proteína, lo cual no sucederá en otros ejercicios (carbohidrato, calcio, fósforo y urea), por lo tanto, será indispensable realizar las reglas de tres para transformar el STD de mililitros a miligramos.

El segundo dato se obtiene al realizar la práctica a través del resultado del espectrofotómetro. Para continuar con este ejercicio, los resultados de absorbancia (Abs) se ejemplifica con los siguientes valores:

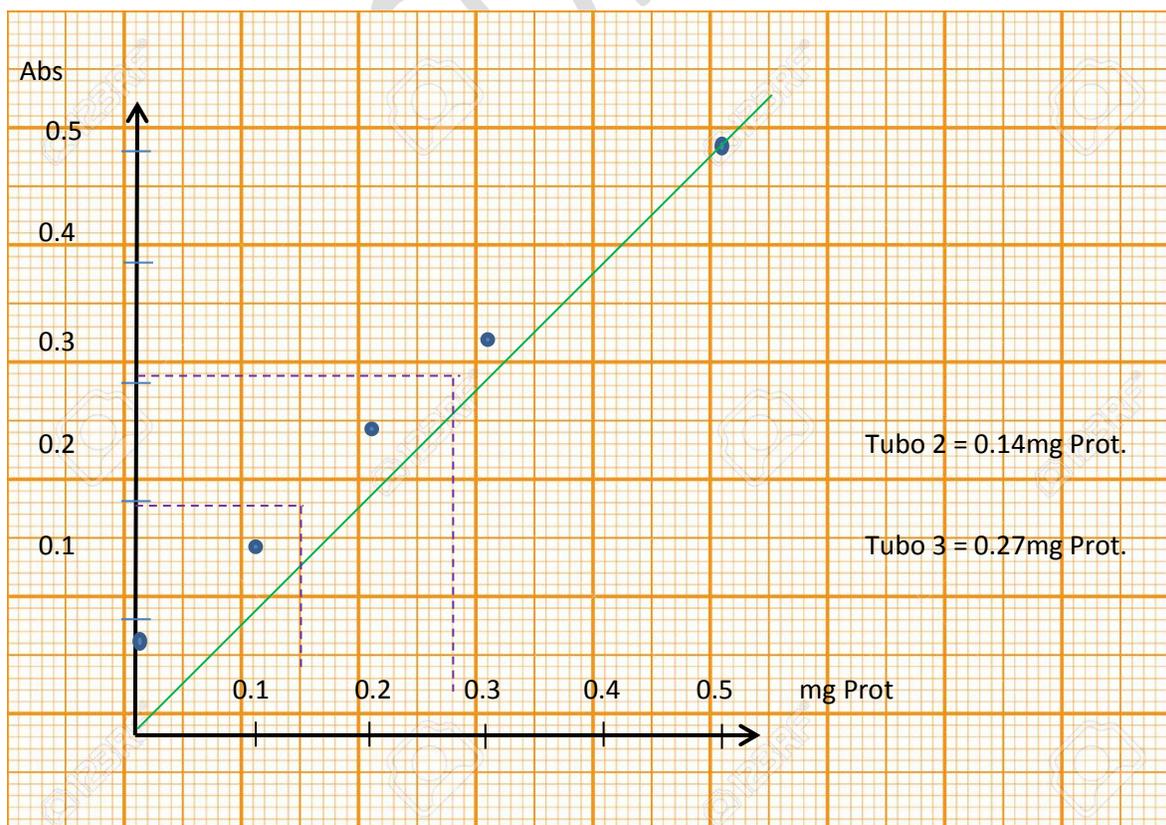


MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	185/218

Tubo	Estándar de proteína (mg)	Abs
1	0	0
2	-	0.14
3	-	0.27
4	0.1	0.10
5	0.2	0.21
6	0.3	0.30
7	0.5	0.49

Una vez que se han obtenido dos datos para cada tubo, es posible continuar con la gráfica que se realizará en papel milimétrico utilizando todos los tubos, excepto 2 y 3. Los miligramos de proteína se grafican en el eje de la "x" y la absorbancia en el eje de la "y". (marcado con puntos azules)





MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	186/218

Una vez que están ubicados los datos en la gráfica, se deben unir todos los puntos mediante una línea recta. En caso de que los puntos no se encuentren alineados entonces se trazarán una línea pasando por la mayoría de los puntos o sin tocar ninguno pero cerca de todos ya que esto eliminará el error de pipeteo durante la práctica. (línea continua color verde)

Al tener la curva patrón, ya es posible obtener los miligramos de proteína de los tubos problema al traspolar el dato existente de absorbancia. Esto se realiza trazando una línea horizontal iniciando en la Abs del tubo 2 y concluyendo en la curva patrón, después se hace una línea vertical de la curva patrón hacia el eje de la "x", y ahí se obtendrá la cantidad de proteína del primer tubo problema. El segundo tubo problema se obtiene de la misma manera. (líneas discontinuas color morado)

3. Determinar la concentración de proteína en las soluciones y tubos problema, así como el porcentaje

Con los resultados obtenidos anteriormente en el numeral 2 y en la gráfica del tubo 2, se determinará la concentración y el porcentaje de proteínas de la solución "C" y "O" mediante reglas de tres.

Tubo 2

$$\begin{array}{l} 1.34\text{mg diente tubo 2} \quad \text{---} \quad 0.14\text{mg proteína tubo 2} \\ 269.13\text{mg diente Sol "C"} \quad \text{---} \quad x \end{array} \quad \begin{array}{l} 269.13 \times 0.14 / 1.34 = \\ \boxed{x = 28.11\text{mg proteína Sol "C"}} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 269.13\text{mg diente Sol "C"} \quad \text{---} \quad 100\% \\ 28.11\text{mg proteína Sol "C"} \quad \text{---} \quad x \end{array} \quad \begin{array}{l} 28.11 \times 100 / 269.13 = \\ \boxed{x = 10.44\% \text{ proteína Sol "C"}} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 1.34\text{mg diente tubo 2} \quad \text{---} \quad 0.14\text{mg proteína tubo 2} \\ 5382.6\text{mg diente Sol "O"} \quad \text{---} \quad x \end{array} \quad \begin{array}{l} 5382.6 \times 0.14 / 1.34 = \\ \boxed{x = 562.36\text{mg proteína Sol "O"}} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 5382.6\text{mg diente Sol "O"} \quad \text{---} \quad 100\% \\ 562.36\text{mg proteína Sol "O"} \quad \text{---} \quad x \end{array} \quad \begin{array}{l} 562.36 \times 100 / 5382.6 = \\ \boxed{x = 10.44\% \text{ proteína Sol "O"}} \end{array}$$

La igualdad de los porcentajes es indicativo de la correcta resolución del problema. Otra manera de corroborar el resultado es repitiendo las reglas de tres del numeral 4 pero es necesario cambiar los datos del tubo 2 por los del 3.

Tubo 3

$$\begin{array}{l} 2.69\text{mg diente tubo 3} \quad \text{---} \quad 0.27\text{mg proteína tubo 3} \\ 269.13\text{mg diente Sol "C"} \quad \text{---} \quad x \end{array} \quad \begin{array}{l} 269.13 \times 0.27 / 2.69 = \\ \boxed{x = 27.01\text{mg proteína Sol "C"}} \end{array}$$

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	187/218

269.13mg diente Sol "C" --- 100%

27.01mg proteína Sol "C" --- x

$$27.01 \times 100 / 269.13 =$$

$$x = 10.03\% \text{ proteína Sol "C"}$$

2.69mg diente tubo 3 --- 0.27mg proteína tubo 3

5382.6mg diente Sol "O" --- x

$$5382.6 \times 0.27 / 2.69 =$$

$$x = 540.26\text{mg proteína Sol "O"}$$

5382.6mg diente Sol "O" --- 100%

540.26mg proteína Sol "O" --- x

$$540.26 \times 100 / 5382.6 =$$

$$x = 10.03\% \text{ proteína Sol "O"}$$

De igual forma que en el tubo 2, los resultados porcentuales son idénticos y aunque los resultados entre los tubos 2 y 3 no son idénticos, si son muy similares.

Los porcentajes de componente de diente (en este caso de proteína) deben coincidir encontrándose dentro del rango que marca la literatura.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	188/218

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuál es la función de las proteínas en el diente?
- 2.- ¿Cuáles son las proteínas que encontramos en diente y cuál de ellas se encuentra en mayor cantidad?
- 3.- ¿Cuáles son las concentraciones de proteínas citadas en diversas bibliografías?
- 4.- En qué otras estructuras del Aparato Estomatognático se encuentran las proteínas?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	189/218

BIBLIOGRAFÍA

- Bohinski, R. C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano, 1978.
- Bhagaban, N.V.: Bioquímica 2ª edición, Editorial Interamericana, México, 1978.
- Burnett, G.W.: Scherp, H.”.: Schuster, G.S.: Oral Microbiology and Infectious disease. 4ª edición. Ed. The Williams 7 “. Co., Baltimore U.S.A. 1976
- Jenkins, G.N.: Fisiología y Bioquímica Bucal, 1ª edición, Editorial Limusa, México, 1983.
- Newbrun, Ernest.: Cariología, 1ª edición, Editorial Limusa, México, 1984.
- Williams. Elliot: Bioquímica dental básica y aplicada, 2ª edición. Editorial Manual Moderno, México 1990

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	190/218

PRÁCTICA 21

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN DIENTE

OBJETIVO

Determinar la concentración de carbohidratos totales en diente, además de explicar la función e importancia en cada parte de las estructuras dentales.

FUNDAMENTO TEÓRICO

Los carbohidratos, con componentes de la matriz orgánica del diente, participan en la formación de glucoproteínas, así como también constituyen parte del tejido conectivo y como reserva energética.

La composición de los órganos dentarios en cada individuo varía por diversos factores tales como: sus características genéticas, nutricionales, edad, raza, sexo, e incluso el tipo de diente como por ejemplo, incisivo, canino, premolar o molar, esto debido a su anatomía y tamaño.

Además, dentro de los componentes orgánicos se citan variaciones importantes de acuerdo a la edad del paciente, ya que es mayor en los dientes jóvenes (en desarrollo) que en los adultos (diente maduro).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	191/218

De acuerdo a la teoría de formación de caries de Miller, se produce una desmineralización ácida del diente, lo que nos indica que los microorganismos de la placa dentobacteriana, pueden utilizar la materia orgánica contenida en ella como sustrato para la producción de ácidos, en especial los carbohidratos como la sacarosa, lo cual favorece la desmineralización del esmalte y su posterior cavitación.

Además de la teoría citada, existe la teoría endógena, en donde se menciona la participación del glucógeno, que se encuentra en el interior de los órganos dentarios, el cual es utilizado por las bacterias como fuente de energía, produciendo daño a las estructuras calcificadas.

La concentración de carbohidratos en las estructuras dentales es menor que la de proteínas, en la presente práctica se realizará la técnica del fenol sulfúrico para su determinación.

Los carbohidratos se deshidratan en presencia de ácidos minerales, formando furfural en el caso de pentosas e hidroxifurfural en el caso de las hexosas, posteriormente se condensan con fenol formando una reacción colorida, lo que facilita su identificación por espectrofotometría.

MATERIAL

- 8 Tubos ensayo
- 1 Gradilla
- 2 Pipeta de 10 ml
- 2 Pipetas de 1 ml
- 1 Bureta de 50 ml
- 1 Matraz Erlenmeyer de 50 ml
- 1 Matraz volumétrico de 100 ml
- 1 Piseta con agua destilada
- 1 Disco de papel filtro



REACTIVOS

Solución de Fenol al 80%

NaOH al 1.5N

Estándar de glucosa 0.1mg/ml

H₂SO₄ concentrado

Solución "O" (misma de la práctica anterior)

EQUIPO

Vortex

Espectrofotómetro

SERVICIOS

Agua, luz

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	192/218

PROCEDIMIENTO

Pipetear 10ml de la solución "O" y transferir a un matraz Erlenmeyer de 50ml, adicionar 10ml de NaOH al 1.5N, homogeneizar esta solución y anotar las características físicas, filtrar esta solución y etiquetar como solución problema.

Previo enjuague de los tubos con agua destilada y escurrimiento, proceda a etiquetar del 1 al 8 preparar de la siguiente manera:

Tubo	Agua destilada (ml)	Estándar de glucosa(ml)	Solución "C" (problema) (ml)
1	2.0	--	--
2	1.5	--	0.5
3	1.0	--	1.0
4	1.9	0.1	--
5	1.8	0.2	--
6	1.7	0.3	--
7	1.6	0.4	--
8	1.5	0.5	

Posteriormente, adicione a cada tubo, 0.1ml de fenol al 80%, mezclando inmediatamente con el vortex. Adicione por la pared de cada tubo 5ml de ácido sulfúrico concentrado contenido en una bureta. DEJAR REPOSAR DURANTE 20 A 30'.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	193/218

Transcurrido el tiempo, se observará color en los tubos. Calibrar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm utilizando el tubo 1 como blanco al 0% de absorbancia (100% de transmitancia). Si es necesario, deberá recalibrarse el aparato para evitar errores de desviación.

Continuar la lectura de la absorbancia de los tubos uno por uno en orden creciente de concentración del 2 al 8. Anote los resultados.

Recordar que la curva patrón se construirá con los tubos 4 al 8 y los problemas a resolver son los tubos 2 y 3.

RESULTADOS

Una vez anotados los resultados de los valores de absorbancia de los tubos, construir la gráfica utilizando en el eje de las ordenadas los valores del estándar de glucosa y en las abscisas la absorbancia obtenida.

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "C"
3. Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos 2 y 3
4. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de carbohidratos en cada uno de los tubos problema (2 y 3).
5. Reportar la concentración en mg de carbohidratos en la solución "C" así como el porcentaje.
6. Reportar la concentración en mg de carbohidratos en la solución "O" así como el porcentaje.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	194/218

CUETIONARIO

1.-Cuál es la función de los carbohidratos en el diente?

2.-Cuáles son los carbohidratos que se encuentran en diente y cuál es el más abundante?

3.- ¿Cuáles son las concentraciones de azúcares en diente citadas en diversas bibliografías?

4.- ¿En qué otras estructuras del aparato estomatognático se encuentran azúcares?

BIBLIOGRAFÍA

- Bohinski, R.C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano. 1978
- Burnett, G.W.: Scherp, H.W.: Schuster, G.S.: Oral Microbiology and Infectious disease. 4ª edición. Ed. The Williams & W. Co., Baltimore U.S.A. 1976.
- Díaz Zagoya, Hicks.: Bioquímica 2ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill, México, 1995.
- Jenkins, G.N.: Fisiología y Bioquímica Bucal, Editorial Limusa, México, 1983.
- Williams Elliot.: Bioquímica Dental Básica y Aplicada 2ª ed. Editorial El Manual Moderno, México, 1990.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	195/218

PRÁCTICA 22

DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN DIENTE

OBJETIVO

Determinar la concentración de Fósforo en diente, además, de explicar la función e importancia en cada parte de las estructuras dentales.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El fósforo es uno de los componentes inorgánicos del diente más abundante, ya que forma parte estructural de las apatitas junto con el calcio, es además, uno de los constituyentes orgánicos más importantes dada su participación en las reacciones para la producción de energía formando ATP, obviamente, también se utiliza en la mineralización del esqueleto.

El fósforo es un oligoelemento que participa en la contracción muscular, formando parte de los enlaces en las cadenas de ADN y ARN, así como también en la formación de enzimas de ciclos catabólicos indispensables como la glucólisis (Fosfofructocinasa), además de la formación del AMP cíclico , que participa como segundo mensajero, en varios procesos bioquímicos.

La composición de los órganos dentarios, se distribuye en material orgánico e inorgánico, siendo comparativamente mayor el inorgánico, el depósito de sales minerales, depende directamente del fósforo, por lo que su carencia y/o disminución, modifica la estructura rígida de las estructuras dentales.

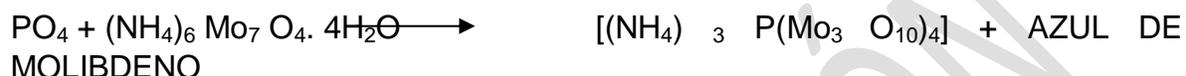
Además, participa como parte de los sistemas amortiguadores de la saliva y sangre en forma de fosfato.

La concentración de fósforo varía en la porción orgánica del diente, como en la matriz amorfa, también se encuentra en diferente cantidad en forma de cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	196/218

En esta ocasión, se realizará la determinación del fósforo mediante la utilización de un reactivo de molibdato. El fósforo reacciona con el molibdato de amonio produciendo una sal de fosfomolibdato de amonio, que es sometida a una reacción de reducción utilizando el ácido amino naftol sulfónico, formando un complejo colorido denominado azul de molibdato.



MATERIAL

- 8 tubos de ensaye
- 1 gradilla
- 1 pipeta de 10ml
- 1 pipeta de 5 ml
- 1 pipeta de 1 ml
- 2 matraces aforados de 100ml
- 1 Piseta con agua destilada

REACTIVOS

- Reactivo de molibdato
- Ácido amino naftol sulfónico
- Estándar de fósforo 10microgramos/ml
- Solución "O" (misma utilizada en la práctica anterior)

EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Vortex



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	197/218

SERVICIOS

Agua, luz

PROCEDIMIENTO

Pipetear 10ml de la solución "O" y transferirlos a un matraz volumétrico de 100ml, aforar y etiquetar como solución "A". Tomar 1ml de la solución "A" y transferir a otro matraz volumétrico de 100ml, aforar y etiquetar como solución "B".

Previo enjuague de los tubos con agua destilada y escurrimiento de los mismos, proceder a etiquetarlos de los números 1 al 8 respectivamente.

Preparar una serie de tubos de la siguiente manera:

Tubo	Estándar de P en ml	Solución problema (solución "B") en ml	Agua destilada en ml
1	--	--	5.0
2	0.5	--	4.5
3	1.0	--	4.0
4	2.0	--	3.0
5	3.0	--	2.0
6	4.0	--	1.0
7	--	1.0	4.0
8	--	2.0	3.0

Adicionar a cada tubo 1.0ml del reactivo de molibdato y mezclar, agregar 0.4ml de ácido amino naftol sulfónico, mezclar inmediatamente y dejar reposar de 10 a 15 minutos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	198/218

Encender el espectrofotómetro a 660nm de longitud de onda y calibrar con el tubo número 1 a 0% de absorbancia (100% de transmitancia).

Realizar la lectura de absorbancia del resto de los tubos en orden creciente de concentración

RESULTADOS

Anotar los resultados de los tubos para construir la gráfica, ubicando en el eje de las ordenadas, los valores del estándar de fósforo y en el de las abscisas la absorbancia obtenida.

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "A"
3. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "B"
4. Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos 7 y 8
5. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de fósforo en cada uno de los tubos problema (7 y 8).
6. Reportar la concentración en mg de fósforo en la solución "B" así como el porcentaje.
7. Reportar la concentración en mg de fósforo en la solución "A" así como el porcentaje.
8. Reportar la concentración en mg de fósforo en la solución "O" así como el porcentaje.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	199/218

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuál es la función del fósforo en el organismo?
- 2.- ¿En qué tipo de reacciones del organismo se encuentra el fósforo?
- 3.- ¿Cuál es su importancia biológica?
- 4.- ¿Cuál es la participación del fósforo en las estructuras dentales?

BIBLIOGRAFÍA

- Bohinski, R.C.: Bioquímica. Editorial Fondo Educativo Interamericano. 1978
- Bhagaban, N.V.: Bioquímica 2ª ed. Editorial Interamericana, México, 1978.
- Burnett, G.W.: Scherp, H.W.: Schuster, G.S.: Oral Microbiology and Infectious disease. 4ª edición. Ed. The Williams & W. Co., Baltimore U.S.A. 1976.
- Díaz Zagoya, Hicks.: Bioquímica 2ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill, México, 1995.
- Jenkins, G.N.: Fisiología y Bioquímica Bucal, Editorial Limusa, México, 1983.
- Newbrun, Ernest.: Cariología, Editorial Limusa, México, 1984.
- Matheus, Van Holde.: Bioquímica, 2ª ed. Editorial Interamericana McGraw Hill, España, 1998.
- Williams Elliot.: Bioquímica Dental Básica y Aplicada 2ª ed. Editorial El Manual Moderno, México, 1990.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	200/218

PRÁCTICA 23

DETERMINACIÓN DE CALCIO EN DIENTE

OBJETIVO

Determinar la concentración de calcio en diente, además, explicar la función e importancia en cada parte de las estructuras dentales.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El calcio es uno de los iones de mayor importancia dentro de las funciones orgánicas, es necesario en funciones de mineralización, coagulación, transporte, mantener la estabilidad y selectividad de la membrana celular.

En el caso de la mineralización dental, es importante ya que el momento en el que se forman los complejos de fosfatos, se induce la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico (apatitas).

El calcio, está presente fundamentalmente en la leche y derivados como el queso, yema de huevo, aguas duras y vegetales; en menor proporción en lentejas, frijoles, nueces, higos, coliflor y espárragos.

Además en el caso de los alimentos marinos, estos contienen mucho calcio, en especial en aquellos alimentos desecados.

Los requerimientos diarios se establecen en 800mg para adultos, incrementándose hasta en 1.2 g. Durante el crecimiento, embarazo y lactancia.

La absorción de calcio de un total de la dieta, se da aproximadamente en un 30% a nivel del duodeno y primera porción del yeyuno, a través de mecanismos pasivos, transporte activo, requiriendo este último ATP, mitocondrias intactas, una ATPasa específica y una proteína intestinal fijadora de calcio, que es regulada por un metabolito de la vitamina D (1-25-dihidroxicolecalciferol) sintetizado en el riñón en respuesta a bajas concentraciones de calcio plasmático.

Los lactobacilos, al disminuir el pH intestinal, favorecen la absorción del calcio, así como también, la vitamina D, hormona paratiroidea, lactosa, alcalosis sistémica, hormona del crecimiento, los aminoácidos como la arginina, lisina y triptofano.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	201/218

Los factores que disminuyen su absorción, pueden ser: el exceso de ácidos grasos no absorbidos en el contenido intestinal, que forman jabones insolubles con el calcio, dietas ricas en oxalatos (espinacas), fitato (granos de cereales) y fosfatos inorgánicos no digeribles,. También, los glucocorticoides disminuyen su absorción, la edad progresiva, el tabaco, la disminución de estrógenos y el consumo frecuente de café.

El calcio es el mineral más abundante en el organismo, se distribuye ampliamente en las estructuras óseas y en los dientes, en los recién nacidos y lactantes, se encuentra en forma de fosfato de calcio amorfo y con el crecimiento se transforma en fosfato de calcio cristalino (hidroxiapatita).

Se excreta por orina, heces y sudor, siendo en las heces que se excreta hasta un 90% y en el sudor durante el día, se puede excretar de 20 a 350mg al día. En el caso de pacientes con tirotoxicosis (Enfermedad de Graves Basedow), se puede presentar hipocalcemia secundaria a hiperhidrosis (sudoración profusa).

Este método a utilizar para la determinación de calcio es sencillo y rápido ya que se utilizan dos reactivos estables a temperatura ambiente. La formación del complejo colorido es inmediata y la presencia de 8-hidroxiquinoleína elimina la transferencia del magnesio hasta concentraciones de 10mg/dl. Mientras que la inclusión de cianuro de potasio en la solución amortiguadora, elimina la transferencia de metales pesados.

Calcio + O-cresolftaleína → calcio- complejo cresolftaleína
(color púrpura)

MATERIAL

9 tubos de ensaye (13x100)

1 gradilla

2 pipetas de 10ml

6 pipeta de 0.2 ml

1 matraz aforado de 50 ml

1 Piseta con agua destilada

Papel milimétrico

Calculadora



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	202/218

REACTIVOS

Estándar de Calcio 10mg/100ml

Reactivo amortiguador

Reactivo de color

Solución "O" (la misma empleada para las prácticas anteriores)

Orina

Saliva

EQUIPO

Espectrofotómetro

Vortex

SERVICIOS

Agua, luz

PROCEDIMIENTO

Tomar 10 ml de solución "O" y transferirla a un matraz aforado de 100ml, etiquetándola como Solución "A". De esta solución pipetear 10ml y transferirla nuevamente a un matraz aforado de 100ml, etiquetándola como solución "B".

Realizar una dilución de la muestra de orina de 1:10, utilizando un mililitro de orina y 9 mililitros de agua destilada.

Previo enjuague de los tubos con agua destilada y escurrimiento de los mismos, proceder a etiquetarlos de los números 1 al 10 respectivamente.

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	203/218

Preparar una serie de tubos de la siguiente manera:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Reactivo de color (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Reactivo amortiguador (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Agitar en el vortex y dejar reposar durante 5 minutos. Adicionar las siguientes soluciones a cada tubo.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Patrón de calcio (ml)	-	0.05	0.10	0.15	0.20	-	-	-	-
Solución "B" (ml)	-	-	-	-	-	0.05	0.10	-	-
Saliva (ml)	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-
Orina 1:10 (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05
Agua destilada	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.20	0.15	0.15	0.20

Agitar con el vortex y leer a 550nm ajustando a 0% de absorbancia con el tubo 1.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	204/218

RESULTADOS.

Anotar los resultados de los tubos para construir la gráfica, ubicando en el eje de las ordenadas, los valores del estándar de calcio y en el de las abscisas la absorbancia obtenida.

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "A"
3. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "B"
4. Determinar los miligramos de diente que presentan los tubos 7 y 8
5. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de calcio en cada uno de los tubos problema (6, 7, 8 y 9).
6. Reportar la concentración en mg de calcio en la solución "B" así como el porcentaje.
7. Reportar la concentración en mg de calcio en la solución "A" así como el porcentaje.
8. Reportar la concentración en mg de calcio en la solución "O" así como el porcentaje.
9. Reportar la concentración en mg de calcio en saliva así como el porcentaje.
10. Reportar la concentración en mg de calcio en orina así como el porcentaje.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	205/218

CUESTIONARIO

1.- Escriba tres funciones básicas del calcio además de las citadas en la práctica.

2.- Diga como interviene el calcio en la coagulación sanguínea

3.- Cuál es la cantidad de calcio que requiere diariamente un adolescente, un paciente pediátrico y un adulto (hombre y mujer).

4.- ¿Cuál es la concentración de calcio en las diferentes estructuras dentales?

5.- Diga que relación tiene la calmodulina con el calcio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	206/218

BIBLIOGRAFÍA

- Gitlman, H. J. Anal Biochem. 18, 521; 1967.
- Henry R. J. Clinical Chemistry, Principles and Technics. Harper & Row Publisher; New York, 1974.
- Martin E.E. Hazards of medications. A manual on drug interactions, incompatibilities, contraindications and adverse effects. Lippincott; Philadelphia, 1971.
- Mooredhead WR, Bringgs AG. Clin. Chem. 20, 1458, 1974.
- Williams Elliot. Bioquímica Dental Básica y Aplicada. 2ª ed. El Manual Moderno; México, 1990.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	207/218

PRÁCTICA 24

IDENTIFICACIÓN DE UREA

OBJETIVO

Identificar la presencia de urea en saliva, diente y orina además explicar la función e importancia de la misma en enfermedad periodontal, halitosis y caries dental.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En la cavidad oral, el amoníaco producido a través de la hidrólisis enzimática de la urea salival parece un factor importante en la inhibición del desarrollo de caries dentales. La ureolisis llevada a cabo por bacterias, puede ser un factor en la promoción de la formación de cálculo y puede contribuir a la progresión de la enfermedad periodontal mediante el aumento de los procesos inflamatorios.

Un nuevo enfoque en la investigación en caries se centra en el hecho de que la generación de álcali a partir de sustratos salivales, tales como urea y arginina, puede desempeñar un papel importante en el pH de la biopelícula, la homeostasis y en la inhibición de caries. Las dos fuentes principales de generación de álcali en la placa dental y saliva son a través de la hidrólisis de la urea por las enzimas ureasa y el metabolismo de la arginina por el sistema de la arginina desaminasa (ADS).

Se ha descrito que los sujetos con órganos dentarios resistentes a caries tienen una biopelícula más alcalina. En contraste, el riesgo de caries puede estar asociado con la pérdida de potencial de generación de álcali. La urea puede ser encontrada en las secreciones de las glándulas salivales en concentraciones similares a las del suero, oscilando entre 10.4 – 41.6 mg/dL.

Por lo tanto, el amoníaco producido a partir de urea por ureolisis puede ser un importante factor endógeno inhibidor de la microbiota acidogénica y la caries en desarrollo, mediante la neutralización de ácidos y la estabilización de la microbiota oral.

En esta práctica la urea va a reaccionar con la diacetilmonoxima en presencia de tiosemicarbazida en medio ácido formando un derivado diazínico de color rosa púrpura. La concentración de urea presente en la muestra es proporcional a la intensidad del color formado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	208/218

El método propuesto es altamente específico para la urea. El producto formado en la reacción carabamido-dia-cetilo es estabilizado por la acción de tiosemicarbazida y por el ión férrico, que disminuye su fotosensibilidad e inhibe la interferencia de la hidroxilamina, linealizando la reacción.

MATERIAL

- 10 tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- 1 gradilla
- 2 pipetas de 10 ml
- 2 pipetas de 5ml
- 5 pipetas de .1 ml
- 1 matraz aforado de 50 ml
- 1 piseta con agua destilada

REACTIVOS

- Patrón de Urea: 80 mg/dL.
- Reactivo ácido
- Reactivo de color
- Solución "O" (preparada previamente por el grupo –diente molido + 25ml de HCl en un matraz volumétrico de 100ml) especifique el peso de diente, pesando en la balanza analítica).
- Orina
- Saliva

EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Vortex

SERVICIOS

- Agua
- Luz



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	209/218

PROCEDIMIENTO

Previo enjuague de los tubos con agua destilada y escurrimiento de los mismos, proceder a etiquetarlos de los números 1 al 10 respectivamente.

Pipetear 10ml de la solución "O" y transferirlos a un matraz volumétrico de 100ml, aforar con agua destilada y etiquetar como solución "A".

Preparar una serie de tubos de la siguiente manera:
Añadir el reactivo ácido al final a todos los tubos.

Tubo	Reactivo de color	Patrón	Saliva	Orina diluida (1:10)	Solución problema (solución "A" 1:10) ml	Agua destilada	Reactivo ácido
1	2.5	--	--	--	--	0.04	2.5
2	2.5	0.01	--	--	--	0.04	2.5
3	2.5	0.02	--	--	--	0.03	2.5
4	2.5	0.03	--	--	--	0.02	2.5
5	2.5	0.04	--	--	--	0.01	2.5
6	2.5	0.05	--	--	--	--	2.5
7	2.5	--	0.02	--	--	0.02	2.5
8	2.5	--	0.04	--	--	--	2.5
9	2.5	--	--	0.01	--	0.03	2.5
10	2.5	--	--	--	0.02	0.02	2.5

Mezclar y colocar en baño de agua caliente durante 10 minutos en ebullición. Transferir un baño de agua fría durante 3 minutos. Leer en espectrofotómetro a 520 nm. La coloración es estable por 60 minutos.

VALORES DE REFERENCIA

Sangre - suero: 15 – 40 mg/dL.

Saliva: 10.4 – 41.6 mg/dL

Saliva estimulada: .6 – 30 mg/dL.

Orina: 25 – 43 g/24 hrs.

Rango normal de orina de 24 hrs: 800 – 2000 mL.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	210/218

RESULTADOS

1. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "O"
2. Determinar los miligramos de diente que presenta la solución "A"
3. Determinar los miligramos de diente que presenta el tubo 10.
4. Una vez realizada la curva patrón, determinar la concentración de urea en cada uno del tubo problema (7, 8, 9 y 10).
5. Reportar la concentración en mg de urea en la solución "A" así como el porcentaje.
6. Reportar la concentración en mg de urea en la solución "O" así como el porcentaje.
7. Reportar la concentración en mg de urea en saliva, así como el porcentaje.
8. Reportar la concentración en mg de urea en orina, así como el porcentaje.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las concentraciones de urea citadas en diversas bibliografías?
2. ¿Cuál es el papel de la urea en la formación del cálculo dental?
3. ¿Cuál es el papel de la urea en la halitosis?

BIBLIOGRAFÍA

- Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. FEMS Microbiol Lett. 2000 Dec 1; 193(1):1-6.
- Reyes E, Martin J, Moncada G, et al. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. Journal of Applied Oral Science. 2014; 22(3):235-240.
- Morou-Bermudez E, Burne RA. Analysis of urease expression in Actinomyces naeslundii WVU45. Infect Immun. 2000 Dec;68(12):6670-6.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	211/218

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Para tener derecho a evaluación ordinaria, al alumno deberá tener 80% de asistencia como mínimo en las prácticas de laboratorio. La evaluación de laboratorio es determinada para cada alumno con base en:

- El trabajo desarrollado durante la práctica
- La entrega del reporte de práctica así como su contenido
- La evaluación formativa

El reporte de práctica deberá ser entregado en la siguiente sesión de laboratorio, en el momento de tomar la asistencia en el mismo manual de prácticas.

Resultados: Describir, dibujar, esquematizar, elaborar tablas y gráficas y/o realizar los cálculos de los resultados de los procesos o reacciones que se llevaron a cabo en la práctica. Interpretar los resultados obtenidos y cotejarlos con la bibliografía, así como la resolución del cuestionario.

La evaluación de los reportes de práctica utilizarán los siguientes criterios:

Apartado	Puntaje
- Resultados	2.5
- Análisis de resultados	2.5
- Conclusiones	2.0
- Cuestionario	2.0
- Bibliografía	1.0

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	212/218

Las evaluaciones formativas se llevarán a cabo con exámenes parciales de laboratorio (tres para microbiología y dos para bioquímica), tomando como calificación aprobatorio 6 (seis). En caso de no obtener esa calificación mínima, el alumno tendrá la oportunidad de realizar una primera y segunda vuelta. Para tener una calificación a promediar, es necesario que todos los exámenes de laboratorio sean aprobatorios.

La calificación final de laboratorio se determinará de la siguiente manera:

- 50% Promedio de calificaciones de los reportes de práctica
- 50% Promedio de exámenes

Es indispensable una calificación aprobatoria en laboratorio para que pueda ser promediada con la calificación de teoría ya que cualquiera de no ser así, el alumno automáticamente reprobará el módulo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	213/218

REGLAMENTOS DE LOS LABORATORIOS

Reglamento de laboratorio de Microbiología L-111 y L-112

1. Toda persona que permanezca en el laboratorio deberá portar una bata blanca de algodón y manga larga, completamente abotonada.
2. La asistencia a las prácticas de laboratorio es obligatoria y por lo tanto, se pasará asistencia al inicio de la sesión.
3. No se permitirá la entrada a ningún alumno después de haber transcurrido 15 minutos del inicio de la práctica.
4. El grupo en general, es responsable de mantener limpio y en buen estado el equipo y material del laboratorio durante la práctica.
5. Para el trabajo en el laboratorio, los integrantes del grupo formarán equipo con el número de personas que designe el profesor responsable.
6. Todos los alumnos que integran el equipo deberá limpiar el área de trabajo con desinfectante, así como lavar el material que sea suministrado para la realización de la práctica, antes de ocuparlo y al término de la actividad cuando sea indicado por el profesor o responsable del laboratorio.
7. El material necesario para desarrollar la práctica deberá ser solicitado en el interlaboratorio, utilizando un vale impreso expresamente para tal fin y adjuntando a éste, la credencial del alumno que firma el vale.
8. Al recibir el material, el usuario debe verificar que esté completo y sin daños.
9. Todo material que sea devuelto al interlaboratorio deberá estar completo y sin daños.
10. En el caso de ser material que requiera ser guardado en el interlaboratorio para su posterior observación, deberá ser etiquetado con una leyenda que incluya número de equipo, grupo y fecha; así como presentarse a la lectura de resultados en el período de tiempo establecido por el profesor.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	214/218

11. Las cepas que son utilizadas para el desarrollo de las prácticas deberán ser manipuladas a una distancia no mayor de 20 cm del mechero y desecharlas según las indicaciones del personal responsable del interlaboratorio.
12. Si por alguna razón, el material que se devuelve al interlaboratorio está deteriorado o incompleto, el usuario deberá hacer un vale adicional por ese material y dejar su credencial hasta que se reponga lo dañado o faltante; teniendo como límite dos semanas para reponer dicho material. Cumplido es tiempo, si no se ha repuesto el material, no se le permitirá el acceso al laboratorio a todos los integrantes del equipo deudor.
13. El alumno sólo podrá utilizar los aparatos que hay en el laboratorio durante el transcurso de la práctica y bajo supervisión de un profesor.
14. Cada equipo deberá traer para cada una de las prácticas, el material que indique el profesor como es:
 - a. Un rollo de masking tape
 - b. Jabón líquido para manos
 - c. Toallas desechables para secarse las manos
 - d. Algodón
 - e. Marcador indeleble
 - f. Papel seda
 - g. Asa bacteriológica
 - h. Material adicional que se requiera para cada práctica
15. Se debe mantener limpio el laboratorio y se prohíbe hacer uso inadecuado de las instalaciones.
16. Se prohíbe fumar, maquillarse, ingerir alimentos y/o bebidas en el interior del laboratorio.
17. Durante su estancia en el laboratorio se prohíbe la utilización de aparatos electrónicos debido a que se utiliza material biológico ya que puede provocar su contaminación.
18. Se prohíbe el paso al laboratorio, a cualquier persona ajena.



MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DEL MÓDULO INTRODUCCIÓN AL PROCESO
SALUD-ENFERMEDAD, NUTRICIÓN, METABOLISMO Y BASES FARMACOLÓGICAS

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	215/218

19. Al finalizar cada práctica, los alumnos deberán lavarse las manos para evitar infecciones.
20. Las personas que no respeten las indicaciones de este reglamento se harán acreedoras a las sanciones que determinen los profesores o las personas responsables de laboratorio.

BAJO CONCESIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	216/218

Reglamento de laboratorio de Bioquímica L-223 y L-218

1. Toda persona que permanezca en el laboratorio deberá portar una bata blanca de algodón y manga larga, completamente abotonada.
2. La asistencia a las prácticas de laboratorio es obligatoria y por lo tanto, se pasará asistencia al inicio de la sesión.
3. No se permitirá la entrada a ningún alumno después de haber transcurrido 15 minutos del inicio de la práctica.
4. El grupo en general, es responsable de mantener limpio y en buen estado el equipo y material del laboratorio durante la práctica.
5. Para el trabajo en el laboratorio, los integrantes del grupo formarán equipo con el número de personas que designe el profesor responsable.
6. Todos los alumnos que integran el equipo deberá lavar el material que sea suministrado para la realización de la práctica, antes de ocuparlo y al término de la actividad.
7. El material necesario para desarrollar la práctica deberá ser solicitado en el interlaboratorio, utilizando un vale impreso expresamente para tal fin y adjuntando a éste, la credencial del alumno que firma el vale.
8. Al recibir el material, el usuario debe verificar que esté completo y sin daños.
9. Todo material que sea devuelto al interlaboratorio deberá estar completo y sin daños.
10. Las sustancias químicas que son utilizadas para el desarrollo de las prácticas deberán ser manipuladas con precaución para evitar accidentes de quemadura y desecharlas según las indicaciones del personal responsable del interlaboratorio en el área para su disposición.
11. Si por alguna razón, el material que se devuelve al interlaboratorio está deteriorado o incompleto, el usuario deberá hacer un vale adicional por ese material y dejar su credencial hasta que se reponga lo dañado o faltante; teniendo como límite dos semanas para reponer dicho material. Cumplido es tiempo, si no se ha repuesto el material, no se le permitirá el acceso al laboratorio a todos los integrantes del equipo deudor.
12. El alumno sólo podrá utilizar los aparatos que hay en el laboratorio durante el transcurso de la práctica y bajo supervisión de un profesor.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	217/218

13. Cada equipo deberá traer para cada una de las prácticas, el material que indique el profesor como es:
 - a. Un rollo de masking tape
 - b. Jabón para manos
 - c. Toallas desechables para secarse las manos
 - d. Marcador indeleble
 - e. Material adicional que se requiera para cada práctica
14. Se debe mantener limpio el laboratorio y se prohíbe hacer uso inadecuado de las instalaciones.
15. Se prohíbe fumar, maquillarse, ingerir alimentos y/o bebidas en el interior del laboratorio.
16. Se prohíbe el paso al laboratorio, a cualquier persona ajena.
17. Al finalizar cada práctica, los alumnos deberán lavarse las manos para eliminar cualquier residuo químico con el que pudieron estar en contacto.
18. Las personas que no respeten las indicaciones de este reglamento se harán acreedoras a las sanciones que determinen los profesores o las personas responsables de laboratorio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-CD-ML02	08/03/2019	1	218/218

MANEJO DE RESIDUOS

