

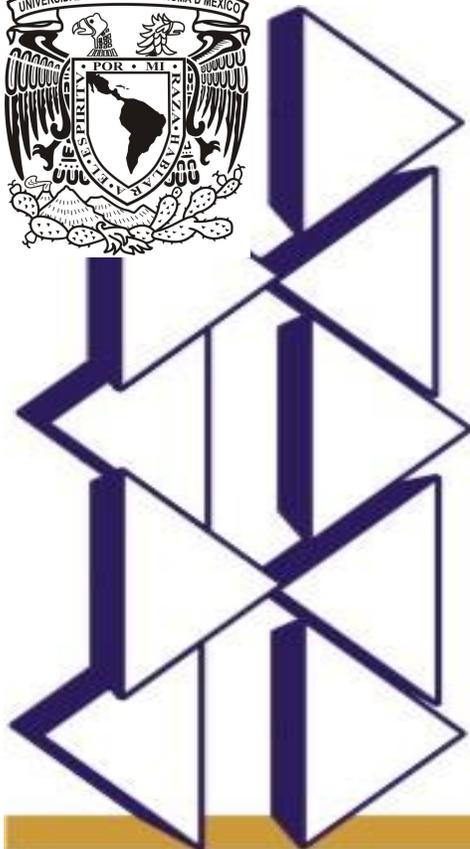
**CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO  
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**MANUAL DE PRACTICAS DE  
LABORATORIO**

**COMPONENTE: MICROBIOLOGÍA PARASITOLOGIA E INMUNOLOGIA  
CLINICA**

Primer año

**ACTIVIDAD: PRÁCTICA**



**F E S  
ZARAGOZA**

**MARCO LEGAL: APROBADO EN SESIÓN ORDINARIA EL 12 DE  
SEPTIEMBRE 2013 POR EL COMITÉ ACADÉMICO DE CARRERA**

México D.F. 2013.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**ZARAGOZA**

**CARRERA DE MEDICO CIRUJANO**  
**MANUAL DE PRÁCTICA DE LABORATORIO**  
**AREA DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**PRIMER AÑO**

**REALIZADO POR: JOSE FERNANDO ARELLANO COBIAN**

**YOLANDA GARCIA MENDEZ**

ACTUALIZACION, TRANSCRIPCION.

DIEGO ULISES ARELLANO GARCIA

COORDINACION, REVISION.

DOLORES PATRICIA DELGADO JACOBO

## **MISIÓN DE LA CARRERA**

Formar médicos generales poseedores de conocimiento científico y cultura universal para una práctica responsable, competente, ética y humanística que les permita contribuir a la prevención y solución de la problemática de salud del país, dotados de una actitud crítico-creativa, comprometidos con su actualización profesional y dispuestos a continuar con estudios de posgrado.

## **VISIÓN DE LA CARRERA:**

Ser una carrera con reconocimiento por sus innovaciones en la formación de médicos generales que participen activamente en el ejercicio de la profesión dentro de la sociedad de la información y el conocimiento. Esto a través de mejoras curriculares, la promoción de la formación docente y la optimización de los recursos disponibles.

**DIRECTORIO FES ZARAGOZA**

**Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez**  
Director

**Dr. Vicente J. Hernández Abad**  
Secretario General

**Dra. Rosalinda Escalante Pliego**  
Secretaria de Integración, Promoción y Desarrollo Académico

**M. en C. Faustino López Barrera**  
Secretario de Planeación

**Lic. Sergio Silva Salgado**  
Secretario Administrativo

**Dr. Omar Viveros Talavera**  
Jefe de la División de Ciencias de la Salud y el  
Comportamiento

**Dr. Edelmiro Santiago Osorio**  
Jefe de la División de Posgrado e Investigación

**DIRECTORIO CARRERA MÉDICO CIRUJANO**

**Dr. Noé Contreras Gonzales**  
Jefe de Carrera

**M.C. María Luisa Ponce López**  
Secretaria Técnica de la Carrera

**M.C. Dolores Patricia Delgado Jacobo**  
Coordinadora Área Ciencias Biomédicas

**M.C. Irma Araceli Aburto López**  
Coordinadora del Área de Ciencia de la Salud Pública

**M.C. María del Carmen García Ríos**  
Coordinadora del Área Terminal del Internado y Servicio  
Social

**M.C. Rocio Paniagua Hernández**  
Coordinadora de Ciencias Clínicas

**ELABORADO POR:**

**José Fernando Arellano Cobián**

**Yolanda García Méndez**

**COORDINADO POR:**

**Patricia Dolores Delgado Jacobo**

## **DESCRIPCIÓN Y USO DEL MICROSCOPIO**

Objetivos:

Antecedentes históricos del microscopio.

Conocimiento de las partes fundamentales del microscopio

Cuidados que se deben tener con el microscopio.

Factores que dañan al microscopio.

Principales aplicaciones de otro tipo de microscopios.

Introducción:

Que divertido debía ser mirar a través de una lente y ver las cosas de tamaño mayor que a simple vista. ¿Comprar lentes?; leeuwenhoek no sería quien hiciera tal cosa!; Jamás se vió hombre más desconfiado !¿Comprar lentes?; NO, él se las fabricaría!.

Los descubrimientos del microscopio hacia finales del siglo XVI e inicios de siglo XVII, que no puede atribuirse con seguridad a un sabio determinado, señala el inicio de la biología moderna. Los grandes microscopistas del siglo XVII, leeuwenhoek, hooke, Swammerdam, etc, impulsaron prodigiosamente nuestros conocimientos y revelaron a los ojos maravillados de sus contemporáneos el universo del lo infinitamente pequeño.

El descubrimiento de animalículos y de las bacterias se debe, sobre todo al genial leeuwenhoek, abrió a las investigaciones un campo de acción nuevo e insospechado; hizo retroceder las fronteras del mundo viviente hasta los límites extremos de la pequeñez y puso también de manifiesto el infinito poder de expansión de la vida.

Del conocimiento de los animalículos al de sus estructuras solo había un paso, y este se dio. Los descubrimientos de la organización de la universalidad de la célula fueron sus consecuencias lógicas y fecundas.

El descubrimiento del microscopio no ha dirigido a las investigaciones médico-biológicas en un solo sentido; por lo contrario, la ha diversificado y le ha dado accesos a un mundo de seres vivos que nuestros sentidos, abandonados a sus posibilidades naturales, son incapaces de manifestarnos.

## **Conocimiento de las partes fundamentales del microscopio.**

Un microscopio simple es una lente de aumento ordinario, con la cual se pueden observar múltiples objetos microscópicos. El microscopio compuesto (de micros-pequeño y scopein-observar), digiere del microscopio simple, en que tiene 2 sistemas de lentes, uno conocido como objetivo y el otro como ocular, montados en un tubo o cuerpo del microscopio, la imagen que ve el ojo, tiene un aumento igual al producto de la multiplicación de los aumentos de los 2 sistemas de lentes.

Las diferentes partes del microscopio pueden clasificarse en cuatro sistemas:

- a) Sistema de soporte
- b) Sistema de aumento
- c) Sistema de iluminación
- d) Sistema de ajuste

El sistema de soporte corresponde:

- a) El pie
- b) El brazo
- c) El revólver (porta objetivos)
- d) La platina
- e) El carro (no todos o microscopios lo poseen)

El sistema de aumento: se constituye por una combinación de lentes: el tubo, ocular y los objetivos.

Los lentes del microscopio están fijados en dos conjuntos, cada uno de la extremidad de un tubo largo.

El primer conjunto de lentes abajo del tubo y arriba de la preparación a examinar es el lente objetivo.

El segundo conjunto de lentes esta en lo alto del tubo, donde se colocan los ojos denominados oculares.

Objetivos

- A) El aumento

Esta indicado para cada lente, por un numero que se encuentra grabado en el tubo.

El objetivo 5 aumenta 5 veces

El objetivo 10 aumenta 10 veces presentando en la circunferencia del tubo , cercanos a la lentes una banda de color amarillo.

El objetivos de 40 aumenta 40 veces presentando banda color azul.

El objetico 100 aumenta 100 veces, presentando una banda de color blanco. Es el objetivo que se utiliza en inmersión de aceite de cedro.

#### **B) Distancia frontal útil de un objetivo.**

Es la distancia frontal que separa al objetivo de la preparación a examinar cuando tenemos una imagen nítida.

Entre mas largo es la lente objetiva, la distancia frontal disminuye:

Objetivo 5... distancia frontal de 20-25mm.

Objetivo 10... distancia frontal de 5-6mm.

Objetivo 40... distancia frontal de 0.5-1.5mm.

Objetivo 100...distancia frontal de 0.15-0.20mm.

#### **C) Poder de resolución**

El poder de resolución de ojo humano es de 0.25mm. el poder de resolución de un microscopio es de alrededor 0.25 micras. Por lo tanto lo entendemos como la capacidad de observar lo más pequeño.

Mientras el poder de resolución del objetivo sea mayor, más nítida se verá la imagen; por lo tanto pueden verse dos puntos separados por distancias mínimas.

#### **LENTE OCULARES**

El aumento está indicado sobre las lentes oculares. Un aumento de 10x aumenta 10 veces la imagen producida por el lente objetivo.

Para conocer el aumento del objeto observado, basta multiplicar el aumento de la lente objetiva por el aumento de la lente ocular. los microscopios utilizados en el laboratorio medico generalmente aumenta de 50 a 100 veces imágenes.

Hoy en día también se les puede nombrar a los objetivos como sigue; al de 5x lupa, al de 10x seco débil, al objetivo de 40x seco fuerte, y al de 100x inmersión.

	ocular	objetivo	Amplificación	Diámetro de campo
Seco débil	10x	10x	100	1500 micras
Seco fuerte	40x	40x	400	900 micras
Inmersión de aceite	10x	100x	1000	120 micras

Los microscopios binoculares (dos oculares) permiten exámenes prolongados sin fatigar la vista. Una iluminación eléctrica es muy indispensable para utilizar el objetivo de inmersión.

#### **D) Sistema de iluminación**

La fuente luminosa de preferencia iluminación eléctrica para permitir un manejo más fácil. Está compuesta por una lámpara integrada al microscopio debajo de la platina.

El condensador; sirve para concentrar los rayos luminosos y dirigirlos hacia la preparación a examinar. El condensador está situado entre la fuente luminosa y la platina. Puede aumentarse la luminosidad máxima o bajarse a luminosidad mínima.

El diafragma: sirve para disminuir o aumentar la cantidad de luz que pasa en el condensador. Es un obturador cuya apertura tiene un diámetro variable. Está colocado en el condensador.

#### **E) Sistema de ajuste.**

Este está integrado por

- Tornillo macrométrico : tornillo de enfoque rápido : es el tornillo más grande y se utiliza primero.
- Tornillo micrométrico: tornillo de enfoque fino. Cuenta con un desplazamiento mucho más lento. Permite enfocar después del ajuste aproximado obtenido con el tornillo de enfoque rápido.

- Tornillos de carro móvil: sirven para desplazar la laminilla sobre la platina. Un tornillo para desplazar de adelante hacia atrás y un tornillo para desplazar de izquierda a derecha.

## **MANEJO DEL MICROSCOPIO**

- El esfuerzo excesivo y la fatiga deben evitarse en la observación microscópica.
- Este se consigue atendiendo a los siguientes hábitos.
- El banco y la mesa debe estar a una altura que permita al observador el uso del microscopio en posición vertical, de una manera confortable.
- Encender la fuente de iluminación.
- Montar la preparación que se va a observar.
- Separa los binoculares. En los microscopios binoculares se ajusta a la separación interpupilar (distancia entre los dos ojos) y se adapta a cada confortación.
- Enfoque entre el ojo derecho e izquierdo. Los dos tubos porta oculares son susceptibles de ajustarse. Esto se logra tratando de enfocar la imagen con el tronillo macrométrico y micrométrico con el lente objetivo de menor aumento, si la imagen no es clara subir o bajar en ocular mediante el movimiento del tornillos que rodea el tubo portaocular, hasta que se ve a nítido y el microscopio quede ajustado a su propia visión binocular. Si la imagen no es clara es necesario enfocar.
- Enfoque de imágenes
- Para enfocar con cualquier, pero especialmente con el de seco fuerte 40x y con el de inmersión 100x deberá acercarse el objetivos a la preparación observada de lado para controlar el descenso hasta que la lente frontal de dicho objetivo quede dentro de la distancia focal. Solo entonces se deberá mirar por el ocular alejando lentamente el objetivo hasta el enfoque correcto, que se afinara con movimientos cuidadosos del tronillo de enfoque lento.
- Enfoque con el objetivo de aceite de inmersión 100x
- Colocar la laminilla perfectamente seca, agregar una gota de aceite de inmersión, sobre la parte a

examinar. Bajar el objetivo 100x para que quede en contacto con el aceite, lo más cerca posible sin llegar a romperla observación de lado para controlarse descenso. Observar en el ocular, mover lentamente el tornillo micrométrico hasta que se vea la imagen.

- Cambio de objetivos. Los microscopios modernos son fabricados de tal manera que se pueden pasar de un objetivo a otro para mover el mismo objeto más grande. El enfoque para la nitidez de la imagen queda casi hecho
- Al terminar sus observaciones los alumnos deberá limpiar nuevamente los objetivos y a las preparaciones.

### **OBSERVACIÓN CON EL MICROSCOPIO**

- a) Asegúrese de las características del preparado que va a observar, es decir que órgano, tejido, o bacterias se encuentran montados en la laminilla.
- b) Limpie la preparación, con cuidado no ejerciendo mucha fuerza sobre ella, con un trapo o franela. Si es necesario usar xilol para quitar el aceite de una observación anterior, o la grasa de los dedos, en este punto es importante el asesoramiento por el profesor de laboratorio.
- c) Antes de colocar su preparación sobre la platina de microscopio, véase contra la luz a simple vista. Existen dos motivos para ello, en primer lugar el cubreobjetos puede estar lleno de polvo, sucio o cubierto de aceite de endurecido: en segundo lugar, a medida que usted prenda, cada vez más fácilmente podrá simplemente considerando el preparado, deducir cual es el origen del mismo.
- d) El ocular y las lentes objetivas deben estar limpias. La limpieza de las mismas se hará usando solo papel para este propósito (lens cleaning paper kodak). Limpie con un fragmento de este papel la lente del ocular, no extraer el ocular, limpie la lente de los objetivos.
- e) Seleccione un campo o campos apropiados y previa observación a 5x, 10x obsérvelos a 40x.
- f) Para hacer una observación a inmersión es necesario centrar primero el campo que se desea observar.

## **IMÁGENES VISTAS AL MICROSCOPIO**

Recordemos que el disco luminoso visto en el microscopio a través de los oculares se le llama campo microscópico.

¿Como se sitúan los objetos en el campo? Se pueden situar los objetos con relación a las manecillas del reloj, por ejemplo los estreptococos se encuentran a las 3 horas y los diplococos a las 8 horas. Inversión de imágenes, las imágenes vistas en el microscopio son invertidas, debido a las lentes. Los objetos se ven abajo del campo cuando están situados arriba. Los objetos se ven a la derecha del campo cuando están a la izquierda.

Desplazamiento de objetos.

Si se desplaza la laminilla a la derecha el objeto examinado va hacia a la izquierda.

Si se desplaza a la laminilla hacia delante, el objeto examinado se dirige hacia atrás.

## **CUIDADOS QUE SE DEBEN TENER CON EL MICROSCOPIO**

El microscopio es un instrumento delicado y de posición, construido para realizar un trabajo preciso, que si no se le trata con el debido cuidado, puede dañarse y darnos un rendimiento limitado, en cambio si se le trata como es debido, su rendimiento es mayor.

También es importante tomar en cuenta que es un instrumento de alto costo, difícil de reemplazar, por lo tanto requiere de cuidados como los siguientes.

- 1) Debe ser guardados en un lugar seco y cubierto del polvo ya que este además de dificultar la observación raya los lentes objetivos y oculares cuando son frotados o para su limpieza
- 2) Al trasladarlo de un lugar a otro, por abajo del soporte o plataforma,
- 3) Antes de usarse debe cerciorarse de que los lentes accesibles estén limpios, de no ser así hay que limpiarlos. El vidrio de la lente es blando y se raya con facilidad por lo tanto la limpieza de los mismos

se hará usando solo papel manufacturado para este propósito, las lentes accesibles son oculares, objetivos y condensador. No deben quitarse las lentes de su lugar porque podría permitir que se introdujera polvo al interior del microscopio que muchas veces no puede ser quitado sino mediante desmonte o desarme de las lentes y solo puede hacerlo personal especializado para ello.

- 4) Cuando se usa aceite de inmersión, una vez terminada la observación hay que quitar el aceite que ha quedado en la lente y la laminilla ya que si se deja, se reseca y se adhiere a la lente y laminilla y después es más difícil quitarlo, para quitar el exceso de aceite se emplea papel limpia lentes; en ocasiones cuando es difícil quitar el excedente de aceite deberán quitarse con xilol. Humedeciendo el papel limpia lentes en este solvente ya que el cemento que mantiene fijas las lentes es soluble en él y estas pueden zafarse de su sitio si se moja en exceso, es importante estar asesorado por su profesor de laboratorio.
- 5) Se prescindirá de desarmar el microscopio ya que puede desajustar o dañar sus partes; las lentes no deben ser desarmadas por el observador.
- 6) La lente deben ser limpiadas con agua destilada y las de inmersión con xilol. No emplear en exceso xilo por que la lentes vienen montadas con bálsamo de Canadá , el cual es disuelto por xilol, de lo antes dicho solo se efectuara con asesoramiento del profesor del laboratorio.
- 7) Las partes del soporte del microscopio "su superficie", deben limpiarse con un trapo de algodón, y se les da brillo con aceite mineral, la cremallera de tornillo micrométrico debe ser limpiada ocasionalmente con una pequeña cantidad de aceite o grasa delgada, el tornillo micrométrico no necesita aceite.
- 8) Cuando no se usa el microscopio, se guardara en una caja o sitio que tenga destinado, cubierto con su funda de plástico.
- 9) Procurar que las preparaciones estén siempre limpias, se pierde visibilidad cuando estén sucias por huellas digitales, aceite de cedro o polvo.

- 10) En caso de alguna duda, falla mecánica u óptica del microscopio deberá darse aviso inmediato a su profesor de laboratorio.

#### Factores que dañan al microscopio

- a) Nunca lavar los lentes oculares y de los objetivos con alcohol.
- b) Nunca utilizar papel ordinario o algodón para limpiar los lentes.
- c) Nunca poner los dedos en lo objetivos.
- d) Nunca limpiar el soporte y la platina con xilol.
- e) Nunca limpiar los lentes interiores de los oculares y objetivos con tela o papel (solo pincel de pelos finos).
- f) Nunca dejar el microscopio si sus oculares.
- g) Nunca guarde el microscopio con aceite de inmersión en los objetivos de 100x.
- h) Nunca transporte el microscopio con una sola mano.

#### Material por equipos

##### Microscopio óptico

Frotis preparado de bacterias.

Frotis preparado de hongos.

Frotis preparado de sangre.

Preparación de letras.

Papel seda.

##### Desarrollo

Las preparaciones que se les proporciono enfocarlas con los diferentes objetivos, (lupa, seco débil, seco fuerte e inmersión).

Conocimiento de los cuatro sistemas en que se compone el microscopio, así como su manejo adecuado.

Efectuar esquemas de ls diferentes tipos de microscopios que existen, como también de las preparaciones que se le proporciono en los diferentes objetivos.

## **Cuestionario**

¿Mencione tres microscopistas importantes en la evolución de microscopio y su obra.

¿Cuál es la aplicación clínica del microscopio?

Mencione 5 factores que dañan al microscopio y 5 cuidados.

Mencione 5 tipos de microscopio y su funcionamiento

¿Qué significa microscopio simple y compuesto?

¿Qué es poder de resolución y cual el del microscopio óptico, electrónico y cual para el ojo humano?

Defina distancia frontal mínima o útil

## **TINCIONES SIMPLES**

Objetivo: conocer diversas técnicas de coloración.  
Observación de preparaciones.

### **INTRODUCCIÓN**

Los colorantes se combinan únicamente con el protoplasma bacteriano; si la célula no ha muerto, el proceso mismo de la tinción la mata. El método por consiguiente, es bastante severo y puede producir artefactos.

Los colorantes más usados son sales.

Los básicos consisten en un catión coloreado unido a un anión incoloro, (ejemplo, clorhidrato de azul de metileno).

Los ácidos constituyen exactamente lo contrario. (ejemplo eosinato de sodio)

Las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos, los cuales portan cargas negativas en forma de grupos fosfato, estos se combinan con los colorantes básicos cargados positivamente lo cual les hace ser de los más usados en citología bacteriana. Los colorantes ácidos no tiñen la célula bacteriana y, por lo tanto, pueden ser usados para impartir al fondo un color de contraste.

Los colorantes básicos tiñen las células bacterianas uniformemente, a menos que previamente sea destruido el RNA del citoplasma. Sin embargo se pueden usar técnicas especiales para diferenciar flagelos, capsula, pared celular, membrana celular, gránulos, núcleos y esporas, como se observará en prácticas más adelante.

Para observar los microorganismos al microscopio empleamos técnicas de coloración para observarlos mejor o hacer estudios más detallados de los mismos.

Las técnicas de coloración las podemos dividir de una manera general en dos grupos principales:

- a) Técnicas de coloración simple
- b) Técnicas de coloración especial o diferencial.

Llamamos Técnicas de coloración simple a aquellas en donde se emplea un solo colorante para teñir, ejemplo azul de metileno, safranina, verde de malaquita etc.

Llamamos Técnicas de coloración especial o compuesta en donde se usan combinaciones de dos o más colorantes, ejemplo gran, Ziehl-Neelson, Giemsa., etc.

Material

Portaobjetos

Mechero

Asa con portasa

Microscopio

Colorantes: azul de metileno, KOH al 10% y verde de malaquita

Cultivos de: *saccharomyces cerevisiae*, *bacillus subtilis*, *staphilococcus aureus*, *streptococcus mutans*.

Procedimiento:

Colocar una gota de agua sobre un portaobjetos limpio con el asa se toma se muestra una muestra del cultivo de una de la cepas.

Esta muestra se coloca sobre el portaobjetos, emulsionar sobre la gota de agua.

Fijar al calor.

Secar al aire.

La coloración se efectúa agregando unas gotas de colorante dejar 2 o 3 minutos.

Lavar con agua "chorro leve y no directo sobre la muestra".

Secar y con aceite de inmersión observar al microscopio.

Efectuar una tinción para cada una de las bacterias.

Reportar las diferentes morfologías, observadas y efectuar esquemas.

El asa bacteriológica, deberá ser esterilizada, al calor antes y después de cada paso.

## **Cuestionario**

Definir colorante

Enuncie tinciones simples y especiales y diferencias entre las dos

¿Cuál es el tamaño promedio de las bacterias?

¿Qué ventajas se tienen en una preparación entre porta y cubre objetos y que desventajas?

¿En qué consiste un colorante básico y uno ácido?

¿Cuál es la importancia de las técnicas de coloración?

Enuncie tres bacilos patógenos para el hombre

Efectué un esquema de una bacteria "tipo" enunciando los componentes de toda su estructura.

## **TINCION DE GRAM Y ZIEHL-NEELSEN**

### **OBJETIVOS:**

-Mencionar los pasos de la preparación de una tinción de Gram y describir el aspecto de las bacterias grampositivas y gramnegativas después de cada paso.

-Comparar la tinción de Gram y la tinción de acido-alcohol resistente.

-Reconocer la importancia bacteriológica y medica de las tinciones Gram y Ziehl-Neelsen.

### **INTRODUCCIÓN:**

En la naturaleza existen dos tipos de células: procariotas y eucariotas. Las bacterias, no se pueden observar claramente bajo el microscopio óptico. Para observarlas y estudiarlas detalladamente necesitan de una tinción, ya sea simple (un colorante) o diferencial (mas de un colorante).

Las bacterias poseen un tamaño entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ . Están constituidas por un citoplasma con ribosomas; material genético (ADN), nucleótidos sin membrana. La membrana citoplasmática esta rodeada por la pared celular, dura, elástica y de peptidoglucano, que le da forma a la célula.

Las bacterias se clasifican en dos grupos en base a la estructura de la pared celular. Las gram (+), solo poseen peptidoglicano; las gram (-), tienen una membrana rica en lipopolisacaraidos por encima del peptidoglicano.

Las técnicas utilizadas para el diagnostico etiológico de las infecciones dependen de las características biológicas. La mayoría se pueden realizar a través del microscopio, ya sea en fresco o por tinciones, como la de Gram y la de Ziehl-Neelsen.

### **Tinción**

Hans Cristian Joachim Gram, en 1884, utilizo un método de tinción diferencial para las bacterias. Actualmente conserva su nombre y sirve para dividir a las bacterias en dos clases: grampositivas y gramnegativas.

El primer paso para efectuar una tinción bacteriana es la preparación de un frotis o extensión de material a observar

sobre un portaobjetos de vidrio, mediante una asa bacteriológica, para obtener una película homogénea.

En la primera parte de la tinción se baña con violeta de genciana (denominando colorante primario), quedando todas las bacterias teñidas de color morado intenso.

Después de un breve lapso, se lava y se le cubre con yodo, un mordiente. Cuando

Se lava el yodo, tanto las bacterias grampositivas como las gramnegativas

Aparecen de color violeta oscuro o púrpura.

Al cubrirse posteriormente con una mezcla de alcohol y acetona (solución decolorante), algunas bacterias conservan dicha coloración, mientras que otras se decoloran y la pierden totalmente.

En la segunda parte de la tinción se hace actuar un colorante básico de contraste, la safranina, para teñir a las bacterias gramnegativas que se verán de color rosa.

Las que conservan la coloración morada se denominan grampositivas, y las que la pierden gramnegativas.

Tincion de Ziehl-Neelsen

Existen bacterias atípicas, como las micobacterias, que constituyen un grupo de importancia medica. El diagnostico se ve influido por dos características: la lentitud de su crecimiento y el alto contenido de lípidos en su pared. Se hallan dos especies patógenas de genero Mycobacterium tuberculosis (bacilo de Koch) y Mycobacterium leprae ( bacilo Hansen). Aunque estructuralmente pueden ser consideradas como bacterias grampositivas, no se tiñen por este método.

Son resistentes a los ácidos y a los álcalis, por lo que se tiñen con dificultad pero, una vez teñidas resisten a la acción decolorante de los ácidos (acidorresistentes). La tinción diferencial utilizada es la de Ziehl-Neelsen. También se utiliza para identificar las cepas patógenas del genero Norcadia.

Para la incion de Ziehl-Neelsen se prepara un frotis. En la primera parte se baña con rojo carbol-fucsina, se calienta

suavemente el portaobjetos durante algunos minutos. Los elementos de la preparación quedan teñidos de color rojo de las bacterias no ácido-alcohol-resistentes y las micobacterias conservan el color rojo. En la segunda parte se hace actuar el azul de metileno, que contrasta los elementos no ácido-alcohol-resistentes. Las bacterias se observan teñidas de rojo intenso contra un fondo azul.

**MATERIAL:**

Porta objetos

Asa bacteriológica

Mechero de bunsen

Tripie con lamina de asbesto

Aceite de inmersión

Microscopio

Cristal de violeta

Lugol

Alcohol-acetona

Safranina

Fucsina de Ziehl

Azul de metileno

Alcohol ácido

Cepas:

Bacillus subtilis

Staphylococcus aureus

Serratia marcescens

Mycobacterium sp.

## **MÉTODO**

### **Tinción de Gram**

Preparar un frotis con cada una de las cepas.

Cubrir la preparación con Cristal de Violeta durante un minuto.

Lavar con agua, suavemente.

Decolorar con alcohol-acetona hasta que la preparación no desprenda colorante, aproximadamente 30 segundos.

Lavar con agua, suavemente.

Cubrir con safranina durante 30 segundos.

Lavar y secar al aire.

Observar al microscopio (10X, 40X, Y 100X inmersión).

### Tincion de Ziehl-Neelsen

Preparar un frotis con la cepa de Mycobacterium sp. Secar a temperatura ambiente.

Cubrir con fucsina funicada de Ziehl.

Dejar reposar durante 30 segundos.

Calentar hasta emisión de vapores durante 4 a 6 minutos. Cuidar que el colorante no se seque y no hierva, agergando mas colorante. Repetir el calentamiento dos veces mas.

Dejar enfriar y lavar con agua.

Decolorar con alcohol acido, durante dos minutos.

Lavar con agua.

Cubrir la preparación con azul de metileno durante un minuto.

Lavar con agua y secar.

Observar al microscopio (10X,40X, 100X inmersión).

Realizar una tabla de resultados que contenga el nombre del microrganismo, morfología, color y tipo Gram.

Realizar dibujos de lo observado para su reporte.

## **CUESTIONARIO**

1. Investigue la estructura química de la pared celular de una bacteria grampositiva y una gramnegativa.
2. ¿Qué es un mordiente? ¿Cuál se utilizó en la práctica?
3. ¿Qué papel desempeña el colorante secundario en la tinción de Gram?
4. Explique los factores que pueden variar los resultados en la tinción Gram.
5. ¿Qué otras tinciones existen para observar a las micobacterias?
6. ¿Por qué es útil la reacción de Gram para recetar un tratamiento antibiótico?
7. ¿Qué enfermedades pueden diagnosticarse mediante la tinción de microorganismos ácido-alcohol-resistentes.

## **MEDIOS DE CULTIVO Y TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE BACTERIAS**

### **OBJETIVOS:**

-Distinguir entre los medios de cultivo químicamente definidos y complejos.

-Conocer y realizar diferentes técnicas de aislamiento de bacterias en diferentes tipos de medios de cultivo.

### **INTRODUCCIÓN:**

Medios de cultivo es un material nutritivo preparado para el crecimiento de microorganismos. La introducción de medios solidos por koch, constituyó un avance muy importante.

Frau Hesse, utilizó por primera vez al agar, que se empleaba para esperar las sopas. El agar es un agente solidificante común para los medios de cultivo. El agar es un polisacárido ácido derivado de ciertas algas marinas, galactosa y sulfato. No es tóxico y proporciona una superficie suficientemente húmeda para facilitar el crecimiento y lo bastante seca para mantener separadas colonias.

Muchas bacterias se multiplican abundantemente en medios de cultivo, incubados a 37°C. Pueden crecer bacterias, hongos, levaduras y protozoarios. Algunas bacterias no pueden visualizarse o cultivarse como los microplasma, treponemas, clamidias, rickettsias, así como los virus, su diagnóstico se realiza por pruebas serológicas.

### **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo deben contener elementos nutritivos necesarios para permitir la multiplicación de las bacterias. Requerimientos físicos como pH y presión osmóticas apropiados; requerimientos químicos como fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, fosforo, oligoelementos, oxígeno y factores de crecimiento orgánicos (vitaminas, cofactores, coenzimas).

La cantidad y variedad de medios de cultivo no tiene limite, excepto el que impone la imaginación para su

elaboración. Los medios de cultivo se pueden clasificar de acuerdo a su consistencia en:

Líquidos (caldos). Los medios líquidos son una infusión de proteínas, peptonas, glucosa, cloruro de sodio. Permiten la multiplicación de las bacterias en masa celular. La interpretación positiva es la observación de cambios en su color o turbidez, a simple vista. La siembra es mediante "agitación" del asa dentro del medio.

Sólidos (agares). Los medios sólidos, consta del medio líquido más agar en polvo que se por ebullición y al enfriarse se solidifica. Pueden prepararse en tubos o cajas. Permiten el aislamiento, la identificación entre microorganismos, a través de la morfología colonial.

En cuanto a su composición se dividen en:

- Simple. Contienen las sustancias nutritivas nutritivas mínimas para el crecimiento de bacterias no exigentes, como *Escherichia coli* y los estafilococos. Pueden ser líquidos o sólidos. También son utilizados como base para la preparación de otros medios.
- Enriquecidos. Son medios simples a los que se les añade suero, carbohidratos, sangre, caseína digerida, extracto de levadura, vitaminas o cofactores. Permiten el crecimiento de bacterias exigentes en requerimientos nutritivos, por ejemplo estreptococos, neumococos, gonococos, bacterias hemofílicas. En los medios con sangre puede observarse la hemólisis que producen algunas bacterias. También, por su finalidad o función, pueden ser de:
  - Aislamiento. Deben ser sólidos, simples. Con la finalidad de aislar bacterias por la técnica de agotamiento.
  - Selectivos. Permiten aislar específicamente un solo tipo de bacterias que esta en escasa cantidad a partir de una mezcla. Inhibiendo el resto de las existentes en la muestra. La función se cumple al añadir cloruro de sodio a concentración elevada, el citrato sódico, el cristal violeta, las sales biliares, antibióticos y antisépticos.
  - Medios de enriquecimiento. Son medios líquidos que cumplen la misma función que los selectivos. Las muestras se siembran previamente. Y luego de la

incubación, deben sembrarse en un medio selectivo sólido.

- Selectivo- diferencial. En los medios selectivos se añaden sustancias que confieren un color diferente a las colonias según la distinta actividad metabólica de las bacterias que las forman, convirtiéndose en medios selectivos- diferenciales.

Se utilizan azúcares como el manitol, la lactosa, el sorbitol, junto con un indicador de pH (rojo neutro, azul de bromotimol, etc.). También se pueden preparar medios diferenciales basándose en reacciones metabólicas diferentes de la fermentación de los azúcares, como la descarboxilación de la lisina, la producción de ácido sulfhídrico, que producen cambios de color en las colonias o los medios.

#### Técnicas de aislamiento de bacterias

El cultivo puede realizarse a partir de la muestra clínica obtenida del foco de infección (pus, orina, líquido cefalorraquídeo, exudados, etcétera) o de una cepa pura. Existen procedimientos que permiten aislar las bacterias causantes de la infección.

El asa bacteriológica constituye un instrumento básico en la bacteriología. Tiene la propiedad de calentarse y enfriarse rápidamente en pocos segundos. Permite tomar una muestra de microorganismos, efectuar un frotis o las siembras en medios de cultivo y esterilizar, para utilizarse nuevamente.

La siembra se efectúa con un asa sobre la superficie del agar contenido en una caja de Petri, por la técnica de agotamiento, que permitirá separar las diferentes bacterias de la mezcla. La siembra por agotamiento consiste en reseguir en zigzag la superficie del medio con el asa previamente cargada con el material a sembrar.

Las células bacterianas se van depositando sobre la superficie del agar a lo largo del recorrido del asa, al final del cual quedan pocas bacterias, por lo que se depositan muy separadas unas de otras.

Al sembrar una muestra clínica en un medio de cultivo, las bacterias empiezan a multiplicarse, se duplican cada 20 a

30 minutos. Las cajas se incuban entre 18 y 24 horas. Las bacterias se multiplican dando lugar a unos agregados de millones de bacterias que forman colonias, cuyo tamaño es de varios milímetros, y son visibles a simple vista. Cada colonia aislada contiene bacterias del mismo tipo, idénticas a las que originó. Para realizar la lectura de la morfología colonial en las siguiente sesión.

Su aislamiento permite su identificación y el estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos.

#### Incubación

Cada tipo de bacteria requiere para su multiplicación una temperatura óptima de 35 a 37°C, en una estufa, cuya atmósfera es la del ambiente.

#### **MATERIAL**

- Mechero
- Asa bacteriológica
- Lápiz graso o marcador
- Gradilla
- Hisopos estériles
- Caldo nutritivo (en tubo)
- Agar simple inclinado ( en tubo)
- Medio de SIM (en tubo)
- Agar nutritivo (en caja de Petri)
- Agar sangre (en caja de Petri)
- Agar S-110 (en caja de Petri)

#### Cepas

- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomona sp.*

#### **MÉTODO**

##### **A). Técnica de transferencia aséptica.**

-Calentar el asa al rojo vivo para esterilizar.

-Sostener el tubo del cultivo que contienen la cepa a inocular con la mano izquierda.

-Quitar el tapón, flamear la boca del tubo y tomar una asada de la cepa a inocular o sembrar. Flamear nuevamente el tubo que contiene la cepa y tapar.

-Demostración por parte del profesor.

#### **B). Siembra en Agar Simple Inclinado**

-Realizar la técnica de transferencia aséptica.

-Ahora tomar el tubo de agar simple inclinado, destapar y flamear la boca del tubo.

-Sembrar por estría superficial, con movimientos en forma de zigzag, la cepa de *Staphylococcus aureus*.

-Retirar el asa, flamear la boca del tubo y tapar el medio.

-Esterilizar nuevamente el asa.

#### **C). Siembra en caldo nutritivo**

-Realizar la técnica de transferencia aséptica.

-Sembrar por agitación con el asa dentro del tubo de caldo nutritivo, la cepa de *Staphylococcus aureus*.

-Retirar el asa, flamear la boca del tubo y tapar el medio.

-Esterilizar nuevamente el asa

#### **D). Siembra de medio de SIM.**

-Para llevar a cabo esta siembra el asa bacteriológica deberá estar completamente recta.

-Realizar la técnica de transferencia aséptica, utilizando la cepa de *Klebsiella Pseudomoniae*.

-La siembra se realizará por picadura, lo importante es tratar de introducir y retirar el asa por el mismo sitio de inoculación.

#### **E). Siembra en los medios sólidos en caja: Agar nutritivo (*Pseudomona sp.*) y Agar S-110 (*Staphylococcus aureus*).**

-El profesor hará una demostración del cómo abrir y cerrar los medios de cultivo en cajas de Petri.

-Dividir las cajas en tres cuadrantes, por atrás del medio de cultivo y con la ayuda de un lápiz graso.

-Realizar la técnica de transferencia aséptica, para cada una de las cepas.

-Sembrar por estría cruzada. Sobre la superficie del cuadrante número dos. Trazar un zigzag más abierto, arrastrando inóculo del primer cuadrante.

-Esterilizar nuevamente el asa, repetir el paso anterior, arrastrando inóculo del cuadrante dos.

#### **F). Siembra en Agar Sangre**

-Dividir el medio en tres cuadrantes con el lápiz graso.

-Realizar un exudado faríngeo, la muestra se tomará con un hisotopo estéril y se depositará en el cuadrante uno.

-Sembrar por estría cruzada de aislamiento, como el procedimiento anterior.

-Etiquetar los tubos y cajas con le número de grupo y equipo.

-Incubar a 37°C durante 24 horas.

-Es importante guardar los medios sólidos en cajas de Petri para la siguiente práctica.

## CUESTIONARIO

1. ¿Qué bacterias esperaría encontrar de la muestra tomada de la cavidad oral, si en ese momento no existe alguna patología?
2. ¿Por qué después de efectuar las diferentes técnicas de aislamiento el material debe ser incubado a 37°C?
3. ¿Cuál es la razón de mantener a la temperatura ya señalada durante 24 horas?
4. ¿Cuál es la importancia medica de realizar técnicas de aislamiento de bacterias en medio de cultivo?
5. ¿Qué es inóculo?
6. ¿Cuál es la definición de colonia?
7. ¿Qué ejemplos hay de los medios que son tanto selectivos como diferenciales?
8. Una colonia formada como resultado de una siembra por estría en placa, ¿siempre proviene de una única bacteria?

## **MORFOLOGIA BACTERIANA Y COLONIAL**

### OBJETIVO:

- Conocer diversas técnicas de coloración.
- Reconocer por medio de tinciones diferentes estructuras bacterianas.
- Conocer los parámetros empleados para estudiar la morfología colonial.
- Saber la importancia de la curva del crecimiento.

### INTRODUCCION:

El método más común para examinar bacterias es hacer primero una película delgada de los organismo sobre un portaobjetos limpio y después aplicar colorantes al frotis seco.

Los colorantes se combinan químicamente con el protoplasma bacteriano, si la célula no ha muerto, el proceso mismo de la tinción la mata.

El método, por consiguiente, es bastante severo y puede producir artefactos. Los colorantes más comúnmente usados son sales. Los BASICOS consisten en un catión coloreado unido a un anión incoloro (ejemplo, clorhidrato de azul de metileno), mientras que los ACIDOS, constituyen exactamente lo contrario (ejemplo eosinato de sodio).

Las células bacterianas son ricas en ácidos nucleicos, los cuales portan cargas negativas en forma de grupos fosfato, éstos se combinan con los colorantes básicos cargados positivamente, lo cual, los hace ser de los más usados en citología bacteriana.

Los colorantes ácidos no tiñen a la célula bacteriana y por lo tanto, pueden ser usados para impartir al fondo un color de contraste (coloraciones negativas).

Los colorantes básicos tiñen las células bacterianas uniformemente, a menos que previamente sea destruido el RNA del citoplasma. Sin embargo, se pueden usar técnicas especiales para diferenciar flagelos, cápsula, paredes celulares, membranas celulares, gránulos, núcleos y esporas.

Sólo algunos de los muchos compuestos orgánicos que actúan como colorantes se usan para teñir microorganismos. Se trata de modificaciones de las primeras anilinas obtenidas de productos de alquitran, introducidas alrededor de 1880 por Koch, Weigert y Ehrlich.

La estructura química de los colorantes se encuentra dividida en dos grupos principales:

- A) Grupo cromóforo
- B) Grupo auxócromo

Grupo cromóforo: Grupo químico que confiere a la molécula la propiedad de proporcionar color.

Grupo auxócromo: Grupo químico que suministra las propiedades de formar sales y de transferir el color de un colorante a una sustancia sobre la que actúa.

Los más ampliamente usados en microbiología son los del grupo auxócromo y se divide en dos clases, colorantes básicos y colorantes ácidos, de estos los más usados son los de naturaleza básica.

## LA CURVA DE CRECIMIENTO

Dado que dos nuevas células producidas por el crecimiento y división de una sola célula son capaces de crecer a la misma velocidad que la célula progenitora, el número de células en un cultivo aumenta con el tiempo de progresión geométrica, es decir exponencialmente.

La velocidad de crecimiento de un cultivo en un momento dado es directamente proporcional al número de células presentes en ese momento.

Si se inocula un medio líquido con células microbianas tomadas de un cultivo que previamente ha crecido hasta la saturación, en el cual periódicamente se ha determinado el número de células viables por mililitro y trazado un gráfico de él, generalmente se obtiene una curva como la que se muestra en la figura número 1. Además se puede describir la curva en términos de 6 fases que se representan por las letras A a la F. Figura 2.

Figura 1.

Figura 2

Sección de la curva	Fase	Velocidad de crecimiento
A	Rezago	Cero
B	Aceleración	Creciente
C	Exponencial	Constante
D	De retardo	Decreciente
E	Estacionaria máxima	Cero
F	Declinación	Negativa (muerte)

## MORFOLOGIA COLONIAL

A demás de las diferencias estructurales de una colonia, debidas a las múltiples especies, las bacterias de una sola especie pueden formar varios tipos diferentes de colonias.

Estas diferencias en la forma de la colonia son importantes, porque son la expresión visible de diferencias morfológicas y fisiológicas importantes relacionadas con cada microorganismo en particular.

Como guía para la descripción de la morfología colonial, emplear la siguiente terminología:

### FORMA

PUNTIFORME 	IRREGULAR 
CIRCULAR 	RIZOIDE 
FILAMENTOSA 	FUSIFORME 

### ELEVACION

PLANA 	ACUMINADA 
PLANOCONVEXA 	UMBILICADA 
CONVEXA 	PAPILADA 

BORDE

REDONDEADO 	ESPICULADO 
ONDULADO 	FILAMENTOSO 
LOBULADO 	RIZOIDE 

Color: Blanca, verde, azulada, amarilla, etc.

Luz: Brillante, opaca (mate), transparente, etc.

Tamaño: Estudiar el diámetro en milímetros.

Consistencia: Dura, blanda, mucosa, hilante.

Superficie: Lisa, rugosa, radiada, serebiforme.

## MATERIAL

### ▪Colorantes:

Rojo congo

Colorante de Albert

Verde malaquita

Mordiente de Knaysi

Mordiente de cápsula

Fucsina

Lugol

Safranina

### ▪Portaobjetos

### ▪Cubreobjetos

### ▪Mechero

### ▪Microscopio

### ▪Asa y porta-asa

### ▪Aceite de inmersión

### ▪Cajas de petri con crecimiento de diferentes colonias bacterianas.

### ▪Cepas:

*Klebsiella pneumoniae*

*Bacillus megaterium*

*Corynebacterium* sp.

*Bacillus subtilis*

DESARROLLO:

DEMOSTRACION DE CAPSULA

METODO DE ROJO CONGO

- Colocar una gota de colorante rojo congo en un portaobjetos limpio.
- Hacer una suspensión con la cepa de *Klebsiella pneumoniae*.
- Dejar secar al aire y fijar al calor.
- Agregar mordiente de cápsula y dejar por 3 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Secar y observar a 10X, 40X y 100X.

RESULTADO: Las cápsulas aparecen como zonas claras; las células y el fondo de color rojo.

DEMOSTRACION DE PARED CELULAR

METODO TECNICA KNAYSI

- Emplear la cepa de *Bacillus megaterium*, preparar frotis.
- Fijar al calor.
- Colocar mordiente de Knaysi por 10 min.
- Lavar con agua corriente (sin que pegue directamente en la muestra).
- Colocar una gota de Fucsina y colocar un cubreobjetos.
- Observar al microscopio a 10X, 40X y 100X.

## DEMOSTRACION DE GRANULOS METACROMATICOS

### METODO CON TECNICA DE ALBERT

- Emplear la cepa de *Corynebacterium* sp.
- Preparar frotis.
- Fijar al calor.
- Cubrir el frotis con colorante de Albert por 5 minutos.
- Calentar un poco el portaobjetos, con pases sobre la flama del mechero, cuidar que no se seque por medio minuto.
- Lavar con agua y secar.
- Aplicar lugol durante 1 minuto.
- Lavar con agua y dejar secar.
- Observar a 10X, 40X y 100X.

RESULTADOS: Los gránulos metacromáticos aparecen de color azul oscuro y el citoplasma verde pálido.

## DEMOSTRACION DE ENDOSPORAS

### METODO TECNICA DE SHAFFER-FULTON

- Emplear la cepa de *Bacillus subtilis*.
- Preparar un frotis.
- Dejar secar y fijar al calor.
- Cubrir la preparación con verde de malaquita.
- Calentar con pases sobre la flama del mechero, hasta que se formen vapores, durante un minuto.
- Lavar con agua corriente.
- Agregar Safranina durante medio minuto.

- Lavar
- Dejar secar al aire.
- Observar a 10X,40X y 100X.

RESULTADOS: Las esporas se tiñen de color verde y el citoplasma de rojo.

En las cajas de petri con crecimiento bacteriano, efectuar todos los parámetros señalados para leer morfología colonial, efectuando su lectura y anotar el tipo de medio de cultivo de la colonia estudiada (AS, AN, S100, ACH, BHI, AST, VB, etc.)

Efectuar esquemas de cada tinción, indicando la bacteria empleada, el objetivo del microscopio que se usó para la observación, características del color, así como la técnica y estructura observada.

## CUESTIONARIO

1. Defina colonia bacteriana.
2. ¿Cómo podemos saber si dos colonias de un mismo medio pertenecen a un mismo organismo?
3. ¿Qué aspectos se toman para leer morfología colonial?
4. ¿Cómo puede ser la superficie y la elevación de una colonia?
5. ¿Por qué algunos microorganismo requieren de gelosa sangre para desarrollarse?
6. Describir el procedimiento para preparar y fijar un buen frotis.
7. ¿Qué otro nombre reciben los gránulos metacromáticos?
8. ¿Qué bacterias poseen gránulos metacromáticos en su citoplasma?
9. Mencione el nombre de 3 microorganismos capaces de formar esporas.
10. Escriba el nombre de 3 microorganismos que posean cápsula.
11. ¿Cuál es la función de la cápsula?
12. ¿Cuál es la función de la pared celular bacteriana?

## **ANALISIS BACTERIOLOGICO DE AGUAS PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES**

El agua como agua vital tiene que reunir algunas características, muy importantes para poder ser utilizada por el hombre.

Dentro de estas características se encuentran las referentes a la potabilidad, que para llevarla a cabo existen varios métodos, de los cuales algunos son muy accesibles y otros son muy complejos, pero de lo que se trata finalmente es de eliminar a cualquier tipo de microorganismo patógeno que se encuentra en el agua, para poder demostrar dichos microorganismos se emplean medios de laboratorio. Sin embargo, no hay duda que existen una flora bacteriana normal y característica de las aguas naturales.

Los tipos de bacterias que caracterizan esta población son:

1. Bacterias superiores, frecuentemente las formas encapsuladas que incluyen bacterias del azufre, del hierro y formas similares.
2. Prostecados o bacterias con apéndices que se encuentran en lagos y otras colecciones de agua, adheridas a algún objeto inanimado.
3. Las formas espirales que se encuentran en gran número en el agua, algunas pueden ser muy grandes (20 a 30 micrómetros), en comparación de los espirilos parasitarios.
4. Gran variedad de bacilos INCLUYENDO:
  - a) Formas pigmentadas como *Serratia marcescens* y *Chromobacterium violaceum*.
  - b) Diversas formas no pigmentadas como:
    - \* Las bacterias fluorescentes, *Pseudomonas fluorescens*.
    - \* Algunas de las bacterias azufrosas
    - \* Termófilas
    - \* Bacilos aerobios, formadores de esporas.
    - \* Bacilos anaerobios formadores de esporas.
5. Formas de cocos:
  - a) Pigmentadas generalmente amarillas, con gran frecuencia *Sarcina lutea*.
  - b) Cocos no pigmentados.

6. Bacterias fijadoras de nitrógeno, de la familia Azotobacteriae.

7. Bacteria nitrificante, nitrosomas y nitrobacter.

Estas bacterias del agua se encuentran en el agua dulce de pantanos, arroyos y lagos.

Algunas pero no todas, las bacterias del agua pueden cultivarse en medios de laboratorio, pero ninguno es bueno para todas.

Además los grupos naturales del agua pueden cultivarse en medio de laboratorio, pero es bueno para todas.

Además de las bacterias naturales del agua, esta puede y suele contener una diversidad de bacterias que la contaminan desde fuentes externas:

- \* Aire
- \* Suelo
- \* Excreciones

El número de bacterias en el aire está relacionado íntimamente con la cantidad de partículas grandes o "polvo" que tiene suspendidas.

Claro está que los microorganismos que se encuentran en el aire y en el suelo tienen acceso relativamente fácil a cursos y depósitos de agua, y la contaminación puede ser más o menos continua, por lo que contribuyen considerablemente a la flora bacteriana del agua.

La cantidad de bacterias que pueden encontrarse en el agua depende principalmente del tipo de agua. Diversos factores ambientales influyen en el contenido de bacterias del agua; entre los principales están la cantidad de material orgánico que contenga y la temperatura.

Puede deducirse, que en análisis bacteriológico del agua, que ciertas bacterias permiten conocer la calidad de agua. De las bacterias asociadas a las heces. Los bacilos coliformes constituyen un mayor número, por tanto, cualquiera de estos microorganismos, podrían usarse como indicador de la contaminación.

El examen bacteriológico del agua para buscar bacilos coliformes se apoya en el hecho de que estos microorganismos fermentan la lactosa.

Los medios con los cuales se juzga la calidad sanitaria del agua pueden resumirse:

1. Análisis bacteriológico, incluyendo

- Presencia o ausencia de bacterias coliformes.
- Número y tipo de bacterias existentes.
- Tipo de agua, sea superficial profunda.
- Condición local
- Análisis químico

Existen normas basadas en el recuento de coliformes, determinado por la formación de ácido y gas, por lo que las aguas lo dividen en clases según las siguientes bases:

Clase I. Altamente satisfactoria, contiene menos de un coliforme por 100 ml.

Clase II. Considerada satisfactoria, contiene de 1 a 2 coliformes por 100ml.

Clase III. Agua considerada sospechosa, contiene de 3 a 10 coliformes por 100 ml.

Clase IV. Agua no satisfactoria, contiene mas de 10 coliformes por 100ml.

Cuando por examen bacteriológico o de otra manera se sabe que un agua es peligrosa para el consumo:

1. Métodos mecánicos

- a) Almacenamiento
- b) Filtración
  - Filtración lenta por arena
  - Coagulación y filtración rápida por arena

2. Métodos químicos

- a) En gran escala
  - Hipocloritos y cloro líquido
- b) En escala menor
- c) - hipoclorito
- d) Luz ultravioleta
- e) Ozono, etc.

El método más simple y sencillo para tratar el agua familiar o individual es simplemente hervirla. La ebullición durante 5 min. Destruye a bacilos y formas similares patógenas.

#### MATERIAL

- Mechero
- Asa bacteriológica
- 3 tubos de caldo lactosado, rojo metilo con campana
- 3 placas de agar EMB
- Muestra de sangre

#### PROCEDIMIENTO:

Tomar varias muestras de agua a estudiar con el asa, previamente agitar en el agua y agitar en el tubo con caldo lactosado, emplear otras dos mutras de agua de diferente origen para los dos restantes tubos, efectuar la misma técnica.

Tomar nuevamente las asadas de las muestras y sembrar por estrías cruzada en la caja de EMB.

Es importante que cada una de las muestras se siembre en el tubo de caldo lactosado y en EMB.

Etiquetar de acuerdo al tiempo de la muestra.

Incubar a 37°C - 48 horas.

Efectuar lectura de resultados. Observar formación de acido y gas en el tubo y crecimiento de coliformes.

CUESTIONARIO:

1. Describa tres aspectos importantes del análisis del agua.
2. ¿En que consiste la técnica por filtración con Millipore y con qué fin se emplea?
3. ¿Cuál es el concepto de un coliforme? Mencione tres.
4. ¿Enumere alguna técnica para la obtención de agua con menos carga bacteriana?
5. ¿Qué es el agua potable? ¿Qué características presenta?
6. Enumere tres enfermedades transmitidas por el agua
7. Además del agua EMB ¿Qué otro medio diferencial puede usarse?
8. ¿Cuáles son los procesos utilizados en la purificación y desinfección artificiales en los suministros del agua potable?

## **MICROCULTIVO DE HONGOS**

### OBJETIVO:

- Conocimiento de la técnica para la obtención de hongos en el laboratorio (microcultivo)
- Conocimiento de las características generales de los hongos (crecimiento, estructuras, importancia, etc,)
- Observación de la morfología colonial

### INTRODUCCION:

Los hongos son la causa más frecuente de enfermedades en las plantas, pero solamente alrededor de 50 de los millares de especies conocidas de hongos, provocan procesos patológicos en el hombre.

Por lo general los hongos patógenos no producen toxina. Con pocas excepciones, la mayoría de los hongos patógenos para el hombre se clasifican como fangi imperfecti, denominados así, debido a producen solo esporas asexuales y no tienen desarrollo esporular asexuales algún conocido que da lugar a las estructuras tan especializadas que se encuentran en otras especies de hongos.

### ESTRUCTURAS D ELOS HONGOS:

Cuando crecen en medios adecuados, muchos hongos producen lagos filamentos ramificados, cada filamento es llamado HIFA. Pueden estar divididas por tabiques transversos constituyendo una cadena de células, a estas se les da el nombre de hifas reptadas o tabicadas. A medida que las hifas continúan creciendo y se ramifican se desarrolla un conjunto de filamentos que se denominan MICELIO. La parte del crecimiento que se proyecta por sobre la superficie del substrato se le llama MICELIO AEREO; en tanto que la parte que penetra en el substrato y absorbe los alimentos se le conoce como MICELIO VEGETATIVO.

Los hongos se reproducen por esporas d diversos tipos, muchas de las cuales se originan en ele micelio aéreo, entonces denominado micelio reproductivo.

Las esporas son denominadas asexuales cuando no se verifica una fusión de núcleos para su formación; cuando se lleva a

cabo tal fusión se le conoce como sexual. En la mayoría de los hongos de importancia no ha sido identificada la capacidad de formar esporas sexuales.

#### CLASES DE HONGOS:

Los hongos incluyen 4 clases, los hongos inferiores integran la clase llamada:

PHYCOMYCETES. La raíz de esta palabra, PHYCO significa alga, y los ficomicetos reciben a veces el nombre de hongos algáceos de los que unos son acuáticos y otros terrestres.

Los ficomicetos difieren de los hongos superiores en que poseen esporas asexuales endógenas que se forman en estructuras sacciformes llamados esporangios, que sus micelios no son tabicados.

Los hongos superiores se caracterizan por esporas asexuales exógenas llamadas conidios, que se forman fuera de las hifas y por la presencia de los micelios tabicados con poros que permiten los pasos de núcleos y citoplasma de una parte del micelio a otra.

ASCOMYCETES. La palabra ASCA significa bolsa o estructura en forma de saco, y los ascomicetos se denominan así por contener sus esporas asexuales en un asca.

BASIDIOMYCETES. Hongos superiores que producen esporas sexuales sobre una base o basidio. La mayor parte de los hongos de importancia médica pertenecen a la clase de los

DEUTEROMYCETES. Hongos inespecíficos, estos hongos no pueden clasificarse tomando como base su reproducción sexual, ya que sus etapas sexuales son desconocidas.

#### MATERIAL:

- Equipo para microcultivo estéril
- Glicerol al 100%
- Caja de Petri PDA
- Mango y hoja de bisturí
- Marcador y regla
- Mechero y microscopio
- Pinzas de disección sin dientes

- Cepas
  - Aspergillus sp.
  - Pencillum sp.
- Preparaciones fijas de diferentes clase de hongos

#### PROCEDIMIENTO:

- En la caja que contiene el medio de PDA, efectuar en su base una cuadrícula de 1cm. Por lado con el marcador.
- Con el bisturí previamente flameado cortar el agar siguiendo las líneas del plumón marcado en el vidrio.
  
- Con el mismo bisturí, colocar un cuadrado de agar de PDA en el centro de portaobjetos dentro de la caja, previamente colocarlo en la varilla doblada.
- Mediante el asa doblada en ángulo recto, coloca un pequeño fragmento de la colonia del hongo proporcionada e inocular a un lado del cuadro del agar.
- Efectuar el paso anterior en los tres lados restantes.
- Con las pinzas flameadas colocar el cubreobjetos sobre el agar.
- Con el mango del asa, presionar ligeramente sobre el cubre objetos, con el fin de que se adhiera el agar.
- Colocar el glicerol al 10% (5 - 10 ml) en la caja de Petri, procurando no mojar el microcultivo.
- Cultivar a temperatura ambiente, previamente bien etiquetado, por 5 días.
- Observar su crecimiento, observándolo cada 24 horas.
- Observación al microscopio de las preparaciones fijas de hongos.

### RESULTADOS:

- Efectuar dibujos de las estructuras de los hongos observados.
- Efectuar la lectura colonial de los hongos proporcionados, y el de su caja de microcultivo.
- Describa el tipo de crecimiento y sus características en la caja de microcultivo, y los cambios que presento en cada una de sus lecturas, (esquemas) macroscópicamente.

### CUESTONARIO:

1. ¿Cómo define usted a un hongo?
2. ¿Cómo se clasifican los hongos?
3. Mencione hongos clasificados como Fungi imperfecti
4. ¿Qué es un microcultivo?
5. ¿Qué importancia tienen los microcultivo?
6. Enuncie enfermedades producidas por hongos en el hombre y que tipo de hongo las produce.
7. ¿Qué diferencias terapéuticas encuentra entre una patología producida por hongos y otra por bacterias?
8. ¿Cómo es la reproducción de los hongos?, defina hifa, micelio, espora.
9. ¿Cuál es la razón para agregar glicerol al microcultivo?
10. Mencione 5 características del hongo Aspergillus.
11. Mencione 5 características del hongo Pencillium.

## **REQUERIMIENTO GASEOSO Y TEMPERATURAS PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO**

OBJETIVO: conocer las necesidades de oxígeno y efectos de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano, para poder cultivarlos en condiciones óptimas.

### INTRODUCCIÓN:

Para los microorganismos presentes en un desarrollo normal, así como su reproducción, existen factores como la temperatura, pH, presión osmótica, concentración de sustancias nutritivas, etc. que regulan esos mecanismos.

### EFFECTOS DE LA TEMPERATURA:

Temperaturas de crecimiento óptimo. Para cada especie de bacterias hay una temperatura en la que el crecimiento y la multiplicación se producen con mayor rapidez; se llama temperatura de crecimiento óptimo. Esta corresponde a la temperatura ordinaria del hábitat natural de las especies y a la temperatura en que las enzimas bacterianas esenciales funcionan mejor.

Para la gran mayoría de los organismos saprofitos que habitan en el suelo y otros lugares fuera de los cuerpos vivos, la temperatura de crecimiento óptimo es de 25° a 30° C, que es precisamente un poco más elevada que la temperatura ambiente normal.

Hay algunas especies que se encuentran en el suelo, en fuentes de aguas termales y en el contenido intestinal de animales, cuya temperatura óptima puede ser de 60 a 90° C, o más elevada. Se llaman bacterias TERMOFILAS (amantes del calor).

En el extremo opuesto encontramos unas pocas especies excepcionales que crecen mejor a temperaturas próximas al punto de congelación, (alrededor de 10°C). Son llamadas bacterias PSICROFILAS (amantes del frío).

Los organismos que crecen bien a temperaturas intermedias de 25 a 27°C se dice que son MESOFILOS (amantes de la moderación).

## CLASES DE BACTERIAS SEGÚN LAS RELACIONES DE TEMPERATURA.

CLASE		MINIMA	ÓPTIMA
Psicrófila	0°C	10°C- 15°C	30°C
Mesófila	15°- 25°C	25°- 37°C	40°- 55°C
Termófila	25°- 45°C	50°- 60°C	60°- 90°C

## TEMPERATURAS APROXIMADAS DE CRECIMIENTO

La temperatura óptima para las bacterias parásitas del hombre y otros animales de sangre caliente es de 37°C, la temperatura normal del cuerpo.

Las incubadoras de laboratorio en que se cultivan gérmenes patógenos procedentes del cuerpo humano deben regularse, para mantener constante la temperatura entre 35° y 37°C. Las bacterias parásitas en el cuerpo de las aves se desarrollan mejor a temperaturas elevadas de 41°C a 45°C, debido a que es la temperatura normal de estos animales.

## TEMPERATURAS MINIMAS Y MAXIMAS DE CRECIMIENTO

A temperatura por debajo o por encima de la óptima, los gérmenes se muestran menos activos y crecen y se multiplican más lentamente.

Para cada especie hay un límite más o menos definido en ambos sentidos, mas allá de cual no se realiza el crecimiento. Para la mayoría de los microorganismos que viven en el cuerpo humano, la temperatura mínima se encuentra alrededor de los 20°C, y la máxima es de 42° a 45°C aproximadamente.

Algunos gérmenes patógenos se adaptan tan exactamente a la temperatura del cuerpo humano (de 36° a 37°C), que apenas se multiplican fuera de estos valores; la mayoría de ellos, sin embargo, crecen a temperaturas entre los 34° y los 42°C.

## RELACION CON EL OXIGENO ATMOSFERICO.

Todos los seres vivos necesitan oxígeno en alguna forma, aunque las bacterias difieren por su capacidad para utilizar el oxígeno del aire. La mayoría utiliza directamente el oxígeno atmosférico, de la misma manera que los hacen el hombre y los animales; son las AEROBIAS que contienen enzimas citocromas.

Sin embargo, para un grupo importante de bacterias, el oxígeno libre en el aire es realmente un tóxico. Estos gérmenes extraordinarios no pueden utilizar el oxígeno atmosférico ni sobrevivir en contacto con el; son llamados ANAEROBIOS.

Deben obtener el oxígeno a partir de la descomposición y reordenación de compuestos que contienen oxígeno en el medio.

Los anaerobios estrictos solo crecerán donde no hay aire en lo absoluto, a no ser que se hallen presentes sustancias fuertemente reductoras, como el tioglucolato, o bien, que se encuentren conjuntamente con organismos aerobios que absorban el oxígeno.

Intermedias entre aerobios estrictos y anaerobios estrictos se encuentran muchas especies (facultativas) que pueden utilizar el oxígeno libre o el combinado. Cada especie de este gran grupo muestra sin embargo, una especial preferencia para crecer, ya sea en presencia o en ausencia del aire.

La relación del microorganismo con el oxígeno es sutil, ya que los procesos de la respiración bacteriana son complicados.

Solo se necesita comprender que las diferentes variedades de las bacterias están delicadamente adaptadas a una forma determinada de provisión de oxígeno y se desarrollan mejor bajo presión particular del mismo oxígeno.

Es conveniente hacer notar que muchas bacterias patógenas, aunque crecen bien en condiciones aerobias ordinaria, se desarrollan mucho mejor, en su primera o segunda generación, en medios anaerobios de cultivos artificiales o al menos parcialmente anaerobios. En otras palabras los gérmenes (la mayoría), patógenos son claramente MICROAROFILOS, prefieren muy poco aire.

El crecimiento de muchos agentes patógenos, se facilita suministrándoles una atmosfera de contenido de dióxido de carbono aumentada en un 10% aproximadamente.

#### MATERIAL:

Mechero

Asa bacteriológica

2 pipetas de 1 mL. estériles

8 tubos con caldo nutritivo.

Un tubo con agar tioglicolato

Un tubo con gelatina nutritiva

Gradilla

#### CEPAS:

E. coli

B. subtilis.

Pseudomonas spp.

#### DESARROLLO:

- Con una pipeta estéril y en condiciones asépticas inocular 4 tubos de caldo nutritivo con 1 mL. de suspensión de E. coli.
- Con una segunda pipeta estéril inocular los otros 4 tubos de caldo nutritivo con 1 mL. del cultivo de B. subtilis.
- Etiquetar cada uno de los tubos

- Incubar un tubo de caldo nutritivo con *B subtilis* y otro tubo con *E. Coli* a las siguientes temperaturas:
  - 4°C
  - 37°C
  - 55°C
  - Temperatura ambiente.
- Después de 24-48 horas, efectuar lectura de los resultados. Observar turbidez e indicar a que temperatura se produjo el máximo desarrollo, así como lo que sucedió con los demás tubos.
- En los tubos con tioglicolato y gelatina nutritiva, sembrar por picadura con las sepas de *E. coli* y *Pseudomonas* respectivamente.
  - Flamear el asa antes y después de cada inoculación.
  - Incubar a 37°C por 24- 48 horas.
  - Lecturas de resultados.

Observación con respecto a la localización de crecimiento en los tubos de tioglicolato y gelatina nutritiva.

#### CUESTIONARIO:

1. Mencione dos ejemplos de microorganismos patógenos que sean aerobios, dos anaerobios y dos facultativos.
2. Esquematice en forma de tabla los rangos de temperatura para las bacterias, mesòfilas, termófilas y psicròfilas.
3. Enuncie cuando menos 2 bacterias que puedan crecer a temperaturas mayores de los de los 7°C.
4. Enumere algunos microorganismos psicròfilos causantes de descomposición de alimentos en refrigeración.
5. ¿Qué importancia medica tiene conocer los rangos de temperatura de las bacterias?
6. ¿A qué temperatura hubo mejor desarrollo y porqué?

## **OBTENCION Y AISLAMIENTO DE CULTIVOS PUROS**

### OBJETIVO:

Reafirmar los procedimientos y precauciones que deben sugerirse para efectuar las técnicas de cultivo, (técnica aséptica).

Importancia de la obtención de cultivos puros.

### INTRODUCCIÓN.

Una técnica especial, que requiere gran cuidado y atención a numerosos e importantes detalles, se utiliza en cada paso de la preparación y examen de cultivos y en todo lo referente al manejo de microorganismos. Esta técnica es indispensable para estudiar, en condiciones de seguridad, microorganismos peligrosos y para evitar contaminaciones de los cultivos y otros materiales utilizados con los microbios que se encuentran en el polvo, en los dedos, y en otras muchas partes.

La técnica microbiológica es esencialmente una técnica aséptica, es decir un procedimiento por el cual el investigador excluye de su cultivo todos los microorganismos que no desea estudiar, previene la infección de su propio organismo y evita la contaminación de lo que le rodea. Crea para si mismo, en su lugar de trabajo un medio aséptico.

Al iniciar sus actividades debe esterilizarlo todo: objetos de cristal, medios de cultivo, y cuanto se vaya a utilizar en el laboratorio.

Una vez preparado un cultivo, debe manejarse siempre de manera que ningún microbio pueda entrar o salir del cultivo.

En la naturaleza casi todos los tipos de bacterias u hongos, incluyendo las especies patógenas, conviven en relación más o menos estrecha con otro tipo de bacterias u hongos. Por esta razón casi siempre el cultivo primario de cualquier procedencia será un cultivo de tipo mixto, de organismos de tipos diferentes.

Pero en el laboratorio las diversas especies se pueden separar unas de otras y cultivar aisladamente.

Un cultivo de una sola especie se llama CULTIVO PURO, para conocer las propiedades particulares de un organismo se debe estudiar este en un cultivo puro.

Se llama aislamiento del organismo al proceso seguido para obtener un cultivo puro, separando un tipo de bacterias u hongos de una mezcla en que hay otros tipos.

#### MATERIAL:

3 tubos con solución salina (9.9 mL.)

2 placas de Petri estériles

Matraz con agar nutritivo

2 pipetas estériles

1 placa de Petri con agar S-110

1 placa de Petri con agar nutritivo

Tubos con cultivo mixto -Staphylococcus aureus

Pseudomonas sp.

Mechero

Asa bacteriológica

#### PROCEDIMIENTO

##### AISLAMIENTO POR DILUCION O VACIADO EN PLACA

Se fundirá el agar nutritivo a baño maría.

En condiciones estériles o asépticas se toma una asada del cultivo mixto y se suspende en un tubo con solución salina.

Se realizaran a partir de este tubo diluciones en serie.

Se verterá el agar fundido sobre las dos placas estériles.

También cerca del mechero, tomar un mililitro de las 2 últimas diluciones con las pipetas utilizadas anteriormente cuidando de flamearlas previamente y se vaciara en las placas de agar una vez.

Agitar suavemente, con movimientos circulares.

Dejar solidificar.

Incubar a 37°C por 24-48 horas.

#### AISLAMIENTO EN CAJAS DE PETRI POR ESTRIAS.

Esterilizar el asa y dejarla enfriar.

Tomar una asada del cultivo mixto y sembrar en la placa de A. N. por estría cruzada. Seguir la técnica señalada en prácticas anteriores.

Incubar a 37°C por 24- 48 horas.

Comparar los resultados obtenidos con las placas del método por dilución.

#### AISLAMIENTO CON MEDIO SELECTIVO.

Flamear el asa y enfriar.

Tomar una asada del cultivo mixto.

Sembrar por estría cruzada sobre la placa de agar S-110.

Incubar a 37°C por 24- 48 horas.

Identifique por morfología colonial la bacteria de que se trata.

#### CUESTIONARIO.

1. ¿Qué factores deben cuidarse en el cultivo de un microorganismo?
2. ¿Qué es un cultivo puro?
3. ¿Qué tipos de nutrientes debe tener un medio de cultivo?
4. ¿Cuál sería la importancia de obtener cultivos puros?
5. ¿Cómo podemos lograr cultivos puros?

## **MECANISMO DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA.**

Objetivo: son muchos los factores que determinan en cada caso si un microorganismo puede o no provocar infección, estudiaremos en esta práctica algunos de los factores que controlan la infección.

Introducción.

Virulencia de los organismos:

Se debe pensar siempre que el poder patógeno de un microorganismo esta en relación con un determinado huésped (hombre, animal o planta). Para expresar estos diferentes grados de poder patógeno se usa el término de virulencia.

Número (o dosis) de organismos y vía de entrada.

Evidentemente cuando mayor sea el número de microorganismos patógenos que penetran a los tejidos, mayor será la probabilidad de que acontezca la infección. La vía de entrada puede determinar si se producirá o no la infección.

Resistencia individual del huésped.

Determina si la infección se producirá o no, así como la gravedad de la enfermedad. Un organismo virulento para algunos seres humano, no necesariamente producirá enfermedad en otras personas.

La relación entre los factores que acabamos de exponer se puede expresar como sigue:

$E$  es una función de  $NV/R$ .

Donde "  $E$  "significa enfermedad "  $N$  " número de microbios patógenos "  $V$  " virulencia y "  $R$  " resistencia del huésped.

Indica que en cualquier caso de infección el poder total patógeno de los organismos (que depende de su número y virulencia) equilibrado con la resistencia del individuo es lo que determina la naturaleza y gravedad de la enfermedad.

En términos más simples, la patogenicidad y virulencia de los microbios está relacionada con su capacidad para:

1. Invadir y multiplicarse en los tejidos del cuerpo.
2. Intoxicar los tejidos.

Cada variedad de microbios patógenos tienen su propio conjunto de estructuras superficiales, hábitos metabólicos y actividades enzimáticas que se combinan para darle un determinado poder patógeno. Como la producción de toxinas, que se puede clasificar en dos categorías, las exotoxinas, y las endotoxinas, con características particulares en cada grupo.

Asociado a la propiedad invasora se encuentra el poder para formar varios productos dentro de los cuales tenemos:

- ❖ Hemolisinas
- ❖ Leucocidinas
- ❖ Factores coagulasa
- ❖ Estreptoquinasa
- ❖ Hialuronidasas

Material:

- ✓ 3 cajas de agar sangre
- ✓ Hisopo estéril.
- ✓ Solución salina
- ✓ Jeringa estéril
- ✓ Ligadura
- ✓ Torundas
- ✓ Asa bacteriológica.
- ✓ Mechero

Cepas

1. S. aureus
2. S. pyogenes

Desarrollo.

En dos cajas de agar sangre, sembrar por estría cruzada S. aureus y S. pyogenes, respectivamente.

Etiquetar e incubar a 37°C por 24 horas.

Observar el tipo de hemólisis y morfología colonial.

En la tercer caja de agar sangre efectuar un exudado faríngeo (emplear el hisopo) seguir indicaciones del profesor para esta técnica.

Etiquetar e incubar 2 hrs. a 37°C

Observar tipo de hemolisis y comparar resultados.

Sangrar a un compañero (5 ml aprox)

Centrifugar (2500-3000 R.P.M. 3 minutos.

Separar el plasma en un tubo

Diluir 1:5 en solución salina tomar muestra de S. aureus y suspenderla en el tubo que contiene plasma, incubar a 37°C durante 90 minutos.

Observar resultados.

Cuestionario.

Defina patogenicidad y virulencia.

Cuantos tipos de hemolisis existen, y porque se caracteriza cada tipo.

Enuncie 4 características de las endotoxinas

Enuncie 4 características de las exotoxinas

Numerar y describir brevemente 3 productos agresivos que pueden coadyuvar a la propiedad invasora de las bacterias.

En qué circunstancias se pueden aumentar o disminuir la virulencia de un microorganismo.

Explicar la importancia de la virulencia de los microorganismos, la vía de entrada y el número de gérmenes que penetran a los tejidos, así como la resistencia del huésped.

## ***FISIOLOGÍA O METABOLISMO BACTERIANO.***

Objetivo.

Definir metabolismo y su importancia.

Composición química de las células bacterianas (proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y enzimas).

Nutrición bacteriana (autótrofa, heterótrofa, saprófita y parásita).

Metabolismo energético.

Conocer algunas de las reacciones fisiológicas de los microorganismos mediante el sembrado en diferentes medios de cultivo.

Introducción

El metabolismo es el conjunto de transformaciones químicas que los organismos vivos deben realizar para mantenerse y reproducirse.

Los procesos metabólicos se dividen en: anabolismo y catabolismo

Anabolismo, proceso mediante el cual los organismos sintetizan material celular, y catabolismo, a través del cual las células descomponen los materiales nutritivos.

Composición química de las células bacterianas.

La materia viva de las bacterias es esencialmente la misma que el protoplasma de otros organismos vivos. Esta formado por compuestos de carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre y fósforo, junto con pequeñas cantidades de otros elementos.

Un promedio elevado como del 80 al 90% pueden ser de agua, se encuentran proteínas, carbohidratos, lípidos, y ácidos nucleicos, así como también aquellas sustancias de máxima importancia llamadas enzimas.

Proteínas

Estos compuestos orgánicos complejos que contienen nitrógeno están en las bacterias como simples proteínas

(albumina, o globulina) como proteínas parcialmente degradadas (polipéptidos, peptonas) como nucleoproteínas y transproteínas conjugadas en combinaciones con lípidos o carbohidratos. Además todas las enzimas son proteínas.

Las proteínas se componen de aminoácidos, se han aislado 21 aminoácidos distintos. Tienen una estructura similar que contiene una parte acida, conocida como grupo carboxilo, una parte básica que se conoce como grupo amino y una parte orgánica llamada grupo radical.

Carbohidratos.

En las bacterias encontramos almidon y glucógeno así como azúcares más simples. Los polisacáridos y los compuestos formados por combinación de carbohidratos y aminoácidos, forman parte de la estructura básica de las paredes celulares bacterianas.

Para la diferenciación bacteriana son importantes los polisacáridos que se encuentran en las paredes celulares de algunos bacilos gram negativos y en las capsulas de gérmenes como los neumococos.

Los carbohidratos más simples, como la glucosa y la fructosa, son las fuentes principales de energía para el metabolismo bacteriano.

Lípidos

Los materiales grasos se encuentran principalmente en forma de grasa, ceras y fosfolípidos. En muchos microorganismos, especialmente en bacterias gram positivas, se encuentran gotitas de sustancia lípida teñible como inclusiones celulares visibles, parece que se forman principalmente de poli-β-hidroxibutiratos. La proporción total de lípidos en los microorganismos es muy diferente según tipo de bacterias que se trate, algunos llegan a tener hasta un 42 % de su peso.

Ácidos nucleicos

Estos compuestos complejos se presentan en las bacterias como dos tipos. Son componentes esenciales de las células vivas. Un tipo el ácido desoxirribonucleico DNA transporta la información genética o hereditaria que se halla en el núcleo.

El otro, el ácido ribonucleico RNA, se encuentra muy concentrado en el citoplasma. El RNA interviene íntimamente en la síntesis de las proteínas.

Los dos tipos de ácidos nucleicos contienen tres componentes iguales; un compuesto nitrogenado cíclico, llamado base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato.

#### Enzimas

El metabolismo implica muchas reacciones integradas que no pueden realizarse sin enzimas. Se puede decir en realidad que sin enzimas no hay vida.

Actúan como agentes catalíticos que permiten que las reacciones catalíticas bioquímicas complejas se realicen rápidamente con su presencia, puesto que de otra manera se realizaría con extremada lentitud o no se realizaría. Un catalizador es una sustancia que acelera la rapidez de una reacción química. Las reacciones enzimáticas de las bacterias son necesarias para que el organismo pueda:

1. Disponer de alimentos en forma soluble para que pueda penetrar en las células
2. Tener un suministro de energía necesaria para la biosíntesis del protoplasma, y para la respiración, reproducción, motilidad y otros procesos vitales.
3. Utilizar estos elementos nutritivos para la síntesis del protoplasma del cuerpo.

#### Material.

Por equipo:

- o Dos tubos caldos urea
- o Dos tubos citrato de Simmons
- o Dos tubos manitol rojo de metilo
- o Dos tubos glucosa rojo de metilo
- o Dos tubos SIM
- o Gradilla
- o Asa bacteriológica
- o Mechero
- o Sepas
  - E. coli
  - Proteus vulgaris.

## Procedimiento

- Se sembraran los tubos con los diferentes medios de cultivo con cada una de las cepas facilitadas
- Ejemplo, de los dos tubos del medio de SIM, uno se sembrara con E. coli y el segundo tubo con P. vulgaris.
- Inocular de dos en dos, en igual forma los demás tubos.
- Emplear la técnica de sembrado correspondiente para cada uno de los tipo de medio de cultivo, seguir indicaciones del profesor en caso de duda.
- Tener cuidado de flamear el asa antes y después de cada procedimiento.
- Se incubaran los tubos previamente etiquetados a 37°C de 24-48 horas.
- Observar los cambios de cada uno de los tubos.
- Interpretar los resultados, y anotar los resultados en un cuadro, con las características de cada una de las bacterias que se emplearon en la practica.

Cuestionario.

-¿Qué se entiende por metabolismo bacteriano?

-En la prueba de fermentación de azúcares indique:

-¿Que indicador utilizo?.

-¿Que azúcar utilizo?.

-¿Como efectuó su lectura?.

-Defina metabolismo energético y cuál es su función.

-¿Conque fin se empleo el medio de SIM?.

-¿En qué consiste el reactivo de Ehrlich y el de Kovacs?.

-Defina a las bacterias:

Autótrofas.

Heterótrofas.

Saprófitas.

Parásitas.

# ACCIÓN DE AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

## OBJETIVOS

- Enumerar los factores relacionados con desinfección eficaz
- Explicar la forma y eficacia de los métodos físicos para el control microbiano
- Identificar los métodos de acción y los usos preferidos de desinfectantes químicos
- Interpretar los resultados del método de difusión en disco

## INTRODUCCIÓN

Es probable que en la Edad de Piedra, los seres humanos hayan utilizado métodos físicos para el control microbiano con el objeto de conservar los alimentos. La desecación y el salado (presión osmótica), fueron algunos de los métodos físicos practicados.

A mediados de la década de 1800 Ignaz Semmeweis y Joseph Lister desarrollaron algunas de las primeras prácticas de control microbiano en los procedimientos médicos. Incluían el lavado de manos con cloruro de calcio para destruir microbios y el empleo de asepsia quirúrgica. En los hospitales, las infecciones causaban el 10% de muertes en los procedimientos quirúrgicos y fallecimiento de mujeres durante el parto. Está claro que la prevención de la infección hospitalaria depende en parte de la disponibilidad de equipo, instrumental, apósitos, dispositivos de aislamiento, limpios y cuando sea necesario estériles, y en la eliminación sin riesgos del material infectado. Durante el siglo pasado se desarrollaron métodos físicos y agentes químicos que controlan el crecimiento microbiano.

Existen muchos factores en el medio ambiente de los microorganismos que son letales o potencialmente letales para ellos; uno de los propósitos de ésta práctica es estudiar algunos de los factores que afectan la viabilidad de los microorganismos.

Los nombres de los tratamientos que producen la muerte directa de los microbios llevan el sufijo **-cida**, que significa muerte. Así puede hablarse de bactericida o germicida, fungicida o micocida, viricida. Otros tratamientos inhiben el crecimiento y la multiplicación de las bacterias; llevan el sufijo **-stático** que significa detener o estabilizar, como un bacteriostático.

### **Esterilización**

Ahora es importante definir algunos conceptos que se manejan en el control microbiano. La esterilización es el proceso mediante el cual se eliminan o destruyen todas las formas de vida microbiana. Un agente que produce esterilización se denomina esterilizante. Se dice que algo está estéril cuando carece de todo germen viable (capaz de reproducirse). Se utilizan métodos físicos o químicos para eliminar microorganismos de un objeto o matarlos *in situ*.

### **Métodos Físicos**

Las técnicas de esterilización pueden ser:

Calor: alimentos en conserva, material de vidrio e instrumentos quirúrgicos.

Calor húmedo: ebullición o calor fluyente, autoclave.

Pasteurización: leche, helado, yogurt y la cerveza.

Calor seco: flameado directo, incineración, esterilización por aire caliente (estufa).

El calor es el método más común para eliminar a los microbios, inclusive endosporas.

Filtración: en quirófanos y salas para pacientes existe aire filtrado. La filtración se utiliza para eliminar microbios de los líquidos o los gases.

Bajas temperaturas. Frío: refrigeración, congelación intensa, liofilización.

Alta presión.

Desecación.

Presión osmótica.

Radiación (ionizante y no ionizante), microondas.

Sustancias químicas: líquida o gaseosa.

Cuando ingresan los microorganismos en una herida quirúrgica, no se requiere esterilización, las defensas del organismo actúan en ese momento.

### **Métodos Químicos**

Los agentes químicos se utilizan para el control del crecimiento microbiano, tanto en tejidos vivos (antisépticos) y sobre objetos inanimados (desinfectante). Pocos logran la esterilidad, la mayoría reducen las poblaciones microbianas.

### **Desinfección**

Son los procedimientos que eliminan o matan la mayoría de los microorganismos viables, pero no a todos. Se puede utilizar un desinfectante químico que mata a las bacterias, pero que quizá no a los virus o a las esporas. Se puede efectuar con sustancias químicas, luz ultravioleta, agua en ebullición o vapor. El término se aplica al uso de una sustancia química (desinfectante) para tratar una superficie inerte o un sistema.

Lister fue el primero en utilizar el fenol (ácido carbólico) para controlar las infecciones quirúrgicas en el quirófano. Se utilizaba para controlar el olor de las aguas residuales. Ahora rara vez se utiliza como antiséptico o desinfectante debido a sus efectos irritantes sobre la piel y a su olor desagradable.

Los derivados del fenol (fenólicos) tienen menos efectos irritantes. Una propiedad útil de los fenólicos como desinfectante es que permanecen activos en presencia de compuestos orgánicos, son estables y persistentes durante

periodos prolongados después de su aplicación. Por ello son agentes adecuados para desinfectar pus, saliva y heces.

Un compuesto fenólico utilizado actualmente es un cresol llamado O-fenilfenol componente principal de Lysol, buen desinfectante de superficie.

Fenol y derivados fenólicos: fenol, fenólicos, bisfenoles, biguanidas (clorhexidina), halógenos, alcoholes, metales pesados y sus compuestos, agentes tensoactivos, jabones y detergentes, higienizantes, ácidos aniónicos. Conservadores químicos de alimentos: ácidos orgánicos, nitratos y nitritos. Aldehídos. Esterilizantes químicos gaseosos. Peroxígenos (agentes oxidantes). Iodo, benzal, lugol, isodine, agua oxigenada.

### **Antisepsia**

Consiste en el uso de antisépticos para reducir el número de gérmenes viables en la piel. Los antisépticos son un grupo de desinfectantes. Hay modificación de la desinfección y de la antisepsia y el proceso de desgerminación, que produce la eliminación mecánica de los microbios en un área limitada.

La eficacia de los desinfectantes se pueden monitorizar mediante pruebas microbiológicas de uso práctico. Sin embargo, éstas pruebas rara vez se realizan en un hospital, el uso de desinfectantes está guiado por las recomendaciones de los fabricantes.

### **Evaluación de la potencia desinfectante**

Durante muchos años la prueba de referencia fue la prueba del coeficiente fenólico, que comparaba la actividad de un desinfectante dado con el fenol. El estándar actual es la prueba de utilidad de la dilución de la American Official Analytical Chemist. Las tres bacterias utilizadas son la *Salmonella Choleraesius*, *Staphylococcus Aureus* y *Pseudomona Aeruginosa*. Los cultivos se colocan en una solución del desinfectante a la concentración recomendada por el fabricante y se deja allí por 10 minutos a 20°C. Luego se transfieren a un medio que permitirá el desarrollo de las bacterias sobrevivientes. La eficacia del desinfectante

puede determinarse mediante la cantidad de cultivos que crecen.

### **Método de Difusión en Disco**

El MDD se utiliza en laboratorios de práctica para evaluar la eficacia de un agente químico. Un disco de papel filtro se impregna con una sustancia química y se coloca sobre una placa de agar previamente inoculado con el microorganismo de prueba. Si la sustancia química es eficaz después de la incubación se puede observar un halo que representa la inhibición del crecimiento alrededor del disco, como una zona clara.

### **MATERIAL**

- 4 cajas de Petri estériles
- Tubos de ensaye con discos de papel filtro
- 2 cajas de Petri con Agar Nutritivo (AN)
- Mechero
- Asa y porta asa
- Maskin tape
- Fenol al 5%
- Alcohol al 70%
- Lugol al 5%
- Detergente
- Pinzas sin dientes

### Cepas

- *Bacillus Subtilis*
- *Staphylococcus Aureus*

## **MÉTODO**

- En cada una de las cajas de Petri estériles, se pondrá suficiente cantidad de las soluciones.
- Se tomará una asada de una cepa y se inoculará por la técnica de barrido en el agar nutritivo. Repetir los mismos pasos para la otra cepa.
- Los discos de papel filtro se sumergen en las soluciones, con ayuda de las pinzas, previamente flameadas
- Los discos con cada uno de los desinfectantes, son colocados en los medios de cultivo, de manera separada y presionando para que queden bien fijos a la superficie del medio.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- Leer (en milímetros) el grado de inhibición y hacer conclusiones.

## CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la acción de la luz ultravioleta sobre el material genético de las bacterias?
2. ¿Cuáles son los riesgos del uso de la luz ultravioleta?
3. ¿Cuáles son los principales agentes químicos utilizados en los hospitales?
4. Si la pasteurización no logra la esterilización, ¿Por qué los alimentos se tratan por pasteurización?
5. Mencione cinco factores que deban considerarse antes de seleccionar un desinfectante.
6. Indique el mecanismo de acción y al menos un uso habitual de cada uno de los siguientes tipos de desinfectantes:
  - a) Yodo
  - b) Cloro
  - c) Alcohol
  - d) Derivados fenólicos
7. ¿Cómo es el mecanismo de acción de los detergentes?

## **ANTIBIOGRAMA**

### **Objetivo:**

Estudiar la acción de los antibióticos in vitro para conocer la sensibilidad bacteriana.

Conocer pruebas para una mejor selección de antibióticos.

Técnica e interpretación de un antibiograma.

### **Introducción:**

Los antibióticos difieren de los desinfectantes corrientes, porque muestran una toxicidad selectiva para los microorganismos patógenos, sin causar graves daños a la mayoría de las células de los tejidos. Algunos antibióticos son efectivos contra un número mas o menos importante de organismos patógenos; mientras que otros conocidos como antibióticos de amplio espectro, actúan sobre una gama extensa de diferentes microorganismos patógenos. Cuando el médico reconoce por primera vez a un paciente con enfermedad infecciosa, puede prescribir de momento un antibiótico, escogiendo el que parece más indicado para el cuadro clínico. Es de desear, por lo tanto, que se obtengan muestras adecuadas del paciente antes de administrar el medicamento y enviar a l laboratorio de bacteriología para identificar el microorganismo responsable.

Una vez aislado éste, debe comprobarse la sensibilidad a todos los antibióticos comunes y otros agentes antimicrobianos. El resultado final orienta al médico respecto al tratamiento adecuado.

En pacientes con infecciones subagudas o crónicas que requieren una terapia antimicrobiana continuada, es importante que las pruebas de sensibilidad se realicen sobre las bacterias del paciente, aisladas a intervalos frecuentes durante el curso de la enfermedad, para poder descubrir la aparición de cepas que se hubieran vuelto resistentes a los antibióticos utilizados, en cuyo caso se deberán sustituir por un antibiótico diferente o una combinación de antibióticos. En base a lo señalado anteriormente podemos decir que un antibiótico es una

sustancia química derivada de un origen vivo, que es capaz de inhibir, o incluso destruir el crecimiento de microorganismos.

La selección racional de las drogas antimicrobianas depende de;

- a) Diagnóstico
- b) Pruebas de sensibilidad
- c) Titulación de la actividad bactericida en suero

Las pruebas de laboratorio para determinar la sensibilidad a los antibióticos se encuentran indicadas en las siguientes circunstancias;

- 1) Cuando el microorganismo aislado es frecuentemente resistente a las drogas antimicrobianas (por ejemplo bacterias entéricas gram negativas)
- 2) Cuando un proceso infeccioso es grave y parece ser mortal a menos que sea tratado específicamente (por ejemplo, meningitis, septicemia)
- 3) En ciertas infecciones en que la erradicación de los organismos infecciosos requiere de drogas que sean rápidamente bactericidas y no solamente bacteriostáticas (por ejemplo endocarditis bacteriana, osteomielitis aguda)

Existen dos métodos más empleados para efectuar esta prueba y son:

- I) De dilución en tubo
- II) De los discos de papel filtro

En esta práctica emplearemos el segundo. Hoy en día el antibiograma es una prueba que podemos decir de "rutina", en los lugares de atención médica, por lo que es importante enfatizar que las condiciones bajo las cuales los gérmenes se enfrentan a los antibióticos in vitro, son muy diferentes a las que existen en el paciente.

**Material:**

CEPAS. E. coli

Staphylococcus aureus

2 cajas de agar nutritivo

Equipos de unidiscos (para gram + y gram -)

6 discos de papel filtro conteniendo diferentes tipos de antibióticos

Pinzas de disección

Mechero

Asa bacteriológica

### **Desarrollo:**

- En cada una de las cajas de agar nutritivo sembrar una con E. coli y la otra con S. aureus, abundantemente, por la técnica de estría cerrada (barrido). Próxima a la flama del mechero.
- Colocar con las pinzas los discos conteniendo los diferentes tipos de antibióticos, previamente flameadas, sobre las cajas sembradas.
- Procurar que los discos queden bien separados unos de otros y de las paredes de las cajas de cultivo. Cualquier duda consultar con su profesor de mesa.
- Hacer lo mismo en la otra caja
- Incubar 24 horas a 37°C

### **Resultados:**

Con una regla graduada en milímetros, medir el diámetro de las zonas claras que rodean a los discos, en la ase de cada caja anotar con el marcador que tipo de antibiótico tiene cada uno de los discos, para obtener una buena lectura. Y por lo tanto saber a que es más sensible la bacteria empleada en la práctica, así como los antibióticos de segunda elección.

**Cuestionario:**

- Defina antibiótico
- Defina antibiograma
- Enuncie 5 antibióticos para gérmenes gram positivos
- Enuncie 5 antibióticos para gérmenes gram negativos
- Enuncie cuales son las indicaciones para efectuar un antibiograma
- En cada una de sus cajas que antibiótico es el de primera elección, para E. coli y S. aureus
- Cuales son los peligros de uso indiscriminado de antibióticos
- Esta indicado el uso de combinaciones de antibióticos, fundamente su respuesta
- Explicar las limitaciones actuales de la terapia antibiótica

## **MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y ENFERMEDAD**

La relación etiológica entre microorganismos y enfermedad infecciosa fue sospechada antes de su descubrimiento por Leeuwenhoek, y por otros autores se confirmó por ejemplo por Jenner por medio de la vacunación.

Fue solo a mediados del siglo XIX cuando esta idea empezó a cristalizar en conocimientos gracias al desarrollo paralelo de los estudios como la transmisión del carbunco por sangre infectada, lograda por Brauell, y el reconocimiento de la similitud entre el proceso fermentativo y la sepsis, que brindo la base de la cirugía antiséptica de Lister culminando en la demostración por **Koch de etiología microbiana** del carbunco. Explotando sus técnicas de cultivos puros y aplicándola a diversas enfermedades, la etiología de muchas de ellas vino a aclararse desplazando la **doctrina hipocrática** del desequilibrio de los cuatro humores orgánicos, descritos así; SANGRE, FLEMAS, BILIS AMARILLA Y BILIS NEGRA, como la base de las enfermedades.

Una cosa es sospechar, o incluso comprobar la capacidad de los microorganismos para producir enfermedad, y otra es obtener la prueba segura de una relación etiológica específica entre microorganismo y una enfermedad determinada.

### POSTULADO DE KOCH

La prueba a lo que se señaló anteriormente fue brindada experimentalmente por Koch, en forma de una cadena de datos experimentales generalmente conocidos como postulados de Koch (aunque no se ha comprobado que así los formulara el propio Koch).

Cuatro de tales postulados fueron antes que el quinto que fue sugerido un tiempo después, aunque no todo resulte aplicable.

Los investigadores que encontraron nuevos microorganismos en casos de infección humana no siempre pudieron seguir con rigor los postulados enunciados por Koch para demostrar la relación de los microbios que estudiaban con la causa de la enfermedad.

**Primer postulado:** El germen que produce la enfermedad debe descubrirse en todos los casos observados de una enfermedad determinada, en relación patológica con sus síntomas y lesiones.

**Segundo postulado:** El germen debe aislarse de las víctimas de la enfermedad en cultivo puro para el estudio de laboratorio.

**Tercer postulado:** Cuando el cultivo puro se inocula a un animal susceptible posiblemente el hombre debe reproducir la enfermedad o como modificación posterior, originar anticuerpos específicos en el nuevo huésped.

**Cuarto postulado:** El organismo debe poderse aislar en cultivo puro de tales infecciones causadas experimentalmente.

**Quinto postulado:** Obtener exotoxinas bacterianas inoculadas en animales en experimentación y estudio del cuadro clínico.

**La aparición de enfermedades infecciosas es un fenómeno muy complejo que involucra algo más que la naturaleza y las propiedades de los microbios,** pero es muy posible que las discrepancias observadas hasta ahora sean en parte debidas a una simplificación exagerada de su etiología microbiana.

#### MATERIAL

- ✓ Ratones
- ✓ Jeringas estériles
- ✓ Mechero
- ✓ Colorantes de Gram
- ✓ Asa y porta-asa bacteriológica
- ✓ Solución salina estéril

#### CEPAS

- ✓ E. Coli enteropatógena o
- ✓ Salmonella typhi

#### MEDIOS DE CULTIVO

- ✓ Citrato de Simons
- ✓ Caldo de urea
- ✓ Manitol rojo de fenol
- ✓ EMB

- ✓ Gelosa simple
- ✓ Verde Brillante
- ✓ TSI o Kligler
- ✓ LIA
- ✓ SIM

#### DESARROLLO:

Limpiar el área abdominal de un ratón, e inocular por vía intraperitoneal 1mL de una suspensión del microorganismo proporcionado.

Se puede tener un ratón de control, inoculando por vía intraperitoneal 1mL de agua destilada estéril.

Realizar la observación microscópica de la cepa proporcionada teñida por la técnica de Gram.

Si se efectúa el de control, marcarlos y guardarlos en las cajas correspondientes.

Se deben realizar diariamente observaciones anotando las anomalías que se presentan en el transcurso de la semana, posterior a la inoculación.

Aislar la cepa de los medios EMB, Gelosa simple y VB, además sembrar en las pruebas bioquímicas proporcionadas. Incubar e interpretar los resultados (24-48 h/37°C).

#### PARTE 2: AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO INOCULADO A LOS RATONES

Anestesiarse al animal, limpiar bien el área abdominal, y por punción aspirar 2 mL de líquido peritoneal, y colocarlos en un tubo conteniendo solución salina estéril, homogenizar y hacer un frotis, teñirlo por la técnica de Gram (se puede inocular al ratón primeramente la solución salina y posteriormente aspirar, para después efectuar el frotis).

Hacer un aislamiento en los medios de cultivo e inocular a 37°C por 24-48 horas.

Observación de las características coloniales y microscópicas de los microorganismos recuperados de los animales inoculados.

Anotar la morfología colonial obtenida en los diferentes medios de cultivo y los resultados de las pruebas bioquímicas, compara los resultados de las dos sesiones.

Realizar la observación de la morfología microscópica por medio de la tinción de Gram.

Anote sus resultados.

#### CUESTIONARIO

1. ¿Qué importancia tienen los postulados de Koch?
2. ¿Cuáles son las características bioquímicas más importantes del germen empleado en la práctica?
3. ¿Qué otros factores determinan las características de las enfermedades infecciosas?
4. Defina etiología microbiana.

## **REACCIONES DE PRECIPITACION EN GEL (OUCHTERLONY)**

### Objetivo

Efectuar una reacción de precipitación por medio de pruebas inmunológicas de laboratorio.

### Introducción

Uno de los principales retos de la ciencia médica moderna es la traducción de los adelantos básicos de la inmunquímica y la inmunobiología en procedimiento de diagnóstico y terapéutica que serán de utilidad en la práctica de la medicina clínica.

Las pruebas inmunológicas de laboratorio (de las que efectuaremos en algunas prácticas posteriores) son de gran utilidad para el diagnóstico y el tratamiento de los trastorno clínicos, así como del mejor entendimiento de la patogenia de las enfermedades como la investigación científica básica en inmunología.

La interacciones antígeno-anticuerpo pueden dividirse en 3 categorías:

- Primaria
- Secundaria
- Terciaria

La interacción primaria o inicial de antígeno con anticuerpo es el acontecimiento fundamental; consiste en la unión de antígeno con una molécula de anticuerpo.

La medición de las interacciones primarias de antígeno-anticuerpo puede lograrse con varias técnicas, (precipitación de sulfato de amónico, inmunofluorescencia, marca con ferrita etc.) estos métodos están alcanzando valor clínico para medir anticuerpos importantes en los procesos patológicos.

Las manifestaciones secundarias de la reacción antígeno-anticuerpo incluyen:

- Precipitación
- Aglutinación
- Reacciones que dependen del complemento
- Neutralización
- Efectos citotrópicos

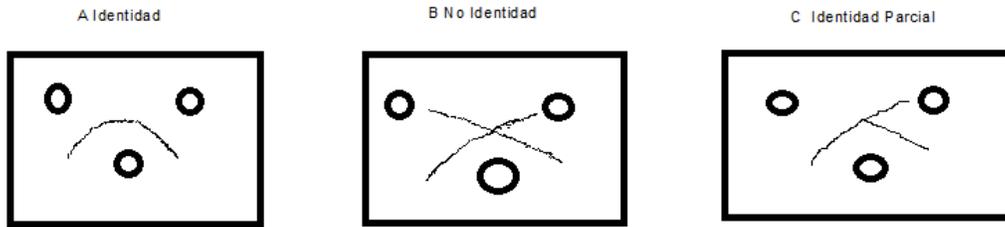
Estas reacciones tienen importancia práctica para el médico, ya que constituyen la base de cierto número de pruebas de laboratorio utilizadas para descubrir e identificar antígenos, anticuerpos o complejos de antígeno-anticuerpo que intervienen en procesos patológicos.

Las interacciones antígeno-anticuerpo a veces se expresan como manifestaciones terciarias, tales reacciones por definición, son expresiones biológicas de la interacción antígeno-anticuerpo y pueden ser útiles para el paciente, pero en otras ocasiones son causa de enfermedad por lesión inmunológica.

Pueden obtenerse aún más datos sobre las reacciones complejas entre antígeno y anticuerpo mediante un método simple, desarrollado principalmente por Ouchterlony en Suecia, que consiste en poner soluciones de antígeno y anticuerpo en pocillos separados dispuestos en una placa de agar. Con este método son posibles muchas alineaciones geométricas.

Los reactivos se difunden a partir de los pocillos, y se forman bandas de precipitación, si la concentración de anticuerpo introducido se halla en cantidad excesiva en relación con el antígeno la banda se forma, en primer lugar, junto a la cavidad del antígeno; y ocurre a la inversa si el antígeno se introduce en cantidad relativamente excesiva.

Las disposiciones que se muestran en la siguiente figura son particularmente útiles para comparar los antígenos o antiseros ante la presencia de componentes idénticos o que muestran reacción cruzada.



Reacciones de precipitación por doble difusión en el gel de agar que muestran reacciones de identidad, no identidad e identidad parcial.

En "A" se colocó el mismo antígeno en los pocillos 1 y 2, y el anticuerpo se hallaba en el pocillo 3.

En "B" se colocaron distintos antígenos en los pocillos 4 y 5 y el anticuerpo para ambos se hallaba en el pocillo 6.

En "C" el antígeno y su correspondiente anticuerpo estaban en los pocillos 7 y 9 respectivamente, y el pocillo 8 se colocó un antígeno de reacción de cruzada.

Si se pone una solución de antígeno puro en dos pocillos adyacentes, y se coloca el anticuerpo homólogo en el pocillo central, se observa que las dos bandas de precipitación se unen en sus extremidades contiguas y se funden, este tipo llamado reacción de identidad se observa siempre que reaccionan sistemas de antígeno-anticuerpo.

Por otra parte si se colocan los antígenos no relacionados en pocillos adyacentes y difunden hacia un pocillo central que contiene anticuerpos para cada uno de ellos, las dos bandas de precipitación se forman independientemente y llegan a cruzarse, y lo llamamos, y lo llamamos reacción de no identidad. No obstante, si el antígeno situado en uno de los pocillos es el anticuerpo que se halla en el pocillo central constituye un par de homólogo, y el antígeno emplazado en un pocillo adyacente presenta reacción cruzada, las bandas de reacción se funden y además forman una reacción cruzada, y se le llama reacción de identidad parcial o reacción cruzada.

## Material

- Portaobjetos con agar (con pocillos)
- Cajas de Petri
- Papel filtro
- Solución de antígeno
- Soluciones de anticuerpo

## Desarrollo

- Se llenaran los pozos con el antígeno en el centro y los pozos de la base con los sueros, y que queden perfectamente llenos en la caja Petri.
- Incubar 24-48 horas a temperatura ambiente.
- Leer resultados (buscar bandas de precipitación)

## Cuestionario

1. ¿qué importancia tiene los estudios de laboratorio?
2. ¿Defina antígeno y anticuerpo?
3. ¿Qué factores pueden alterar los resultados?
4. ¿Qué importancia tiene para el medico las reacciones antígeno anticuerpo?
5. ¿Enuncie y explique cada uno de los tipos de bandas de identidad?

## **REACCIONES DE PRECIPITACION EN CAPILAR**

### Introducción

Las reacciones de precipitación tienen lugar cuando antígeno y anticuerpo se hallan en forma soluble. Pueden introducirse en medios líquidos o en geles.

### PRUEBA CUNTITATIVA DE PRECIPITINA EN MEDIO LÍQUIDO

Las reacciones de precipitación en medio líquido pueden analizarse cuantitativamente, y determina la cantidad de antígeno y anticuerpo que se existe en los precipitados.

Se hacen reacciona cantidades constantes de antisuero con concentraciones conocidas variable de antígeno.

En esta práctica el emplear una serie de capilares, la cantidad del precipitado varia dependiendo de la proporción de los reactivos, y si colocamos en estos el mismo volumen de antisuero con cantidades crecientes de antígeno el precipitado alcanza un máximo, y poco a poco se encuentra una disminución en el precipitado.

En estas forma se han distinguido tres zonas: la zona de exceso de anticuerpo en la cual la proporción entre antígeno y anticuerpo es elevada, y el exceso de anticuerpo se combina no se combina y queda demostrable en el líquido que sobrenada, la zona de proporciones optimas o zona de equivalencia, donde todo el antígeno y todo el anticuerpo se combinan y han precipitado; y la zona de exceso de antígeno, donde hay antígeno libre en líquido que sobrenada.

### Material

- Gradilla
- Gradilla de plastilina
- Solución salina o buffer
- Tubos de ensaye
- Tubos capilares
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas de 5 ml
- Tubo con antisuero (anticuerpo), humano total.
- Tubos con suero humano

## Desarrollo

En los tubos de ensaye se efectuaran diluciones seriadas y proporcionales del antígeno con la solución salina, emplea 9 tubos.

Agregar en cada tubo 0.5 ml de solución salina, al primer tubo agregar 0.5ml del suero extraído a algún alumno, o en su defecto del que senos facilito, de este tubo tomas 0.5 ml y pasarlo al tubo 2, y así hasta terminar con todos los tubos.

Es muy importante macar cada tubo desde el inicio.

Previamente los capilares se dividirán con un marcado en cuatro partes iguales.

- Se introducirá un capilar dentro del tubo del antígeno (primer tubo), y por capilaridad se dejara que llena hasta la primera cuarta parte.
- Se gira 180° se dejara que descienda el líquido hasta el otro extremo del tubo.
- Por el extremo no utilizado se llenara la otra cuarta parte cuidar de que no existan burbujas que impidan la mezclan entre el antígeno y el anticuerpo.
- Se mezclaran los capilares con movimientos oscilatorios, para el antígeno y el anticuerpo se unan y mezclen perfectamente, cuida que no se vaya a Salir el liquido po los extremos.
- Se tendrá un volumen final a la mitad del tubo capilar y tapando un extremo con el dedo se colocara en la barra de plastilina por el extremo contario, que previamente fue marcada con el número correspondiente de nuestro tubo.
- Se repetirá el mismo procedimiento de llenado de los capilares con cada tubo y sus diferentes diluciones.
- Se tendrá un tubo capilar testigo con el antígeno, y otro con el anticuerpo.
- Se refrigera por 24-48 horas.
- Efectuará lecturas, leer la cantidad de precipitado en milímetros.

- Se efectuara una gráfica donde se muestre la zona de exceso de antígeno, la zona de equivalencia y la zona de exceso de anticuerpo.
- Colocando en el eje de las abscisas la dilución del tubo, y en las ordenadas los milímetros de precipitado.

#### Cuestionario

¿Qué ventajas presenta este método, en relación con el gel de agar?

¿Qué importancia médica tiene este método?

¿Cuándo estaría indicado un estudio de esta índole?

¿Con que objeto se efectúan diluciones?

Explique la inmunidad humoral y celular.

Explique la curva (gráfica) de la relación Ag-Ab.

## **REACCIONES DE AGLUTINACION**

### OBJETIVO:

Que el alumno compruebe como se lleva a cabo una reacción de aglutinación por medio de una prueba inmunológica (reacción Ag-Ab).

### INTRODUCCION

Hasta cierto punto, la precipitación y la aglutinación puede considerarse manifestaciones de la misma interacción antígeno-anticuerpo, la única diferencia es el estado físico en que se presenta al antígeno debe de estar soluble, por otra parte, para que se lleve a efecto una reacción de aglutinación, el antígeno deberá ser una partícula, como por ejemplo una bacteria, un glóbulo rojo, una partícula de látex, etc. En ambos casos tiene lugar una unión química reversible de dos fases ó etapas. En la primera el fragmento Fab de los anticuerpos reacciona con los determinantes antigénicos ó haptenos de la molécula extraña, esta combinación está sujeta a varios factores como lo son el Ph, la temperatura, la fuerza iónica, hidrófobas, de Van der Waals y fuerzas entéricas. En cuanto la reacción llega a un equilibrio comienza la segunda fase de la reacción o sea la formación de una nueva red, en esta fase los fragmentos Fab "libres" reaccionan con sus determinantes homólogos de otras moléculas de este mismo sistema, formándose la "red" o "malla" antes mencionada.

En una reacción de precipitación debido a que el antígeno esta soluble, se debe de formar una respuesta bastante grande para que se logre observar, por lo que se requiere una concentración elevada de antígeno.

Pero en una reacción de aglutinación el antígeno es particulado y la red en este caso es más fácil de formarse por lo que se necesita menos cantidad de antígeno para que quede de manifiesto la reacción.

### MATERIAL

- Jeringa desechable
- Centrífuga
- Torundas
- Ligadura

- Tubos de ensaye 13/100
- Baño maría
- Porta-objetos excavados
- Antígeno V. D. R. L.
- Microscopio
- Pipeta de Pasteur

#### DESARROLLO

- Se procederá a extraer 5ml. De sangre a un alumno.
- Se colocará en un tubo de ensaye de 13/100.
- Se dejará coagular a temperatura, o en su defecto en la estufa, durante 5-10 minutos.
- Se centrifugará 300 rpm/5 minutos.
- Separar el suero con una pipeta Pasteur.
- Se colocará el suero en tubo limpio y se llevara a baño maría.
- Se colocará el tubo a baño maría a 60 °C durante un minuto con el fin de inactivarlo.
- Se colocará una gota del suero en un porta-objetos excavado y ahí mismo se le agregará una gota del antígeno V.D.R.L.
- Se le hará la mezcla con un aplicador de madera y se "leerá" en el microscopio la presencia de grumitos (aglutinación) si existen la prueba será positiva, si no hay presencia de estos grumos entonces la prueba será negativa.

## CUESTIONARIO

- Defina usted el termino precipitación y aglutinación (inmunológica)
- Diga usted 5 características que deba de presentar una sustancia para que actúe en un organismo como sustancia antigénica.
- ¿Qué diferencia existe entre un antígeno y un inmunógeno?
- ¿Cuál de las pruebas realizadas es positiva y porque?
- ¿Qué método seguiría para que la reacción fuera negativa, (en caso de que fuera positiva)?
- ¿Qué significa antígeno V.D.R.L.?
- ¿Qué enfermedad es la que normalmente nos diagnostica?
- En liste usted 4 padecimientos que nos den la prueba V.D.R.L. positiva.
- ¿Cuál es la composición y de donde se extrae el Ag. V.D.R.L.?
- Mencione usted tres pruebas en donde se realice una reacción de aglutinación inmunológica, y diga también cual es la partícula que está favoreciendo la aglutinación en cada caso, y para que nos sirven ó en el diagnostico de que nos ayudan cuando se realizan en el laboratorio.

## **GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA**

El diagnostico del embarazo constituye poca o ninguna dificultad para efectuarse. La mayoría de las veces es la paciente quien ha hecho el diagnostico y toca al médico su certificación.

Para fines prácticos se reconocen signos durante las dos mitades del embarazo, nombrándose a los primeros como subjetivos o presunciales y los signos de certeza son los segundos.

### Signos presunciales

- Amenorrea
- Gestosicos
- Mamarios
- Vaginales y vulvares
- Cervicales

### PRUEBAS ENDOCRINAS

La eliminación coriònica de gonadotrofina y la facilidad con que se realizan las reacciones inmunológicas para su identificación han hecho de éste el método más práctico para ser utilizado en la actualidad para diagnosticar el embarazo desde los 42 días de la última menstruación.

El fundamento de esta prueba es el de la hemaglutinación cruzada con el anticuerpo para la gonadotrofina coriònica.

### PRUEBAS BIOLOGICAS

Prácticamente son pruebas que han pasado a la historia y consistían en utilizar como inductor hormonal a la presencia de hormona coriònica en la orina, que administrada a ratas, conejas, ranas hembras y ranas machos, provocaban reacción local ovárica, ya sea formando cuerpo amarillo, hiperemia o expulsión de huevos o esperma, pero lo más importante radica no en la duda de su interpretación, lo que ha motivado su desuso.

### RADIOINMUNOENSAYO

El costo de la prueba no ha mostrado ventaja en la reacción inmunológica.

## PRUEBA HORMONAL

Lo mismo que la anterior, no tiene ventaja alguna sobre la inmunológica, su respuesta se obtiene de administrar 3 a 5 días progesterona o progestágenos, lo cual en caso de no existir embarazo por reacción insuficiente del cuerpo lúteo, se provoca un sangrado por deprivación. Durante la primera mitad del embarazo se puede utilizar el diagnóstico del mismo a partir de la 1era. A 6ta. Semana, pero sin ventaja con otras pruebas.

## SIGNOS DE CERTEZA

Estos signos dependen fundamentalmente de la detención del producto y son los siguientes:

- Delimitación del producto
- Peloteo fetal
- Detección de frecuencia cardiaca fetal
- Movimientos fetales

Así como también otros signos que dependen del crecimiento uterino y las llamadas contracciones de braxton hicks.

Es importante descubrir el embarazo antes de que se declare por sí mismo porque:

El feto, en especial al inicio del embarazo, es vulnerable a daño por fármacos potencialmente teratógenos, a otras sustancias y radiaciones ionizantes.

Para el diagnóstico diferencial médico y quirúrgico como un embarazo tubario.

El uso amplio de anticonceptivos esteroides origina situaciones en que es necesario descubrir un embarazo, o un fracaso de los mismos para tan pronto sea posible evitar daño al embrión o al feto al continuar su administración.

Es necesario descubrir un embarazo temprano en el tratamiento de la infertilidad.

Por todo lo anteriormente señalado podemos afirmar que las pruebas modernas de embarazo se basan en la detección de

gonadotropina coriònica humana (GCH), sintetizada por el tejido trofoblàstico (sintrofoblasto) de la placenta.

Esta hormona es esencial para conservar el cuerpo amarillo y apoyar el inicio del embarazo.

Estimula la secreciòn de estrògeno y progesterona por el cuerpo amarillo y evita la menstruaciòn.

La cantidad que se secreta se relaciona directamente con el tejido trofoblàstico presente.

GCH es una hormona polipéptida similar en estructura a la luteinizante (LH), estimulante del folículo (FSH) y TSH.

Todas estas hormonas estàn compuestas de una cadena alfa y una cadena beta.

Las cadenas alfa son prácticamente idénticas, la estructura de la cadena beta es la que confiere la especificidad biológica e inmunológica.

En la práctica es muy importante diferenciar entre GCH y LH porque el aumento repentino normal a mitad del ciclo de la segunda que estimula la ovulaciòn, puede identificarse en forma errònea como GCH en pruebas inespecíficas de embarazo originando un diagnostico positivo o falso de gestaciòn.

Se recomienda una muestra de la primera orina de la mañana por que es la más concentrada y es posible que tenga el valor más alto de GCH.

La sangre o proteínas en orina y fármacos pueden interferir con las pruebas inmunológicas.

Es esencial un recipiente de vidrio limpio para las muestras de orina y suero. (Evitando hemólisis cuando se toma la muestra de sangre).

Las radioinmunovaloraciones en orina, difieren de las radioinmunovaloraciones y radio receptores séricas por su sensibilidad a GCH.

En los siguientes cuadros se muestran las ventajas y desventajas de las radioinmunovaloraciones estándar de GCH en tubo.

Las radioinmunovaloraciones en orina reaccionan en forma cruzada con GCH, ello limita su especificidad para la detección temprana del embarazo.

#### VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS INMUNOVALORACIONES RAPIDAS INDIRECTAS CON LATEX EN PORTAOBJETOS

##### VENTAJAS

- Rápida.
- No se requiere centrifugación ni filtración de la muestra.
- Especificas si el contenido de proteínas urinarias es bajo (30mg/GCH).
- No hay interferencia por fármacos con la unión covalente de látex y GCH.

##### DESVENTAJAS

- Relativa insensibilidad (comparada con pruebas en tubo y radioinmunovaloraciones).
- Valor de GCH de 1.5 a 2.5 UI/ml necesario para una prueba positiva.
- 90% de exactitud solo después de 45 días de la falta del último periodo menstrual.
- Resultados negativos falsos en algunas muestras de orina con densidad especifica.
- Índice de error técnico elevado (1.5 a 3.0%) por técnica de mezclado inadecuada.
- Resultados positivos falsos ocasionales por proteinuria importante (100mg/dl).

##### CONCLUSION

Prueba de elección en consultorios médicos.

Tomado de: Horwitz CA: Pregnancy tests 1980. Advantages and limitations. Laboratory Medicine II: 621, 1980.

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS INMUNOVALORACIONES ESTANDAR GCH EN TUNO

### VENTAJAS

- Procedimiento sencillo.
- Varias veces más sensible que las pruebas rápidas en portaobjetos.
- Menos errores técnicos que las pruebas rápidas en portaobjeto.

### DESVENTAJAS

- Relativa insensibilidad
- Se requiere un valor de GCH de 0.5 a 1.0 UI/ml. para una prueba positiva.
- 90% de exactitud sólo después de 4° días de la falta del último período menstrual.
- Proteinuria importante (100mg/dl.) puede causar anillos atípicos.
- Vibración o sacudidas pueden causar puntos finales deformados, no concluyentes.

### CONCLUSION

Pruebas de elección en hospitales que no cuentan con equipo de radioinmunovaloraciones para pacientes que se someten a raspado diagnóstico o histerectomía de elección.

Tomado de: Horwitz CA: Pregnancy tests 1980. Advantages and limitations. Laboratory Medicine II: 622, 1980.

La práctica consiste en efectuar una prueba para el diagnóstico del embarazo en la que se detecta inmunológicamente la gonadotropina coriònica humana (GCH) en orina por inhibición de la aglutinación hemática.

1) Orina negativa

Paso A.- Orina (sin GCH) mas suero anti GCH. No hay reacción (el anti GCH permanece activo).

Paso B.- Se añade a la mezcla anterior eritrocitos recubiertos con GCH. Se aglutinan debido al suero anti GCH formando una "malla" o patrón homogéneo en el fondo del tubo.

## 2) Orina positiva

Paso A.- Orina (con GCH) mas suero anti GCH neutralización (inactivación) del anti GCH por reacción inmunológica.

Paso B.- Se añaden eritrocitos recubiertos con GCH. No se aglutinan. Se sedimentan formando un anillo en el fondo del tubo.

Las pruebas para el diagnostico de embarazo que se encuentran en el mercado, son varias y presentan sensibilidades para detectar desde 1000 UI de GCH/litro de orina (1 UI.ml).

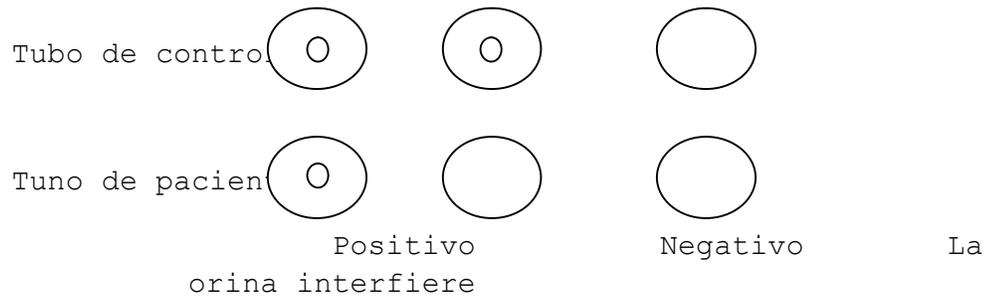
## PROCEDIMIENTO

- Recolectar la muestra.
- Dejar enfriar la muestra.
- Filtrar o centrifugar a 3000-4000 rpm 5-10 minutos.
- Emplear dos tubos limpios y secos.
- Depositar el contenido de un gotero hasta la marca de solución control (0.25) en otro tubo (control).
- Agregar 5 gotas de orina (0.25 ml) con gotero a cada uno de los tubos (paciente y control).
- Colocar en el fondo de cada tubo una gota de eritrocitos previamente suspendidos y mezcle.
- Cuidar que los glóbulos sedimenten correctamente. No vibraciones, no calor.
- Observar los resultados.

Positivos en una hora

Negativos en dos horas

## LECTURA E INTERPRETACION



En la formación del

Anillo.

## CUESTIONARIO

- ¿Cuál es la importancia de determinar GCH?
- ¿Cuáles son los métodos que se pueden emplear?
- ¿Cuáles son los métodos más usuales y porque?
- ¿En que se basan dichos métodos?
- Describa las indicaciones para determinar GCH.
- ¿Cuándo se encuentran resultados falsos positivos?
- ¿Cuándo se encuentran resultados positivos falsos?
- ¿con que otros métodos se puede diagnosticar un embarazo?
- ¿Cómo se clasifican los signos para diagnostico de embarazo? Enúncielos y explíquelos.

## **FAGOCITOSIS**

La fagocitosis es la ingestión de partículas por células individuales, es la función por la cual las células especializadas, localizan, identifican e introducen al citoplasma celular, agentes patógenos y una vez formada la vacuola fagocitaria, excretan en ella las distintas enzimas que llevan a la muerte o desintegración del antígeno.

La fagocitosis por leucocitos circulantes y fijos es el mecanismo de defensa más importante del organismo contra todo aquello que lo invade. Filogenéticamente, la fagocitosis es el medio de defensa más primitivo e importante que juega un papel predominante contra invasores extraños en todas las especies animales.

La defensa fagocítica de los mamíferos consta del sistema fagocítico de los polimorfonucleares, que es la primera línea e incluye a los leucocitos polimorfonucleares circulantes, también llamados granulocitos, así como los macrófagos libres y fijos, conocidos como el sistema reticuloendotelial.

La inactivación, eliminación y destino de todos los microorganismos invasores corre a cargo de los fagocitos, ayudados con frecuencia por anticuerpos y complemento. Anticuerpo y complemento rara vez bastan para inactivar a los microorganismos y no son por completo capaces de efectuar su destrucción y eliminación.

Por otra parte. Los fagocitos eliminan fácilmente muchos microorganismos y otras partículas extrañas, pero son incapaces de discriminar entre los objetos extraños y los no extraños sin la ayuda de los anticuerpos.

El reconocimiento de partículas y de organismos extraños lo hacen los anticuerpos específicos, los cuales entonces, con la ayuda de varios factores del complemento, dan la señal química a los fagocitos que los hace movilizarse hacia la escena de la quimiotaxis.

Los anticuerpos, frecuentemente con la ayuda del complemento, efectúan cambios en la superficie de las partículas reconocidas, los cuales refuerzan la atracción de los fagocitos, proceso que se llama opsonización.

La fagocitosis la descubrió por primera vez Metchnikoff en 1887. Durante muchos años hubo una controversia en cuanto a la cuestión de si la defensa contra los organismos invasores se basaba en mecanismos humorales o celulares. Esta controversia se enfrió en tiempos recientes al conocimiento cada vez mayor de que son igualmente indispensables y que actúan en colaboración las actividades humoral y celular.

Los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos son fagocitos que están constantemente en la circulación periférica. En la sangre de un ser humano adulto normal. El número aproximado es de  $2.5 \times 10^{10}$  (alrededor de 1/1000 del número de glóbulos rojos circulantes) y además hay una reserva de  $2.5 \times 10^{12}$  de granulocitos o de sus precursores inmediatos.

En la figura 1, se presenta un neutrófilo humano con sus lóbulos nucleares típicos y sus múltiples gránulos citoplasmáticos que son estructuras homogéneas redondas u oblongadas, muchos de estos lisosomas, mientras que los numerosos puntos pequeños son depósitos de glucógeno.

El sistema fagocítico mononuclear contiene células móviles y las fijas altamente fagocítica del sistema reticuloendotelial. Como el concepto de sistema reticuloendotelial, referido como células mononucleares de gran capacidad fagocitaria, esta abierto a la crítica y carece de precisión, la expresión "sistema fagocítico mononuclear" es cada vez de mayor aceptación.

Este sistema comprende, en orden de capacidad fagocítica creciente, los:

- Promonocitos (en la médula ósea) que dan lugar a los;
- Monocitos (en la sangre periférica) los cuales a su vez dan lugar a los;
- Macrófagos (libres y fijos) en los tejidos siguientes;
- Médula ósea (macrófago, células sinusoidales de revestimiento).
- Tejido óseo (osteoclastos)
- Hígado (células de Kupffer)
- Pulmón (macrófagos alveolares)
- Ganglios linfáticos (macrófagos libres y fijos)

- Tejido medular de las placas de Peyer intestinales. (macrófago)
- Sistema nervioso (células de la microglia)
- Cavidades serosas (macrófagos peritoneales)
- Bazo (macrófagos libres y fijos, células sinusoidales de revestimiento).

Los macrófagos son considerablemente más grandes que los granulocitos y contiene un solo núcleo, frecuentemente en forma de riñón (figura 2).

Los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear forman la segunda línea de defensa contra partículas invasoras.

Al contrario que los fagocitos polimorfonucleares, muchos macrófagos continúan dividiéndose, también pueden fundirse y formar células gigantes multinucleadas que sirven para deshacerse de los cuerpos mas grandes.

La fagocitosis de partículas extrañas comprende un numero de pasos y actividades del todo diferentes, en los cuales las partículas que van a ser fagocitadas y las células fagocítica juegan cada una un papel importante.

#### QUIMIOTAXIS

Gracias a ella los movimientos sin orientación de las células fagocítica, adquieren una movilidad vectorial unidireccional como respuesta a estímulos químicos, que hacen que estas células se encuentren en el lugar que el organismo las necesita para su defensa.

Son varias las sustancias que obran como agentes mediadores de la quimiotaxis, algunas de originan en los productos bacterianos, otras en factores sanguíneos activados, como el factor Hageman, Kalicrinas y en algunas de las sustancias producidas por los linfocitos como linfoquininas, y linfotoxina. No obstante el elemento de mayor poder quimiotáxico se origina en el sistema proteico del complemento, que al ser activado por la reacción antígeno-anticuerpo desencadena la producción de sus diferentes componentes.

## RECONOCIMIENTO DEL ANTIGENO

Una vez que el fagocito ha llegado a la zona de irrigación o de ingreso del antígeno, debe entrar a reconocer cual es el elemento que debe atacar.

Estas células muestran una gran selectividad en cuanto al reconocimiento de las partículas o gérmenes, función que parece se opera por el reconocimiento de estructuras o características especiales de la superficie del elemento o partícula a fagocitar.

La activación de los fagocitos por el recubrimiento del antígeno, se llama opsonificación (preparación para la comida y adquiere gran valor en los procesos de defensa del organismo contra la infección por gérmenes bacterianos).

Los anticuerpos que tienen esta propiedad de opsonificación son exclusivamente de tipo IgG y especialmente de G1 y G3.

El complemento provee también factores de activación opsónica que refuerzan la acción de los anticuerpos, o permiten cierta activación de la fagocitosis en ausencia de anticuerpos.

## INGESTION

Después de que se establece el contacto entre las células fagocitarias y la partícula a fagocitar, el citoplasma, establece contacto con ella, la rodea totalmente y forma una vesícula o fagosoma, en la cual la parte de la membrana celular que es englobada viene a formar la pared del fagosoma.

## DEGRANULACION

Una vez que se forma el fagosoma, los gránulos de las células fagocitarias adquieren una gran movilidad, se aproximan y vierten en él su contenido enzimático. Como la pared del fagosoma es membrana celular, la liberación de las enzimas no va a afectar el citoplasma de la célula, ya que estas actúan sobre el contenido del fagosoma y no sobre el resto de los componentes celulares.

## MUERTE Y DIGESTION DEL ANTIGENO.

Los microorganismos fagocitados zona tacados por una serie de procesos enzimáticos que impiden su reproducción, alteran su metabolismo y producen su muerte degradándolo a partículas pequeñas.

El ph en el interior de la vacuola fagocitaria es inferior al del citoplasma del fagocito, y esto de por si tiene ya gran papel bactericida.

Lisozima.- es una proteína de bajo peso molecular y que es bactericida en virtud de su capacidad de hidrolizar algunos componentes de la membrana bacteriana.

Lactoferrina.- es una proteína con las propiedades de fijar el hierro y que tiene poder bactericida cuando no esta saturada con hierro. Al competir con la bacteria por el hierro necesario para el metabolismo detiene su crecimiento.

Preteinas cationicas. Se ha logrado aislar unas 7 entre las cuales se encuentran la fagocitina y la leukina. Se combinan con grupos ácidos de la membrana bacteriana e impide el normal crecimiento del germen al alterar su metabolismo.

Sistema myeloperoxidasa-superoxido  $H_2 O_2$  halógeno. Constituye el mecanismo de mayor poder bactericida en la fagocitosis humana contra bacterias, hongos, virus y micoplasma. Y muchos otros que se señalan a continuación;

- Fosfatasa ácida
- Ribonucleasa ácida
- Desoxirribonucleasa ácida
- Cetepsinas B. C. D. E.
- Fosfatasa de fosfoproteínas
- Esterasas
- B-glucuronidasa
- B-galactonidasa
- B-N-acetilglucosaminidasa
- Alfa- 1 fucosidasa
- Alfa-1-4 glucosidasa
- Alfa-manosidasa
- Alfa-N acetilglucosaminidasa

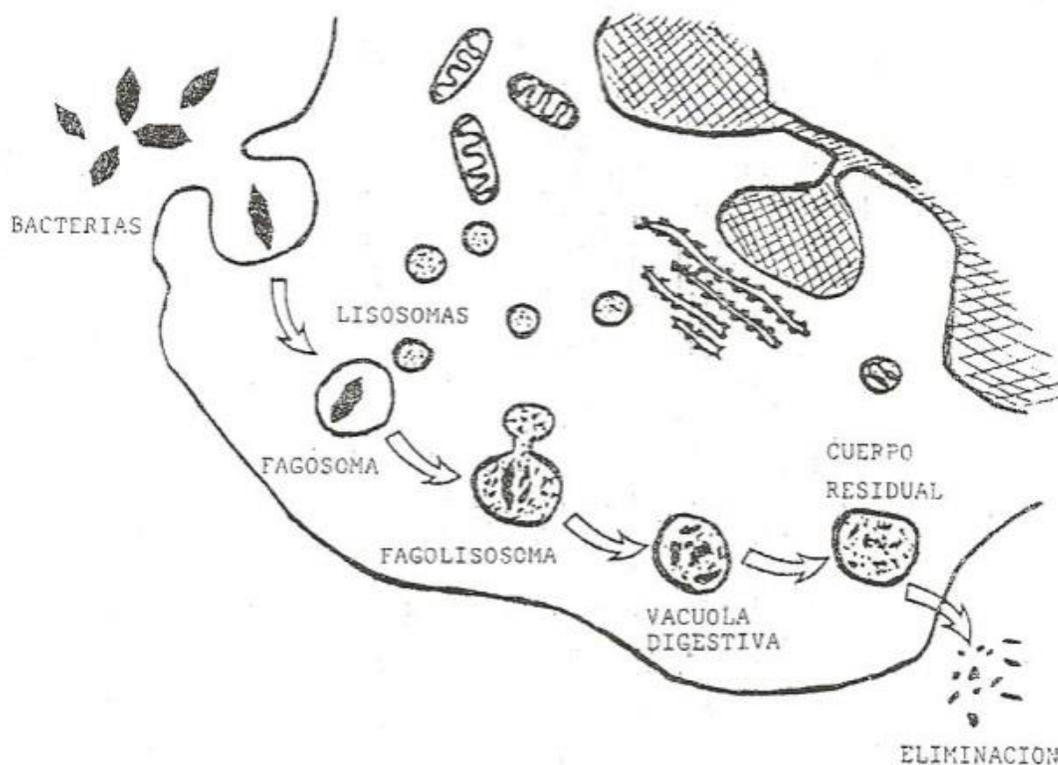
- Alfa-N acetilgalactosaminidasa
- Mieloperoxidasa
- Mucopolisacaridos
- Glucoproteinas
- Proteinasa básica
- Hialuronidasa
- Lizozima
- Colagenasa
- Arilsulfatasas A y B
- Fosfolipasa
- Lipasa ácida
- Lactoferrina
- Fagocitina y proteínas
- Pirogeno endógeno
- Activador de plasminogeno
- Hemolisina.

ENZIMAS Y OTRAS SUSTANCIAS DENTRO DE LOS NEUTROFILOS.

#### **DESARROLLO**

- Se obtendrá 5 ml. De sangre humana por equipo.
- Se colocaran inmediatamente en un tubo conteniendo anticoagulante y se agitara suavemente varias veces.
- Se centrifugara a 3000 rpm /minutos.
- Se separara la capa de células blancas y se colocaran en un tubo de 13x100
- Se adicionara 0.05 ml. De microorganismo de Staphylococcus agitar y ponerlos en un baño maria a 37°C por una hora.
- Tomar un portaobjetos muy limpio (limpiado con alcohol).
- Colocar una gota en uno de los extremos y hacer una extensión con otro portaobjetos.

- Dejar secar el frotis al aire y teñir con colorante de Wright:
  - a) Cubrir la preparación con el colorante y se deja actuar 2 minutos. La solución no debe de precipitarse en el portaobjetos por la evaporación.
  - b) Añadir una cantidad aproximadamente igual de agua destilada distribuyendo por toda la extensión soplando suavemente la superficie del portaobjetos con ayuda de una pipeta , la mezcla presenta un brillo metálico.
- Dejar actuar la mezcla durante 7 minutos.
- Lavar 30 segundos con agua corriente
- Dejar secar al aire y observar a inmersión.
- Efectuar esquemas
- Determinar el porcentaje de leucocitos fagocitantes.



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA FAGOCITOSIS, MUESTRA EL PROCESO DE INGESTION Y LA DIGESTION INTRACELULAR.

### **CUESTIONARIO.**

- 1.- Define qué es la fagocitosis
- 2.- Mencione brevemente cual es el mecanismo de la inflamación
- 3.- ¿De qué origen embrionario pueden ser las células con capacidad fagocitaria?
- 4.- ¿Qué es el fenómeno de Diapédesis?
- 5.- ¿Qué es el fenómeno de Quimiotactismo?
- 6.- ¿Qué nombres reciben los fagocitos en los siguientes tejidos?
  - a) Hígado
  - b) Sangre
  - c) Sistema nervioso
  - d) Tejido conectivo
  - e) Pulmon

## **DEMOSTRACION DE LA LISOZIMA EN SECRECIONES**

En las secreciones bucales se han descrito varios factores antibacterianos, no inmunológicos y aunque el significado biológico de estos factores no se comprende enteramente, pueden desempeñar algún papel en la producción de los tejidos bucales.

La Lisozima es una enzima hidrolítica que rompe el enlace entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico.

Estos enlaces existen en el mucopéptido (péptido glucano) de la pared celular de las bacterias.

Algunas especies de bacterias son extremadamente sensibles a la lisis por esta enzima, como la de *Micrococcus lysodeikticus*, otros microorganismos son menos sensibles o aun completamente resistentes a su acción.

En algunas ocasiones, la Lisozima puede intervenir en la lisis de las bacterias mediada por anticuerpo-complementado.

La Lisozima está ampliamente distribuida, encontrándose en la saliva, secreciones nasales, lágrimas, tejidos y líquidos corporales, y en la clara de huevo.

En 1922, Fleming informó la presencia de una sustancia de las secreciones nasales que causaba la lisis de *Micrococcus lysodeikticus*; denominó a esta sustancia Lisozima, que se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, y no encontrándose en el pus, en el líquido cefalorraquídeo, ni en la orina, además se piensa que puede tener una importante participación en la resistencia natural de la infección.

Es activa contra cepas de *Neisseria*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium*.

La cantidad de Lisozima en el suero del recién nacido es mayor que la del suero materno; lo anterior podría reflejar su participación como factor de resistencia antes de la capacitación del sistema de inmunidad del niño.

La Lisozima es una enzima de mucopolisacáridos que actúan sobre la pared celular de algunas bacterias.

En un estudio de informa que varias estirpes bacterianas de la flora bucal normal se mostraron resistentes a la acción de la Lisozima. Las bacterias que no fueron destituidas ni tampoco inhibidas por la Lisozima fueron las siguientes; Bacteriodes oralis, Bacteroides melaninogenicus, Difteroides anaerobios, Difteroides facultativos. Bacilos fisiformes, algunas especies de lactobacilos, peptoestreptococos, Streptococcus salivarius, la Espiroqueta Treponema, microdentium Veillonella alcalescens y Vibrio sputorum.

En algunos estudios experimentales, los resultados han indicado que el estreptococo cariogeno y las bacterias gram negativas pueden volverse susceptibles a la lisis por la Lisozima por algunas manipulaciones y alteraciones en el medio de cultivo en el que se coloquen.

La Lisozima es una enzima que en la saliva sus fuentes son la glandula parótida, submandibular y sublingual; los surcos gingivales y los leucocitos se a saliva que se ha destruido.

### **DESARROLLO**

- Colocar sobre un cultivo de Micrococcus Lysodeikticus, discos de papel filtro impregnado con:
  - a) Solución salina
  - b) Saliva
  - c) Lágrimas.
- Incubar a 37°C durante 1 hora.
- Observar la presencia de lisis cuando esta presente la Lisozima.

### **CUESTIONARIO**

1. ¿A qué nivel estructural actua la Lisozima en las bacterias?
2. ¿Cuál es la función de la Lisozima?
3. Diga todos los sitios del cuerpo humano en donde se puede localizar la Lisozima.

## **ANTIESTREPTOLISINAS**

### **Objetivo**

### **Cuantificación de antiestreptolisinas**

### **Introducción**

La cuantificación de antiestreptolisinas es la prueba serológica más usada para el diagnóstico de la fiebre reumática.

La fiebre reumática es una enfermedad inflamatoria de múltiples sistemas, asociada con una historia reciente de infección por estreptococos del grupo A.

Se ha emitido la hipótesis de que las manifestaciones de la fiebre reumática son consecuencia de la acción de toxinas estreptocócicas, siendo los estreptococos del grupo A los que producen abundantes y ponentes toxinas que producirían solas o en combinación, causar algunas manifestaciones de fiebre reumática.

Las toxinas son: estreptolisinas O<sub>y</sub>S, proteinasa estreptocócica, complejo de polisacáridos C y proteína.

Las estreptolisinas son hemolisinas, de la cual solamente la O<sub>e</sub> es una hemolisina antigénica cuyo anticuerpo, la antiestreptolisinas O (ASO), bloquea la actividad hemolítica y forma la base de la prueba serológica.

### **Material**

Reactivos de estreptolisina "O" e hidrosulfuro de sodio.

9tuvos de ensayo 13x100.

Gradilla.

Baño Maria o estufa a 37°C.

Jeringas, torundas con alcohol y ligadura

Solución salina al 85 %

Solución de glóbulos rojos al 5%

Aplicadores de madera

Centrifuga. BALANZA granataria de dos platillos.

Pipetas de Pasteur

### **Desarrollo**

1. A un alumno grupo sanguíneo "0" se le extraen 10 ml por un punción venosa, colocando 5ml en un tubo con anticoagulante y 5ml en otro tubo sin coagulante, este dejara coagular (acelerando este fenómeno introduciéndolo en la estufa a 37°C durante 5 minutos, una vez pasado este tiempo con un aplicador de madera se romperá la red de fibrina y se centrifugara a 3000 rpm por 5 minutos, se obtendrá dos fases, y con una pipeta Pasteur se separara la fase liquida (que será nuestro suero problema), se colocara en un tubo limpio, para después determinarle el título de antiestreptolisina).
  
2. Suspensión de glóbulos rojos: el tubo con anticoagulantes se centrifugara a 3000 rpm durante 5 minutos y se separara el plasma con una pipeta de Pasteur desechándola. Se lavara el paquete celular con solución salina al 85% un minimo de tres veces hasta obtener un sobranete claro, acto seguido se hará una suspensión de glóbulos rojos al 5% .
  
3. Dilución del suero problema: se hará las siguientes diluciones, utilizando solución salina diluyente:  
  
1:10 0.5 de suero + 4.5 de solución salina  
1:100 1 ml de la dilución 1:10 + 9.0 ml. sol. Salina  
1:500 2 ml de la dilución de 1:100 + 8 ml. de .sol. Salina



## **Cuestionario**

- 1) Mencione características de estreptolisina O y S.
- 2) Diga qué clase de inmunoglobulinas.
- 3) Mencione cuales son los signos mayor y menores de la fiebre reumática.
- 4) ¿Cuál es el fundamento del uso de glóbulos rojos para la prueba de antiestreptolisinas?
- 5) ¿Cuál es la importancia medica de realizar una prueba de antiestreptolisinas?
- 6) ¿Cómo interpretaría una prueba de antiestreptolisina. En el cual estas estuvieran sobre U todd?
- 7) Diga que reacción inmunológicas se produce en la práctica que se llevó a cabo
- 8) ¿Qué papel juega el hidrosulfuro de sodio en la reacción?
- 9) ¿Qué título de U. Todd debe considerarse para que exista un padecimiento?
- 10) Mencione diez enfermedades producidas por estreptococo.

## **EL COMPLEMENTO**

Objetivos

Comprender la importancia del complemento  
Efectuar la prueba de fijación de complemento

### **Introducción**

El complemento es un conjunto de 11 proteínas en el suero sanguíneo fresco que participa en varias reacciones inmunológicas. Aunque no se produce como resultado de la inmunización, así combina con los agregados antígeno-anticuerpo bajo condiciones adecuadas puede lisar, matar o inmovilizar las células en las sensibilizadas, o promoverse adherencia inmunitaria y la fagocitosis, así como la anafilatixina. El complemento está normalmente presente en la sangre de la mayoría de los animales vertebrados. El complemento es altamente inestable.

La cascada del complemento es una serie de reacciones enzimáticas que conducen a la muerte o lisis de una célula o algún acontecimiento importante y por lo general lesivo.

La clásica secuencia se inicia por la unión de C1 con un complejo antígeno-anticuerpo.

C1 consiste de las tres proteínas, C1q, C1r, C1s, mantenidas juntas por  $Ca^{++}$  COMO LIGADO. El efecto del antígeno sobre el anticuerpo (IgM, IgG) es un cambio de conformación o alosterico que hace accesible un sitio receptor C1q en la región Fc. A fin de activar el complemento, C1q polivalente debe unirse a cuando menos dos sitios Fc, o sea, dos sitios sobre una molécula IgM o sitios sobre dos moléculas IgG muy próximas que hayan reaccionado con el Ag. C1q sufre entonces un cambio de conformación que modifica C1r de modo que está activa la proenzima, C1s.

Los sustratos de C1s son C4 y C2. C4 se desdobla a C4a y C4b, y este último se une con C1. En presencia de iones  $Mg^{++}$ , C2 se desdobla a C2a y C2b. C2a se une a C4b para formar C4b2a, una peptidasa conocida como convertasa de C3. desdobla a C3 en una pequeña fracción, C3a, y C3b, que

se fija al complejo C4b2a o a otros sitios de la membrana celular: cada molécula de C3 convertida divide a varios cientos de moléculas de C3.

La porción activa C4b2a3b del complejo fijado a la membrana celular escinde enzimáticamente C5, produciendo un pequeño fragmento, C5a, con actividad anafilatoxica y quimiotactica (como C3a) y un fragmento mayor, C5b, que se une a C3b sobre la membrana celular y forma un complejo ternario con C6 y C7. C8 se une entonces con el complejo y la fosfolipasa resultante inicia la formación de lesiones circulares de unos 100 Å de diámetro que puede conducir a una lisis lenta a 37°C. ESTO SE ACELERA bastante cuando se agrega C9 al complejo. Las lesiones pueden ser causadas por enzimas hidrolíticas o por la actividad depresora de la tensión superficial de grupos de radicales hidrofóbicos sobre el complejo C89 activado. No deben ser consideradas como orificios sino más bien como áreas circunscritas de permeabilidad aumentada (sitios de derrame) a través de las cuales escapan iones K<sup>+</sup>, pequeñas moléculas orgánicas y macromoléculas con ARN y proteínas, y a través de las cuales entran iones Na<sup>+</sup>. El resultado es que la presión osmótica en el interior de la molécula aumentada, entre agua, y la célula se hincha.

Hay una vía alterna para la activación del complemento que evita C142. Es iniciada por diversos polisacáridos vegetales, como la insulina, o por el zimosan, endotoxina bacteriana, o bien por inmunoglobulinas agregadas (IgG4, IgA e IgE, que no pueden ligar C1q y por lo tanto no inician la clásica secuencia del complemento)

La sustancia iniciadora actúa sobre C3 y lo desdobla en C3a y C3b que pueden entonces efectuar sus funciones habituales.

**Se señalan las principales actividades de los componentes del complemento en la forma siguiente:**

Actividad citolítica y citotóxica. C1 - C9

Atracción quimiotactica de leucocitos PMN C3a, C5a, C5b, 6,7

Adherencia inmunitaria de complejos AG-ab-C a leucocitos, plaquetas etc. Y aumento en la susceptibilidad a la fagocitosis por leucocitos y macrófagos C3 - C5b

Lesión a la membrana y lisis de eritrocitos y algunas bacterias Gram (-), filtración por la membrana plasmática de células nucleadas. C8 - C9

Liberación anafiláctica de histamina de los mastocitos, y aumento en la permeabilidad capilar C3a - C5a

Actividad de las cininas C2 - C3a

Liberación de enzima lisosomal por leucocitos C5a

Activación de la fagocitosis C3 - C5

Promueve la coagulación C6

Promueve la lisis de coagulo C3 - C4

Inactivación de las endotoxinas C5 - C6

Inactiva virus C4b

### **Material**

Baño maría.

Pipetas

Hemolisina, complemento, zimosan

Tubos de ensaye

Solución salina amortiguada de trietanolamina (TBS) frío

Glóbulos rojos de carnero

Gradilla

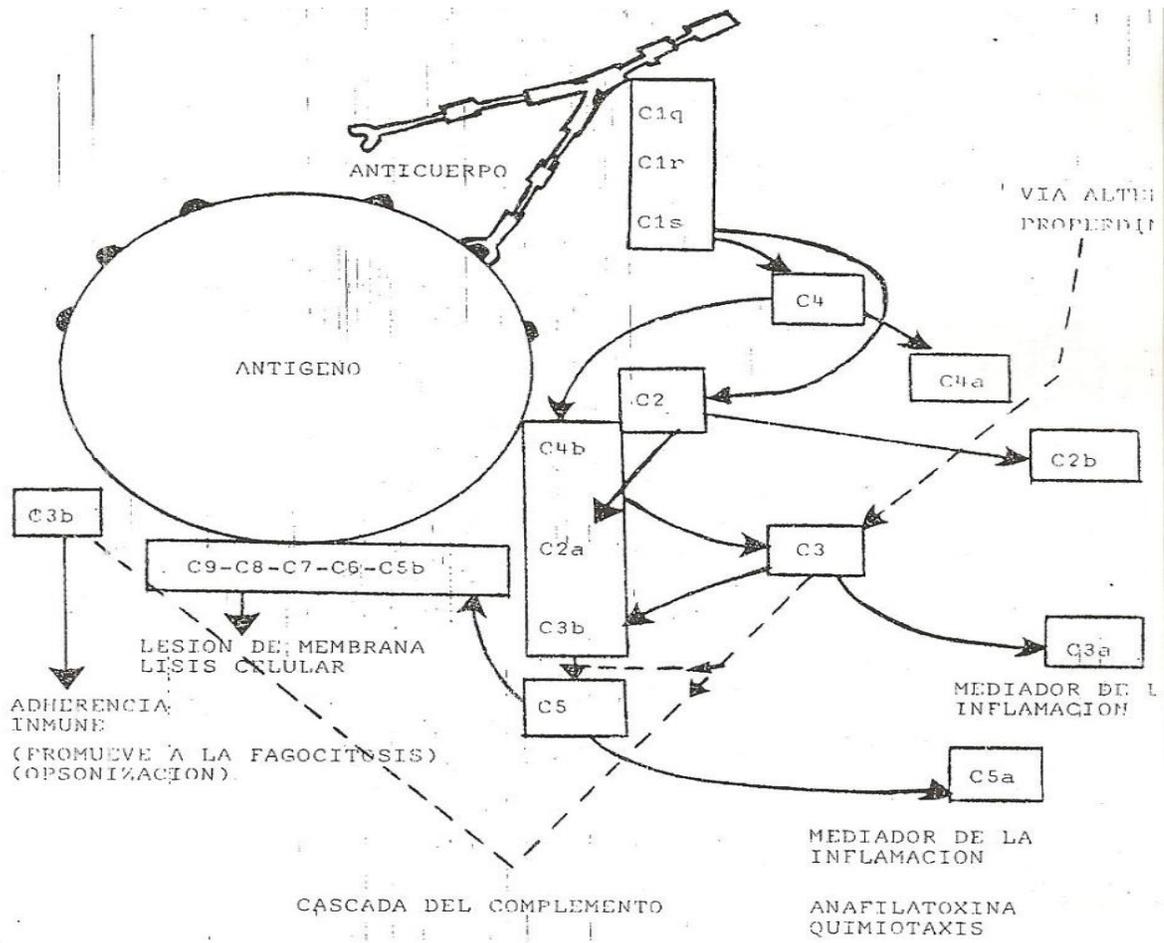
Para el desarrollo de la práctica se colocaran las soluciones como lo indica el cuadro siguiente, en cada uno de los tres tubos.

Tubo	Zimosan	Complemento	INCUB AR (30 a 37°C)	Eritrocitos	Hem.	INCUB AR (30 A 37°C)	TBS. FRIO
1	0.25 ml	-----		0.25 ml	0.25 ml		1.25
2	0.25 ml	0.25ml		0.25 ml	0.25 ml		1.0 ml
3	-----	0.25 ml		0.25 ml	0.25 ml		1.25 ml

Efectuará la lectura e interpretar los resultados

### **Cuestionario**

1. ¿Qué es el complemento?
  
2. Enuncie la vía clásica y la vía alterna del complemento.
  
3. Enuncie enfermedades producidas por deficiencia de complemento.
  
4. ¿Cuál es la concentración normal en suero humano?
  
5. ¿Cuál es la importancia del complemento, y que sustancias lo pueden activar, por cualquiera de las dos vías?



## **PROTEINA C REACTIVA**

Inflamación es la reacción local de tejido vascularizado a una lesión y con frecuencia se acompaña de necrosis.

Es la vía común final de prácticamente todo proceso nocivo sin importar su etiología, sin embargo, conceptualmente es útil separar la inflamación incluyen infecciones bacterianas y varales, tumores, infarto agudo del miocardio y procesos reumáticos. Incluso cuando no se conoce la etiología exacta, confirmar o excluir la presencia de un proceso inflamatorio mediante estudios de laboratorio en un paciente que presenta síntomas y signos vagos puede ayudar a determinar si deben llevarse a cabo más estudios.

Las características de un proceso inflamatorio, tumefacción, calor, enrojecimiento y dolor se relaciona con una serie compleja de fenómenos que incluyen cambios hemodinámicos, alteraciones de la permeabilidad vascular, exudación de leucocitos y mediadores químicos.

Aun no se aclaran los mecanismos por los que una lesión tisular estimula el hígado para sintetizar diversas proteínas en la fase aguda. La proteína C-reactiva (PCR) es una proteína en particular sensible y útil en la fase aguda por que la magnitud de su aumento puede ser mayor de mil veces los valores anteriores a una infección.

Proteína C- reactiva y fibrinógeno son las proteínas de fase que se miden mas comúnmente. Los métodos usuales para estimar PCR son aglutinación, fijación del complemento, anticuerpo fluorescente, precipitación en líquido o gel y radioinmunovaloración.

Los nuevos adelantos en la capacidad para medir PCR sérica aumentan de manera importante sus aplicaciones clínicas.

Los estudios indican que la PCR es un indicador mas temprano y confiable de inflamación que los otros

reactivos de fase aguda séricos. Se ha señalado que la PCR sérica es útil en el diagnóstico diferencial de neumonía bacteriana o viral, porque aumenta de manera espectacular en infecciones bacterianas.

En contraste con la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (LES) muestra poca o ninguna respuesta de PCR a menos que se complique por una infección intercurrente.

En el infarto de miocardio, un incremento brusco del valor sérico de PCR suele ser paralelo al tamaño del infarto.

En pacientes quemados, un incremento de PCR sérica se correlaciona con la gravedad de la quemadura. Una disminución de los valores séricos de PCR puede iniciar el tratamiento con éxito de la pielonefritis aguda.

Un aumento repentino del valor sérico de PCR indica el rechazo del injerto en pacientes con trasplante renal.

Otras implicaciones de PCR incluyen el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias pélvicas y de sepsis neonatal.

En la práctica efectuaremos una prueba en placa sensible y específica para la determinación y cuantificación de la proteína C- reactiva en suero sanguíneo humano.

La presencia de proteína C reactiva indica la presencia de un proceso inflamatorio o necrótico, además de ser útil como ayuda en el diagnóstico clínico, puede ser usada para conocer la eficacia de un tratamiento.

#### MATERIAL

Látex anti proteína C reactiva

Suero positivo para control

Suero negativo para control

Una placa de vidrio

## PROCEDIMIENTO

### PRUEBA CUALITATIVA

Extraer sangre

Centrifugar a 2000 rpm, 5 minutos.

Separar el suero

Diluya el suero a probar (1:10) con solución salina; dos gotas (0.1 ml del suero en 3.9 ml. De solución salina)

Colocar una gotita de la dilución anterior de las divisiones de la placa de vidrio

Añadir una gota de látex anti proteína.

Oscile suavemente la placa durante 3 minutos, observe si se presenta aglutinación macroscópica.

### INTERPRETACION

**POSITIVO:** Aglutinación visible con forma de agregados y fondo claro; comparable con control positivo.

**NEGATIVO:** Suspensión uniforme sin aglutinación visible, comparable con el control negativo.

En ocasiones se pueden apreciar unas granulaciones que no exceden a las observadas con el control negativo, por lo que no se deben interpretar como aglutinación.

### PRUEBA CUANTITATIVA

Preparar diluciones del suero problema en solución salina de la siguiente manera:

Colocar 5 tubos de ensaye en una gradilla, depositar 0.5 ml de sol. Salina en cada uno.

Añadir 0.5 ml de suero diluido 1:40 (como en la prueba cualitativa) al primer tubo.

Mezcle bien y transfiera 0.5 ml de la dilución anterior al segundo tubo, efectuando la misma operación hasta el tubo 5, las diluciones obtenidas son las siguientes:

Tubo 1 1:80

Tubo 2 1:160

Tubo 3 1:320

Tubo 4 1:640

Tubo 5 1:1280

Con un capilar o gotero poner una gota de cada dilución en las divisiones de la placa de vidrio con anterioridad marcadas.

Añadir una gota de látex anti proteína C reactiva a cada división.

Mezcle con un aplicador desde la dilución la más elevada a la más baja.

Oscile suavemente la placa durante 3 minutos y observe si se presenta aglutinación macroscópica.

#### **INTERPRETACION:**

La dilución mas elevada del suero que muestre floculación visible, se considera como el titulo de proteína C reactiva en el suero problema.

#### **CUESTIONARIO**

¿En que momento se encuentra indicada esta prueba?

¿Cuándo se efectuaría la prueba cualitativa?

¿Cuándo se efectuaría la prueba cuantitativa?

¿Cuál es el titulo de la proteína C reactiva normal?

¿Qué enfermedades nos puede dar un titulo elevado de proteína C reactiva?

¿Qué otra importancia tiene esta prueba de laboratorio?

Existen algunas otras pruebas de laboratorio que se pueden indicar simultáneamente con la de la proteína C reactiva. ¿Cuáles son y explique su respuesta?

# **DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO Y PRUEBAS CRUZADAS**

## **OBJETIVOS**

- Describir los fundamentos de los sistemas de grupos sanguíneos ABO y Rh.
- Explicar la relación entre grupos sanguíneos, transfusiones de sangre y enfermedad hemolítica del recién nacido.
- Conocer el método para determinar el grupo sanguíneo.
- Reconocer la importancia médica de conocer el tipo de sangre y el Rh en cada individuo.

## **INTRODUCCIÓN**

No todas las respuestas del sistema inmune producen un resultado conveniente.

Un ejemplo es la transfusión de sangre; sabemos que una transfusión de sangre será rechazada si la sangre del donante y la del receptor no son compatibles y que el rechazo también es un problema potencial con los órganos trasplantados.

La capacidad para transfundir exitosamente sangre total o componentes hemáticos específicos, ha salvado incontables vidas y apoyado el avance de la cirugía moderna y quimioterapia contra el cáncer. La primera transfusión sanguínea que salvó una vida la llevó a cabo hace menos de 200 años James Blundell, en 1818. La transfusión es cada vez más segura porque ya se han definido los grupos sanguíneos y su relación con la respuesta inmunitaria; se han desarrollado técnicas para separar, almacenar, preservar y probar sangre antes de la transfusión.

La determinación del grupo sanguíneo es llevado a cabo como un análisis de rutina, en pacientes internos, ambulantes, intervenciones quirúrgicas, problemas de ictericia en el recién nacido, transplantes, donación de sangre, etc.

## **Sistema de Grupos Sanguíneos ABO**

El primer sistema de grupos sanguíneos se describió al inicio del siglo XX por Karl Landsteiner (1901). La sangre humana puede clasificarse en cuatro grupos principales, designados A, B, AB y O. La presencia o ausencia de dos antígenos glucídicos designados A y B en la superficie de los eritrocitos determina el grupo sanguíneo de una persona. En el suero hay anticuerpos que aparecen naturalmente contra el antígeno AB opuesto. Las células del grupo O carecen de los antígenos A y B. las transfusiones de sangre incompatibles conducen a lisis de los eritrocitos del donante mediada por complemento.

En la actualidad, se conocen más de 400 antígenos de eritrocitos que pertenecen a 24 sistemas. Cada sistema de grupo sanguíneo tienen miembros, y cada miembro puede estar compuesto de uno o más antígenos distintos. Cada antígeno es controlado por un gen. Los antígenos sobre la superficie de los eritrocitos, por lo general, se detectan al reaccionar los eritrocitos con un antisuero conocido.

## **Sistema de Grupo Sanguíneo Rh**

El sistema Rhesus de grupo sanguíneo es el segundo en importancia del sistema ABO. Landsteiner y Weiner, observaron que al exponer el antisuero de un conejo sensibilizado frente a hematíes del mono Rhesus aglutinaba eritrocitos del 85% de la población humana.

Fisher y Race formularon que la expresión del antígeno Rh estaba controlada por tres pares de genes (Cc, Dd y Ee). El antígeno D es el más inmunógeno, es el de mayor importancia en las enfermedades hemolíticas y las transfusiones. Dicho antígeno, expresado en la membrana del eritrocito, se utiliza para determinar si los eritrocitos de un individuo son positivos o negativos frente al antígeno Rh.

Los individuos que los presentan se conocen como Rh+. La ausencia de este antígeno en ciertos individuos (Rh-) puede conducir la sensibilización cuando se exponen a él. Una persona Rh+ puede recibir transfusiones de sangre Rh+ o Rh-

Cuando una persona Rh- recibe sangre Rh+, ésta persona produce anticuerpos anti-Rh. La exposición posterior a

células Rh+ producirá una reacción hemolítica rápida y grave.

Una madre Rh- con un feto Rh+ producirá anticuerpos anti-Rh. Los embarazos posteriores que impliquen incompatibilidad Rh pueden producir la enfermedad hemolítica del recién nacido (eritroblastosis fetal). La enfermedad puede prevenirse mediante la inmunización pasiva de la madre en el momento del parto con anticuerpos Rh.

### **Otros Antígenos Eritrocitarios**

La mayor parte de los 20 sistemas de grupos sanguíneos restantes (que representan más de 300 antígenos) rara vez están implicados en reacciones de transfusión. Los anticuerpos contra los sistemas Kidd, Duffy, Kell y MNS se conocen por su capacidad para provocar hemólisis si se transfunde sangre antígeno positiva en un individuo sensibilizado. Otros grupos sanguíneos son denominados I, Lewis, P.

### **MATERIAL**

- Portaobjetos
- Lancetas y aplicadores
- Sueros hemoclasificadores del sistema ABO
- Torundas, ligaduras y jeringas
- Gradilla
- Tubos de hemólisis (cuatro)
- Pipeta de 1 ml.
- Centrifuga
- Solución

## MÉTODO

### Determinación del Grupo Sanguíneo

- Se limpiará, con una torunda con alcohol, el lóbulo de la oreja de un alumno.
- Puncionar con una lanceta estéril, esperar a que salga una gota de sangre.
- Se colocan tres gotas de sangre, de manera separada, en un portaobjetos limpio.
- Se adiciona una gota de suero anti-A, una gota de suero anti-B y otra anti-D, en cada gota de sangre respectivamente.
- Se mezclarán con un aplicador de madera.
- Observar el fenómeno que se presenta en cada prueba.
- Reportar el tipo de sangre de acuerdo al siguiente cuadro en donde se observe aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	
Antisuero	Grupo Sanguíneo
Anti-A	Tipo A
Anti-B	Tipo B
Anti-A y anti-B	Tipo AB
No aglutinación	Tipo O
Anti-D	Rh (+)
No aglutina anti-D	Rh (-)

## **PRUEBAS CRUZADAS**

- obtener 5 ml de sangre de dos alumnos: donador y receptor.
- Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente en los tubos sin anticoagulante.
- Romper la pared de fibrina y centrifugar a 3000 rpm durante tres minutos.
- Obtener suero y paquete celular en diferentes tubos, tanto del donador y como del receptor.
- Prueba mayor: mezclar una gota de los glóbulos rojos del donador con una gota de suero del receptor.
- Prueba menor: mezclar una gota del suero del donador con una gota de glóbulos rojos del receptor.
- Agitar los tubos y centrifugar a 3000 rpm durante cinco minutos.
- Observar si existe aglutinación, que se interpretará como incompatibilidad de grupos sanguíneos. Si no se observa aglutinación se interpretará como compatibilidad de grupos.

## CUESTIONARIO

1. ¿A qué se le denomina determinante antigénico?
2. ¿Cuáles son los determinantes antigénicos (nombre del azúcar) de cada uno de los grupos sanguíneos?
3. ¿Qué es un anticuerpo incompleto?
4. ¿Cómo puede explicar, con algunos ejemplos, la importancia de conocer el tipo de sangre de cada individuo?
5. ¿Qué tipo de anticuerpos atraviesan la placenta?
6. ¿Qué significado tiene ser un receptor o donante universal?
7. ¿Qué podría suceder si no se lleva a cabo la inmunización de la madre Rh- en el momento del parto?

¿Cuál es la vigencia de la sangre que va a ser transfundida y los riesgos que se pueden presentar al no respetar este dato?

## **FACTOR REUMATOIDE**

La artritis reumatoide, también llamada artritis atrófica, artritis proliferativa crónica, artritis infecciosa crónica es una enfermedad sistemática de causa desconocida, en la que los síntomas y cambios inflamatorios predominan en las articulaciones y estructuras afines. El padecimiento tiende a ser crónicas y producen deformaciones de incapacitantes características.

La enfermedad puede comenzar a cualquier edad, pero es más frecuente después de los 40 años de edad.

Las pruebas serológicas para el factor reumatoide son positivas en 75% de los pacientes adultos con artritis reumatoide clásica o definida de acuerdo al criterio del American Rheumatic Association.

Puesto que estas pruebas son negativas en la fiebre reumática, gota, osteoartritis, espondilitis anquilosante y en las artritis supurativas, son de valor en el diagnóstico diferencial y en la investigación clínica.

El factor reumatoide posee un claro valor pronóstico, los pacientes con pruebas positivas constantes, por lo general siguen un curso progresivo desfavorable.

El factor reumatoide es un macroglobulina (19S) con un peso molecular aproximado de un millón.

Circular en el plasma como un complejo soluble (22S), combinado con globulinas gamma más pequeñas (7S) de peso molecular de 160 000.

Es un IgM o IgG con reactividad de anticuerpo para la IgG de humanos.

Se emplean varias pruebas serológicas para el factor reumatoide pero el principio básico de todas ellas es el mismo; el suero del problema se añade en diluciones seriadas a una suspensión de partículas que se han recubierto con una sustancia "sensibilizante". Las partículas pueden ser glóbulos de carnero o humano, látex (un poliestireno sintético) o Bentonita (una arcilla natural)

Estas pruebas raras vez son positivas antes del sexto mes de la enfermedad, y en los pacientes que tienen artritis reumatoide juvenil sólo en 10-20% tiñen la prueba positiva, así como también en algunas otras enfermedades (que se enuncian más adelante)

En el laboratorio efectuamos la prueba de "Reumatex" la cual es una prueba rápida para la determinación de factor reumatoide. El reactivo de látex-globulina aglutinará en presencia de un suero, adecuadamente diluido, que contenga el factor reumatoide.

#### **MATERIAL**

- Látex globulina (5ml) partículas de poliestireno) sensibilidad con gammaglobulina humana.
- Suero positivo para control (2ml)
- Suero negativo para control (2ml)
- Diluyente: solución concentrada de regulador glicina-salina, pH 8.2. Para su uso diluya 1:10, tomando un volumen de solución concentrada y 9 de agua destilada o desmineralizada.

De esta manera se obtiene una solución isotónica regulada de pH  $8.2 \pm 0.2$ .

- Una placa de vidrio con 6 divisiones ovaladas de cerámica y un cartoncillo negro
- Palillos

#### **PRUEBA CUALITATIVA EN PLACAS DE VIDRIO**

- Poner en un tubo perfectamente limpio, 1ml de la solución reguladora glicina-salina pH 8.2 (diluida 1:10). Añadir una gota del suero problema y agitar.
- Colocar una gota de la mezcla anterior en uno de los óvalos de la placa de vidrio, y el cartoncillo negro debajo, de la misma, para facilitar la lectura macroscópica.
- Agregue una gota del reactivo de látex-globulina
- Mezcle perfectamente con un palillo extendiéndolo sobre toda la superficie del ovalo.

## **CONTROLES**

**Negativo:** coloque en un ovalo una gota de suero negativo de control y agregue una gota de látex globulina. Mezcle con un palillo

**Positivo:** el mismo procedimiento anterior pero utilizando suero positivo de control.

Oscile suavemente la placa en ambos controles por uno o dos minutos y observe macroscópicamente si aparece aglutinación.

## **INTERPRETACION**

Compare el resultado del suero problema con los controles negativos y positivos.

**Negativo:** suspensión uniforme sin aglutinación visible comparable al control negativo

**Positivo Débil:** aglutinación visible por formación de pequeños agregados o solo aglutinación

parcial

**Positivo:** aglutinación visible por la formación de agregados grandes y fondo claro, comparable al control positivo.

## **PRUEBA SEMICUANTITATIVA EN PLACA DE VIDRIO**

Esta prueba deberá llevarse a cabo con suero que ha dado una reacción positiva por el método de lectura cualitativa en placa de vidrio.

- Efectuar diluciones del suero del paciente como se indica
- Colocar 9 tubos limpios en una gradilla y marcarlos
- Con una pipeta colocar 1.9ml de solución reguladora glicina-salina pH 8.2 en el tubo 1, y 1.0ml en cada uno de los tubos restantes.

- Añadir 0.1ml de suero problema al tubo 1 mezclar y transferir 1.0ml al tubo 2 y realizar la misma operación hasta llegar al tubo 9, las diluciones efectuadas son:

Tubo 1	1:20
Tubo 2	1:40
Tubo 3	1:80
Tubo 4	1:160
Tubo 5	1:320
Tubo 6	1:640
Tubo 7	1:1280
Tubo 8	1:2560
Tubo 9	1:5120

- Colocar una gota de cada una de las diluciones por separado en cada ovalo de la placa de vidrio y añadir una gota de reactivo látex-globulina y continuar el mismo procedimiento que para prueba cualitativa.

#### **INTERPRETACION**

El título del suero corresponderá a la última dilución en que se presente aglutinación del reactivo de látex-globulina

#### **POSIBLES CAUSAS DE AGLUTINACION INESPECIFICAS**

- Lectura posterior a los tres minutos de efectuar la mezcla del suero y el látex-globulina.
- Plasma con fibrina.
- Suero con alto contenido de lípidos.

Sueros provenientes de personas sanas pueden presentar reacciones falsas positivas (por lo general débiles), pero esta incidencia es baja.

También puede obtenerse reacciones positivas en enfermedades diferentes a la artritis reumatoide, por ejemplo, lupus eritematoso diseminado, cirrosis hepática,

esclerosis sistémica progresiva, lepra, sarcoidosis, etc. Y otras enfermedades inflamatorias crónicas.

#### CUESTIONARIO

¿Cuál es la importancia de determinar el factor reumatoide?

¿Cuáles son los métodos que se pueden emplear?

¿Cuáles serian las indicaciones de esta prueba?

Enuncie el cuadro clínico de la artritis reumatoide

¿En qué enfermedades también se encontrarían resultados positivos?

¿Qué reacción inmunológica se presenta en esta prueba?

## ***INMUNIDAD ESPECIFICA.***

El sistema fagocitario, con otros mecanismos, constituya la primera línea de defensa contra el ataque de agentes patógenos. Un segundo sistema, más específico y especializado contribuye a reforzar la acción defensiva del primero.

Este está integrado por los linfocitos que circulan libremente en la sangre, en los canales linfáticos en los espacios intersticiales de todos los tejidos y aquellos que se asientan en el timo, en el bazo y en los demás órganos linfoides.

Sin la existencia de este segundo, la defensa contra una segunda agresión por un mismo germen, sería exactamente igual a la primera y no habría lugar al establecimiento de un sistema específico llamado INMUNIDAD ADQUIRIDA y que protege al organismo contra la repetición de muchas de las enfermedades infecciosas.

Por otra parte, este sistema altamente especializado conserva la individualidad biológica de cada individuo, rechazando toda célula, tejido y órgano que espontáneamente trate de introducirse al organismo.

Las aves y especialmente el pollo, ha sido un animal de gran utilidad en el estudio de la inmunidad, ya que sus características anatómicas en el sistema inmunitario permiten delimitar claramente las funciones de los linfocitos T y B.

Efectivamente, en este animal, existen dos órganos linfoides claramente diferenciados: EL TIMO Y LA BURSA DE FABRICIUS. La resección del primero o timectomía, produce una marcada detección en algunos aspectos del mecanismo inmunitario del animal. Siempre y cuando se haga esta intervención después del nacimiento. Se aprecia una atrofia de gran parte del tejido linfoide en zonas especiales de los ganglios linfáticos y del bazo, conocidas como timoide pendientes. El desarrollo corporal de estos animales, se hace lento, adquiere el aspecto de animales caquécticos, muy susceptibles a un gran número de infecciones, pero que aceptan muy bien los injertos de tejidos o de los órganos.

Si por otra parte, se les reseca la BURSA, dejando intacto del ritmo, el animal rechazara los injertos, pero no podrá

producir anticuerpos y habrá atrofia en los organismos linfoides de las zonas que normalmente están bajo el influjo directo de la Bursa.

LINFOCITOS T. son células que derivan del linfoblasto o inmunoblasto de la medula ósea ante el influjo de la timopoyetina, hormona producida por las células epiteliales del timo. Son pequeños, de vida prolongada, que se miden en meses o años, circulan en la sangre y en los tejidos, ya en circulación, están listos a recibir de los macrófagos, los radicales inmunogénicos que estén preparadas para ello digerir los antígenos. (FIGURA I)

Estos radicales inmunogénicos se combinan con los receptores de la membrana del linfocito, migran combinados con estos receptores a un polo de la célula en donde se concentran y por un proceso de endocitosis penetran al citoplasma del linfocito, que llevan a su transformación en una célula muy activa con capacidad de matar gérmenes o células contra las cuales ha sido inducido a responder, al recibir la información del macrófago.

A fin de cumplir cabalmente su cometido de defensa, inicia la producción de una serie de factores con funciones específicas y que amplifican la respuesta de defensa, los más importantes son:

FACTOR DE REFERENCIA (FT).

Es una sustancia de diez mil de peso molecular, dializable capaz de producir transformación y proliferación de linfocitos situados a distancia. Su acción amplifica la reacción inmunológica de defensa, al activar un buen número de linfocitos situados en otros lugares del organismo.

LINFOTOXINA.

Es una sustancia termoestable con un peso molecular de noventa mil, capaz de destruir un gran número de células o gérmenes. Este efecto cototóxico es irreversible, y se lleva a cabo primordialmente por la inhibición en la producción de ARN a nivel del núcleo de la célula afectada.

FACTOR ANTIMIGRACION DE LOS MACROFAGOS. (MIF)

La producción de esta sustancia por parte de los linfocitos, hace que los macrófagos, que están "PATRUYANDO" el organismo se detengan en el, lugar de

ataque del antígeno y se concentran en este sitio para reforzar la acción fagocitaria de los neutrófilos.

#### FACTOR ARMADOR DE MACROFAGOS.

Hace que los macrófagos se tornen más agresivos contra determinado antígeno y se conviertan en "macrófagos bravos"

Es una molécula especial de Ig producida por estos linfocitos y que va a actuar activando el linfocito B en la producción de anticuerpos.

#### INTERFERON.

Factor que impide la replicación de los virus.

#### OTROS FACTORES.

Parece que los linfocitos T producen otros factores no suficientemente individualizados aun y que tendrían un flujo directo sobre neutrófilos, basófilos, eosinófilos, reclutando estas células a nivel del sitio de agresión de un antígeno.

Por medio de todos estos factores y especialmente lo de la linfotoxina, el linfocito T cumple su función de defensa del organismo.

El conjunto de estos mecanismos, constituye la llamada INMUNIDAD CELULAR.

En la práctica observaremos al factor inhibidor de la migración de macrófagos, con una cámara de Bloom ya preparada para MIF como material.

En dicha cámara ya montada se observará la inhibición de la migración de las células, de un extremo se coloca antígeno, y en el otro extremo no lleva nada, es el que se emplea de testigo. (Ver figura II)

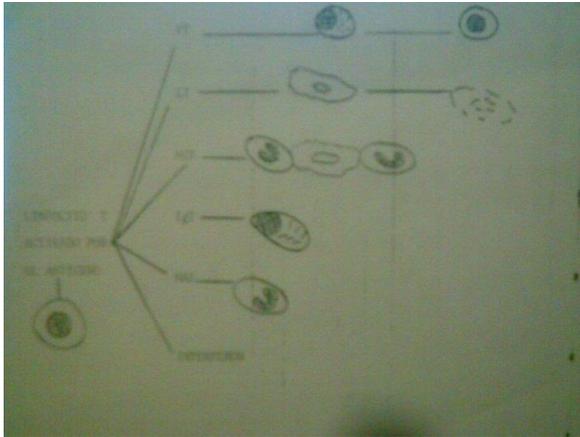


FIGURA I.

El linfocito T al ser activado por un Ag, produce: FT  
 Que activará linfocitos que estén distantes.  
 LT que puede destruir células o gérmenes. MIF  
 Que concentra los macrófagos en el sitio de agresión,  
 IgT regula el funcionamiento de los LB, MAF, hace que  
 Los macrófagos sean "agresivos". Interfirieron impide  
 Replicación de los virus intracelularmente.



## FIGURA II.

Si en una placa de Petri, con medio de cultivo, se coloca germen Ag y sobre ella un tubo de capilar con una suspensión de macrófagos, estos saldrán del tubo en forma de abanico en busca del Ag. Si se agrega en el lugar de contacto en el tubo que contiene los macrófagos y la capa de agar, el extracto de factor antimigración de los macrófago (MIF) producido por linfocitos activos inmunológicamente, los macrófagos permanecerían concentrados en ese lugar y no habrá lugar a la formación del abanico.

## CUESTIONARIO.

\*Defina MIF.

\*Describa la respuesta inmune celular

\*¿Cuál es la importancia de la respuesta inmune celular.

\*¿Qué es un linfoblasto? ¿Cuál es su importancia?

\*¿Qué son las linfocinas?

\*Describa la respuesta inmune humoral.

\*¿Cuál es la respuesta inmune humoral?

\*Defina inmunoglobulinas y cuales existen

\*Enuncie los medidores de RIC Y RIH.

## **CHOQUE ANAFILACTICO**

### **OBJETIVO**

Comprender el choque anafiláctico clínica e inmunológicamente, a partir del provocado en el animal de experimentación (cobayo).

### **INTRODUCCIÓN**

Durante varios años después del descubrimiento de las antitoxinas y de los anticuerpos antimicrobianos se creyó que las respuestas inmunes eran exclusivamente de tipo protector.

Aunque poco después se observó que estos mismos mecanismos podían ser activados por sustancias inocuas, como las proteínas de la leche, la demostración de Portier y Richet, en 1902 de que las inmunes podían ser potencialmente peligrosas constituyó una sorpresa.

Durante un estudio de la toxicidad de extractos de anemonas de mar, estos investigadores observaron que los perros tratados con una segunda inyección administrada unas semanas después de la primera, presentaban a menudo un proceso agudo que les producía la muerte al cabo de pocos minutos. Richet llamó a esta respuesta ANAFILAXIS.

Del griego... ana... contra y pyilaxis... protección.

Von Pirquet, introdujo el término de ALERGIA.

Del griego... acción alterada.

Para denominar toda respuesta anormal frente a una sustancia que fuese introducida por la exposición anterior a esa misma sustancia.

El aumento de la resistencia, que recibió el nombre de inmunidad, y el aumento de la sensibilidad, que fue llamado hipersensibilidad se consideraron como formas opuestas de alergia.

Sin embargo, con el tiempo los términos alergia e hipersensibilidad se han hecho sinónimos, ambos hacen

referencia al estado anormal inducido por un Ag, en el cual el mismo Ag, o sustancia de estructura parecida pueden inducir una reacción patológica.

GELL Y COOBS han clasificado estas reacciones alérgicas en tipos I, II, III y reacciones alérgicas IV.

<b>TIPO MECANISMO</b>	<b>MANIFESTACIONES</b>
<b>I inmediata</b>	<b>Reacciones de hipersensibilidad IgE</b>
<b>II IgG, IgM</b>	<b>Anticuerpos antitóxicos</b>
<b>III Principalmente</b>	<b>Complejo Ag - Ab</b>
<b>IgG IV células</b>	<b>Hipersensibilidad tardía debida a Linfocitos</b>

### **Sensibilizados**

Por lo que podemos decir que el choque anafiláctico corresponde a una manifestación de la hipersensibilidad tipo I, en donde se producen anticuerpos de la clase IgE, se fijan a las células cebadas y basófilos por medio del fragmento Fc.

La unión con el anticuerpo específico induce la degranulación de las células con la liberación consecuente de diversos mediadores químicos que provocan alteraciones vasculares.

Se ha ido detectando un número cada vez mayor de mediadores químicos, los mediadores principales desprendidos inicialmente de los basófilos y de las células cebadas son histamina, factor quimiotáctico eosinófilo (FQE), sustancia de reacción lenta de la anafilaxis (SRL-A) factor de activación de plaquetas (FAP), heparina. Otras reacciones secundarias subsecuentes, celulares y tisulares, llevan la liberación de otros mediadores que incluyen:

Prostaglandina 5- hidroxitriptamina (serotonina) Cininas

Para provocar el choque anafiláctico en el cobayo, se procede a inyectar un Ag (inyección sensibilizante).

La inyección posterior de la misma sustancia, producirá el choque y se conoce como inyección de desafío o de choque.

## **DESARROLLO**

A cobayos nuevos de 200 - 300 gr. de peso administrarles la dosis sensibilizante de antígeno; 0.1 ml. de ovoalbúmina al 10%.

Esperar 14 días

Administrar la dosis de choque, mediante inyección intracardiaca de 0.1 ml. de ovoalbúmina a 10%.

La misma dosis de choque aplicarla a un cobayo no sensibilizado (de control)

Observar a los animales y medir el tiempo de aparición de los síntomas y de la muerte en dado caso

Los síntomas que generalmente se observan son:

- Erizamiento de pelo de la cabeza y espalda
- Prurito en la nariz
- Estornudos
- Tos
- Taquipnea
- Bradipnea
- Respiración espasmódica
- Defecación
- Micción
- Convulsiones
- Muerte

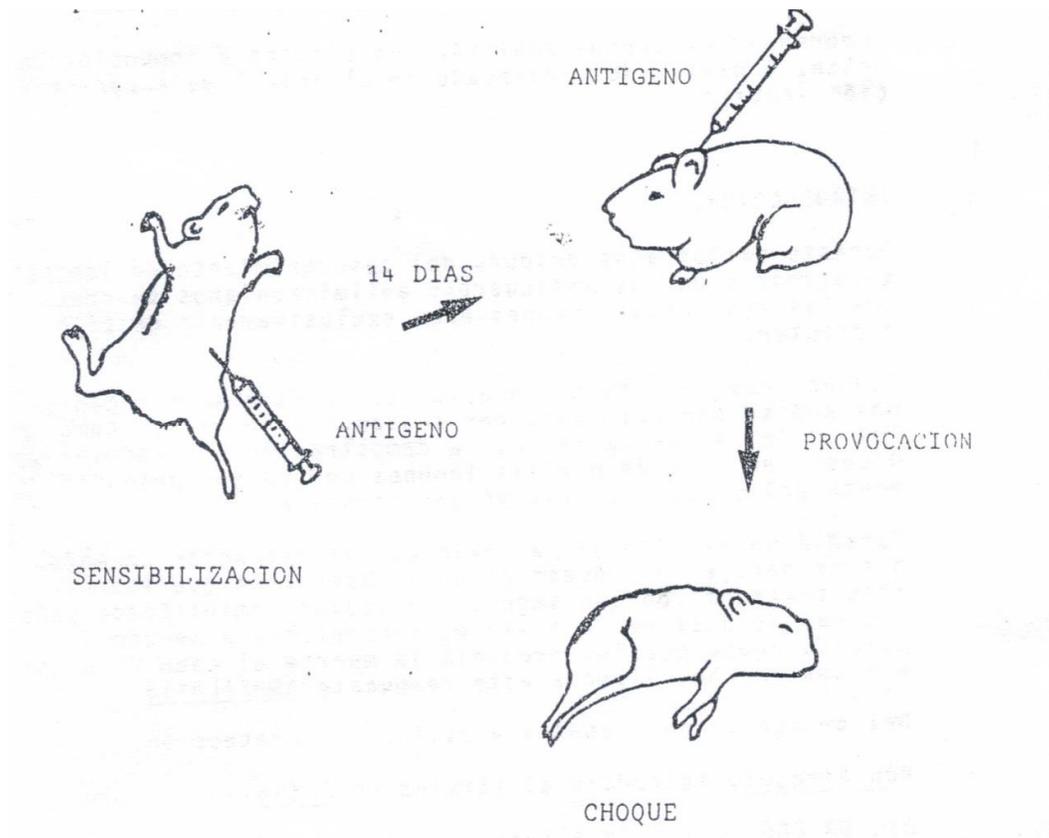
Lo anterior se desarrolla en poco tiempo (por lo general 8-12 minutos).

La inyección intraperitoneal da síntomas menos severos

## AUTOPSIA DE LOS ANIMALES

Se estudiara de la misma forma al testigo, los cambios mas importantes son:

- Congestión intestinal
- Aumento del peristaltismo intestinal
- Hemorragia diafragmática y vísceras
- Característico enfisema pulmonar (órgano de choque)
- El corazón puede seguir latiendo a pesar de la asfixia



Dos semanas después de la sensibilización activa, provocación con el mismo antígeno que ocasiona una reacción anafiláctica y la muerte.

## CUESTIONARIO

1. Mencione la clasificación del fenómeno de hipersensibilidad
2. ¿Porqué inmunoglobulina está mediada la hipersensibilidad inmediata?
3. ¿Qué determina la prueba de shick, y cuál es su importancia?
4. Enuncie y explique como actúan los mediadores químicos (mínimo 5)
5. Explique ampliamente todas las características de IgE
6. ¿Qué importancia tienen para el medico este tipo de reacciones?
7. ¿Qué cambios presento el cobayo de control y por que?
8. Enuncie el cuadro clínico del choque anafiláctico
9. Enumere sustancias que puedan desencadenar un choque anafiláctico en el humano.

## **BIBLIOGRAFIA**

W. Jhon Spicer. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. El SEvier. Ámsterdam Barcelona España. 2009.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiologia medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 25ª ed. Mexico; Mc Graw-Hill; 2011.

Swapan k Noth. Microbiología Base de solución de problemas. El SEvier. España. 2007.

Taylor da Cunha Mello, Maria Lucia Dora. Guía de Bacteriologia. MC Graw Hill. Mexico D.F. 2006.

Hernández Llop Alina. Microbiología y Parasitología medica. Editorial Ciencias medicas. El Vedado la Habana Cuba. 2006.

Keith Struthers J. Westra P. Bacteriologia clínica. Masson. Barcelona España 2005.

Morta Negroni. Microbiología y Gia practica. Panamericana. 3º edición. Buenos Aires Bogotá. 2004.

Jose Trinidad Sanchez Vega. Fundamentos de microbiología y parasitología medica. Mendez editores. Mexoco D.F 2003.

Gonzales Figueroa. Microbiología Bucal. Mendez editores. Tercera edición. Mexico Guadalajara Facultad de Odontologia.

J.A García Rodríguez. Compendio de Microbiología Medica. Harcurt. Barcelona Madril España. 2000.

Joce Angeles Rodrigues. Microbiología medica. Har Court. Barcelona España. Noviembre 1998.

Dr. Jurge Tay Zavala. Micrologia y paracitologia medica. Mendez editores. Mexico DF UNAM. 1993.

Evelio J: Perea Perez. Enfermedades infeccionsas y microbiología clínica. Doima. Calle del Rio España. 1992

- Brooks, F. Geo. MICROBIOLOGÌA MÈDICA DE JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG 19a Edición Editorial EL Manual Moderno, México 2008
- Fainboim, Leonardo INTRODUCCIÒN A LA INMUNOLOGÌA HUMANA 5a Edición  
Editorial Médica Panamericana Buenos Aires  
Argentina, 2005
- Weir, M.D. INMUNOLOGÍA 1a Edición Editorial El Manual Moderno México, D.F. 1990
- Rojas Espinoza, Oscar INMUNOLOGÌA 2a Edición  
Editorial Medica Panamericana Mèxico D.F. 2001
- Salinas Carmona Mario César LA INMUNOLOGÌA EN LA SALUD Y LA ENFERMEDAD 1a Edición Editorial Médica Panamericana México, D.F. 2010
- Parham, Peter INMUNOLOGÌA 2a Edición Editorial Médica Panamericana Buenos Aires  
Argentina, 2006
- Steward, Stell INMUNOLOGÍA, INMUNOPATOLOGÍA E

INMUNIDAD 2ª Edición Editorial Harla

- Fudenberg, Hugh INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2ª Edición Editorial El Manual Moderno México México, D.F. 1982
  
- Bellanti, Joseph A. INMUNOLOGÍA 2ª Edición Editorial El Manual Moderno México, 1981
  
- Crup, A. Marcus MANUAL DE DIAGNOSTICO CLINICO Y DE LABORATORIO Editorial EL Manual Moderno México, 1986
  
- Luis Martin, Abreu FUNDAMENTOS DEL DIAGNÓSTICO : LAS BASES FISIOPATOLÓGICAS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS FENÓMENOS CLÍNICOS 11ª Edición Editores Méndez México, D.F: 2008
  
- Philip l. Carpentier INMUNOLOGÍA Y SEROLOGÍA 2ª Edición Editorial La prensa medica Mexicana México, 1982
  
- Fauci Anthony S. PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA 17ª Edición Edityorial McGraw Hill Barcelona España 2004