



**Manual de Prácticas para el Laboratorio de  
Microbiología II Medicina**

**Segundo Año**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Médico Cirujano

Manual de Prácticas aprobado por el Comité Académico de  
Carrera el día 12 septiembre de 2013.

## DIRECTORIO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

<b>Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez</b>	Director
<b>Dr. Vicente J. Hernández Abad</b>	Secretario General
<b>M. en C. Faustino López Barrera</b>	Secretario de Planeación
<b>Dra. Rosalinda Escalante Pliego</b>	Secretaria de Integración, Promoción y Desarrollo Académico
<b>Dr. Omar Viveros Talavera</b>	Jefe de la División de Ciencias de la Salud y del Comportamiento

## DIRECTORIO DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO

<b>Dr. Noé Contreras González</b>	Jefe de la Carrera de Médico Cirujano
<b>Mtra. María Luisa Ponce López</b>	Secretaria Técnica
<b>M. C. Patricia Dolores Delgado Jacobo</b>	Coordinadora de Ciencias Biomédicas
<b>M. C. Irma Araceli Aburto López</b>	Coordinadora del Ciencias de la Salud Pública
<b>M. C. Rocío Paniagua Hernández</b>	Coordinadora de Ciencias Clínicas
<b>Mtra. María del Carmen García Ríos</b>	Coordinadora de Área Terminal

**AUTORES (1988):**

Q.F.B. Luz Margarita Chávez Martínez

C.D. Ana María Fernández Presas

M.C. José Fernando Arellano Cobián.

**ELABORADO Y ACTUALIZADO POR:**

C. D. Yolanda García Méndez

M. en C. Evangelina López Nieto

Q.F.B. Claudia Martínez Carrera

Q.F.B. Francisco Javier Martínez Parada

M.C. Rosa Irene Mondragón Valdés.

**REVISADO POR:**

C. D. Yolanda García Méndez

M. en C. Evangelina López Nieto

Q.F.B. Claudia Martínez Carrera

Q.F.B. Francisco Javier Martínez Parada

M.C. Rosa Irene Mondragón Valdés.

Coordinación del Manual de Prácticas por la M.C. Patricia Dolores Delgado  
Jacobó . Coordinadora del Área de Ciencias Biomédicas.

## **PRESENTACION.**

El plan de estudios de la carrera Médico Cirujano de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, establece un perfil profesional en el que la aplicación de los conocimientos de las ciencias básicas biológicas, clínicas darán solución a los problemas de Salud de la población mediante su diagnóstico oportuno. Para ello el área de Microbiología en su fase práctica aborda los métodos de diagnóstico de laboratorio y serológicos de acuerdo a cada modulo para la identificación y diagnostico de las enfermedades que se ven en cada uno de los módulos: Piel y Musculo Esquelético, Aparato Respiratorio, Sistema Cardiovascular, Aparato Digestivo, Aparato Urinario, Sistema Nervioso, Órgano de los Sentidos y Sistema Endocrino. Integrando los conocimientos teórico . prácticos, logrando un carácter multidisciplinario de la enseñanza.

Esta área es fundamental en la formación profesional del estudiante de Medicina ya que sus contenidos abordan agentes etiológicos de las enfermedades infectocontagiosas, características de estos agentes, y sus métodos de diagnóstico, mediante estudios de laboratorio y pruebas de identificación, con el propósito de analizar, comprender y aplicar los conocimientos y habilidades adquiridos en esta área, dando respuesta a la identificación de los principales agentes microbianos etiológicos de algunas enfermedades que afectan a la comunidad, involucrando al estudiante en formación.

Este manual de practicas de laboratorio de Microbiología 2º año es una herramienta pedagógica que auxilia a los profesores y alumnos en el proceso enseñanza aprendizaje, contribuyendo en la formación del medico cirujano congruente al perfil profesional establecido por la carrera.

INDICE	PAG.
Organización, Normas y Forma de Trabajo en Laboratorio.	8
Calendario de Prácticas	13
Módulo Piel y Músculo Esquelético	15
1 Cultivo y Aislamiento de Estafilococos en Muestra de Piel	16
2 Diferenciación de Cepas de Estafilococos Patógenas de las no Patógenas	20
3 Micosis Cutáneas Superficiales por la Técnica de Microcultivo	23
4 Toma de Muestra y Aislamiento de Héridas Infechadas	28
5 Observación de Leishmania mexicana	31
Módulo Aparato Respiratorio	33
6 Estreptococo y Neumococo en el Aparato respiratorio	34
7 Exudado Faringeo y Nasal	38
8 Identificación de Microorganismos de Exudado Faringeo y Nasal	43
9 Mycobacterium tuberculosis	47
Módulo Aparato Cardiovascular	51
10 Observación de Preparaciones de Plasmodium	52
11 Observación de Preparaciones de Tripanosoma	54
12 Hemocultivo	57

13 Resiembra en Medios Selectivos	61
14 Identificación de Bacterias por Pruebas Bioquímicas	64
15 Reacciones Febriles	66
Módulo Aparato Digestivo	71
16 Cultivo de Enterobacterias	72
17 Coprocultivo	75
18 Identificación de Bacterias de Coprocultivo	77
19 Coproparasitoscopico	79
20 Diagnóstico de Amibiasis	83
Módulo Aparato Urogenital	86
21 Diagnóstico de Sífilis	87
22 Urocultivo	90
23 Identificación de Bacterias en Orina	93
24 Examen General de Orina (Sedimento Urinario)	95
25 Cultivo de Secreciones Vaginales y Uretrales	99
Módulo Sistema Nervioso y Órgano de los Sentidos	103
26 Meningitis Bacteriana	104
27 Meningitis Viral	107
28 Observación de Cisticerco cellulosae	109
29 Cultivo de Clostridium	112
30 Identificación Género Clostridium	116
Bibliografía	118
Evaluación de Laboratorio	119

## **ORGANIZACIÓN, NORMAS Y FORMA DE TRABAJO EN EL LABORATORIO**

- **Formación de los equipos de trabajo**

Al inicio de cada año escolar, los alumnos se distribuirán en equipos de trabajo los cuales se formarán de acuerdo a los siguientes criterios:

- A. Se formarán equipos de trabajo de acuerdo al número de mesas (5).
- B. Los equipos se formarán con los alumnos inscritos. Los alumnos que se den de alta posteriormente, serán asignados a un equipo determinado por el profesor titular.
- C. Una vez formados los equipos no se aceptarán cambios de integrantes.
- D. Cualquier imprevisto será resuelto por los profesores.
- E. Cada equipo de trabajo será asesorado por un profesor.

- **Material necesario para el trabajo en laboratorio**

La lista de materiales para un buen desarrollo de las prácticas de laboratorio se enlista a continuación. Cabe señalar que este material es obligatorio y debe tenerse siempre disponible en cada práctica.

### **Material individual**

- Bata blanca de laboratorio
- Manual de prácticas

### **Material por equipo**

1. Marcador de tinta indeleble y lápiz graso
2. Cinta maskin tape
3. Jeringas desechables de 5 y 3 mL
4. Benzal u otro antiséptico (un galón)



5. Asas y porta-asas bacteriológicas
6. Algodón
7. Cerillos o encendedor
8. Porta y cubre objetos
9. Papel seda
10. Jabón líquido
11. Toallas sanitas
12. Franela
13. Candado
14. Cubre-bocas y guantes desechables

- **Normas de trabajo del Laboratorio de Microbiología**

- Para el trabajo dentro del laboratorio es obligatorio el uso de bata, la cual deberá estar correctamente abotonada. No se permitirá el trabajo e inclusive la permanencia de los alumnos en el laboratorio sin bata, durante las sesiones de trabajo.
- La tolerancia para el ingreso a la clase de laboratorio será de 10 minutos, después de este tiempo el alumno podrá ingresar a la clase, sin embargo, tendrá inasistencia.
- Está estrictamente prohibido fumar e ingerir alimentos dentro del laboratorio.
- Cada equipo es responsable de su material, la limpieza del mismo y de la mesa.
- El material de laboratorio será prestado mediante un vale y credencial vigente a cada equipo.
- La credencial y vale serán devueltos, siempre y cuando no exista ningún adeudo de material.
- La puerta siempre permanecerá cerrada mientras se lleva a cabo la práctica.
- Quedan estrictamente prohibidas las visitas dentro del laboratorio.

- Al inicio del año se programarán las sesiones prácticas, seminarios y exámenes finales, de acuerdo con el calendario oficial vigente. Se publicará en un lugar visible.
- En caso de suspensión de algunas de las sesiones por una causa de fuerza mayor, esta será reprogramada por los profesores.
- Ningún alumno podrá retirarse si la sesión práctica no ha concluido. Sólo con autorización de algún profesor.
- Cualquier imprevisto será resuelto por los profesores de laboratorio.
- No dejar que los alumnos trabajen solo en el laboratorio.
- Favor de indicar a los alumnos que deben desocupar y limpiar sus gavetas al final del curso.

- **Mecanismos de evaluación**

La evaluación de cada módulo se realizará tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Examen previo a cada práctica
- Seminario
- Trabajo de laboratorio
- Informe de práctica
- Examen final de módulo

Bajo las siguientes condiciones:

- A. La asistencia es obligatoria, para tener derecho a la calificación el alumno deberá tener como mínimo un 80% de la misma.
- B. El examen previo a la práctica se tomará como asistencia.
- C. El alumno que no asista a la práctica, no tendrá derecho a entregar informe de la misma.
- D. El alumno deberá mostrar interés, cooperación y conocimientos durante el desarrollo de la práctica. Este punto será evaluado por los profesores.

- E. Para obtener calificación aprobatoria, el alumno deberá tener todos los criterios de evaluación con calificación aprobatoria.
- F. Dar a conocer oportunamente a los alumnos las calificaciones de los exámenes previos a cada práctica y finales de cada módulo.

- **Programación de prácticas**

El programa de prácticas de todo el año se les dará a conocer a los alumnos el primer día de clases y aparecerá publicado dentro del aula en un lugar visible. Es importante que lo revisen porque este podría ser diferente al del manual de prácticas.

## **GUÍAS DE TRABAJO**

### **1. Guía para la elaboración de informes**

- Título de la práctica
- Introducción:  
En la introducción debe redactarse la presentación del trabajo, es decir, de manera breve explicar que conocimientos adquirirá al leer el informe.
- Marco teórico:  
Se exponen los conceptos y fundamentos de la práctica, encontrados en los libros.
- Objetivo (s):  
El objetivo deberá responder a tres preguntas fundamentales: ¿Qué se va a hacer? ¿Cómo se va a hacer? ¿Para qué se va a hacer?
- Metodología:  
Materiales y procedimiento, para este último se podrá utilizar un diagrama de flujo.
- Resultados.
- Conclusiones:

Las conclusiones deberán ser breves y deberán redactarse con respecto a los objetivos. No son válidas las conclusiones como %Se cumplió con el objetivo+.

- Bibliografía.

## **2. Guía para la presentación de seminario**

El seminario deberá contener los siguientes puntos:

- Título de la práctica
- Introducción
- Marco teórico
- Objetivos
- Material y método
- Indicaciones para leer o interpretar resultados

Todos los puntos deberán tratarse brevemente (15 minutos).

Se deberá utilizar proyector (cañón).

El tema deberá ser dominado por todos los integrantes del equipo, sean o no expositores.

Al final de cada exposición habrá una sesión de preguntas, donde, tanto alumnos como profesores harán las mismas.

La evaluación correrá a cargo de todos los profesores.

## CALENDARIO DE PRACTICAS DE LABORATORIO

### MÓDULO PIEL Y MÚSCULO ESQUELÉTICO.

NÚM. PRACTICA    TITULO

	<b>Presentación y organización de equipos de trabajo.</b>
1	Cultivo y Aislamiento de Estafilococos de muestra de piel.
2	Diferenciación de cepas de Estafilococos patógenas de las no patógenas.
3	Micosis cutáneas o superficiales por la técnica de microcultivo.
3 y 4	Observación de microcultivo. (continuación). Toma de muestra y aislamiento de heridas infectadas.
5	Observación de Leishmania mexicana.
	Examen Final de Módulo.

### MÓDULO APARATO RESPIRATORIO.

6	Estreptococo y Neumococo en el Aparato Respiratorio.
7	Exudado Faringeo y Nasal.
8	Identificación de microorganismos del Exudado Faringeo y Nasal.
9	Mycobacterium tuberculosis. Examen Final de Módulo.

### MÓDULO APARATO CARDIOVASCULAR

10	Observación de Plasmodium.
11	Observación de Trypanosoma.
12	Hemocultivo
13	Resiembra en medios selectivos.
14	Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas.
15	Reacciones Febriles.
	Examen Final de Modulo

## MÓDULO DIGESTIVO

16	Cultivo de Enterobacterias.
17	Coprocultivo
18	Identificación de bacterias en Coprocultivo
19	Coproparasitoscopico
20	Diagnóstico de Amibiasis
	Examen Final de Modulo

## MÓDULO UROGENITAL

21	Diagnóstico de Sífilis (VDRL).
22 Y 23	Urocultivo. Examen General de Orina (Sedimento Urinario).
24	Identificación de Bacterias en Orina.
25	Cultivo Secreciones Uretrales y Vaginales. Examen Final de Módulo

## MÓDULO SISTEMA NERVIOSO Y ORGANO DE LOS SENTIDOS.

26	Meningitis bacteriana
27	Meningitis viral.
28	Observación de Cisticerco cellulosae
29	Cultivo de Clostridium
30	Identificación del género Clostridium
	Examen Final de Módulo

## MÓDULO SISTEMA ENDÓCRINO.

	Pedir articulo en ingles para Seminario Tolerancia y Autoinmunidad. Diabetes Mellitus 1, Enf. Hashimoto, Enf. Graves Basedow y Enf. de A
	Presentación de articulo y selección de este.
	Entrega de traducción y Seminario
	Seminario y Examen Final de Módulo.

# **PIEL Y MÚSCULO ESQUELÉTICO**

## PRÁCTICA NÚM. 1

### CULTIVO Y AISLAMIENTO DE ESTAFILOCOCOS DE MUESTRA DE PIEL

#### OBJETIVO

- Estudiar las características de los microorganismos del grupo de los Staphilococcus, y su relación con su patogenia en la piel.
- Conocer los diferentes medios de cultivo para su aislamiento.

#### INTRODUCCIÓN

Los Staphilococcus son microorganismos esféricos, ligeramente menores a 1µm de diámetro. En frotis, teñidos a partir de medios de cultivo sólidos, se agrupan característicamente en grumos o racimos de forma irregular, son grampositivos.

#### CLASIFICACIÓN

1.- De acuerdo a la producción de pigmentos:

Staph. aureus (dorado)

Staph. citreus (amarillo limón)

Staph. albus (blanco)

2.- De acuerdo a la prueba de la coagulasa:

Staph. aureus, que es coagulasa positiva y patógena

Staph. epidermidis, que es coagulasa negativa y no patógena

Generalmente la clasificación más utilizada es la 2, ya que tiene la ventaja de indicar si el organismo en estudio es patógeno o no.



## **PROPIEDADES GENERALES:**

Tinción de Gram: Cocos grampositivos dispuestos en racimos.

Afinidad al oxígeno: Son aerobios y anaerobios facultativos.

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

Lactosa: Su producción no es significativa.

Indol: Su producción no es significativa.

Cápsula: Carecen de cápsula.

Movilidad: No son móviles

Esporas: Carecen de esporas.

## **CULTIVO**

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

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

## **INFECCIONES Y ENFERMEDADES EN EL HOMBRE:**

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* se caracterizan por la localización, supuración y necrosis tisular con cicatrización resultante. La lesión más frecuente, el furúnculo, actúa a menudo como fuente de diseminación hematológica de microorganismos con producción subsiguiente de bacteremia y de enfermedades como osteomielitis y neumonía. La colonización de los estafilococos sobre los tegumentos queda restringida en condiciones normales por la antibiosis que ejercen los miembros de la flora normal. Sin embargo, después de tratamiento intensivo con antibióticos de amplio espectro, muchos miembros de la flora normal del intestino disminuyen en número, pudiendo perder su antagonismo, lo que propicia colonización extensa de *Staph. aureus*. En estos casos puede producirse enterocolitis pseudomembranosa grave y, a veces mortal, que según informes a menudo depende de la presencia de cepas productoras de enterotoxina.

### **MATERIAL**

1 caja de agar sangre.  
1 caja de agar S-110.  
1 caja de agar sal manitol.  
Mechero.  
Asa bacteriológica.  
Hisopos estériles.  
Portaobjetos.  
Cepa de *Staph. aureus*.  
Colorantes para Gram.  
Microscopio.  
Gradilla.

### **PROCEDIMIENTO.**

- 1.- Dividir las cajas con medio de cultivo en dos, con un lápiz graso.
- 2.- En una de las secciones sembrar la cepa de *Staph. aureus* por estria cruzada, en cada una de las cajas de medio de cultivo.
- 3.- Con un hisopo estéril, tomar la muestra de piel (del ala de la nariz o de la frente, donde se presenten lesiones o acné), oprimiendo suavemente.
- 4.- Descargar la muestra en la otra sección de las cajas de agar (agar sangre, agar S-110 y agar sal manitol).

- 5.- Efectuar la tinción de Gram tanto de la cepa, como de la muestra tomada de la nariz.
- 6.- Como precaución quemar el hisopo utilizado.
- 7.- Incubar las cajas de agar sangre y retirar de incubación a las 24 horas.
- 8.- Leer morfología colonial e interpretar resultados.
- 9.- Guardar las cajas con cultivo en el refrigerador, para hacer la identificación bioquímica de estafilococos (próxima sesión).

## **CUESTIONARIO**

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

## **PRACTICA NÚM. 2 DIFERENCIACIÓN DE LAS CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS PATÓGENOS DE LAS NO PATÓGENAS**

### **OBJETIVO**

- Establecer las características diferenciales de las cepas patógenas de Staphylococcus (Staphylococcus aureus coagulasa positivo) de los no patógenos (Staphylococcus epidermidis coagulasa negativo).

### **INTRODUCCIÓN**

Los microorganismos poseen varios factores que les permiten favorecer las condiciones de infección y aumentar su patogenicidad. En el caso de los Staphylococcus, utilizan su capacidad de coagular el plasma para la formación de coágulos en la corriente sanguínea, hecho que les protege de la fagocitosis en el lugar de infectación.

La mayoría de las cepas patógenas producen enzimas como la fosfatasa, DNAsa, Leucocidina, Lecitinasa, hemolisinas y enterotoxinas.

La fermentación de carbohidratos la efectúan la mayoría de las cepas con producción de ácido láctico, pero no de gas. Las cepas patógenas fermentan el manitol tanto en condiciones de anaerobiosis como de aerobiosis. Son proteolíticas (licuefacción de gelatina) y reducen el telurito con producción de colonias negro azabache en medios con ese reactivo.

Sus condiciones de crecimiento no son exigentes, son anaerobios - facultativos y crecen en una temperatura óptima de 37°C. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; en leche, agua, aguas negras, etc.

Todas las propiedades anteriores confieren a los microorganismos del grupo de los staphylococcus una potencia invasiva importante, encontrándose en diferentes infecciones como: la paroniquia, la piemia, el impétigo, la furunculosis, etc.

## CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LOS STAPHYLOCOCUS

<b>Característica</b>	<b>S.aureus</b>	<b>S.epidermidis</b>
Pigmento de colonias en agar S-110.	amarilla	blanca
- Producción de Enzimas:		
Coagulase	+	-
Hemolisinas	+	-
Lipasa	+	-
DNA-asa	+	-
Catalasa	+	+
Fosfatasa	+	
- Fermentación de Azúcares:		
Fermentación de manitol	+	-
Fermentación de glucosa en anaerobiosis	+	-
Licuefacción de gelatina (solo algunas cepas)	+	-

### MATERIAL

- 2 tubos con plasma citratado 1:4.
- 2 tubos con caldo manitol rojo de fenol con campana de Durham.
- 2 tubos con caldo glucosa rojo de fenol con campana de Durham.
- 2 tubos con caldo de glucosa rojo de fenol con campana de Durham y sello de Vas-par.
- 2 tubos con gelatina bacteriológica.
- Microscopio.
- Mechero.
- Asa bacteriológica.
- Peróxido de hidrógeno.
- Colorantes para Gram.
- Porta objetos.

## PROCEDIMIENTO

- 1.- De los cultivos de la sesión anterior, realizar tinción de Gram.
- 2.- Sembrar los tubos con caldo a partir de los medios de agar S-110, escogiendo las colonias más típicas y etiquetando con cuidado un juego de medios para las colonias blancas y otro para las colonias amarillas. (cepa pura y muestra de piel).
- 3.- Sembrar el tubo de gelatina por picadura y dejar incubar a temperatura ambiente por 24 hrs. Observar si hay licuefacción.
- 4.- Incubar todos los medios de cultivo a 37°C durante 24 hrs.

### **Prueba de la Coagulasa.**

5.- La prueba de la coagulase se efectúa al tomar una asada de la muestra e inocular por suspensión en el tubo de plasma citratado, incubar a 37°C durante 4, 8 y 24 hrs., observar la formación de coágulo. Si en este tiempo no se ha formado reportar la prueba como negativa.

### **Prueba de la Catalasa.**

6.- Para efectuar la prueba de la catalasa, tomar una asada de la muestra y suspender en una gota de agua sobre un porta objetos, adicionarle una o dos gotas de peróxido de hidrógeno y esperar la formación inmediata de burbujas, de ser así reportar la prueba como positiva.

7.- Hacer una tabla donde se indiquen todos los resultados.

8.- Interpretar resultados.

## CUESTIONARIO

- 1.- Describa la intoxicación alimenticia estafilocócica.
- 2.- Mencione las toxinas producidas por estafilococos.
- 3.- ¿Cuál es la importancia de realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos para estafilococos?
- 4.- Mencione función e importancia de la Proteína A estafilocócica.

## **PRACTICA NÚM. 3**

### **MICOSIS CUTANEAS O SUPERFICIALES POR LA TÉCNICA DE MICROCULTIVO**

#### **OBJETIVO**

- Conocer las características mediante un microcultivo de los hongos causantes de las micosis superficiales y su importancia médica.

#### **INTRODUCCIÓN**

Se considera como micosis superficiales a las que afectan a la piel, pelo y uñas, siendo generalmente infecciones crónicas y resistentes al tratamiento, pero rara vez afectan la salud general del paciente.

Los dermatofitos son un grupo de hongos íntimamente relacionados, actualmente están clasificados en tres especies: Epidermophyton, Microsporum y Trichophyton. Infectan solamente los tejidos superficiales queratinizados, no invaden tejidos más profundos, y no se diseminan.

El aislamiento y diagnóstico de las micosis cutáneas o superficiales relativamente simple, los fragmentos patológicos de piel y uñas de las áreas afectadas se emplean para hacer el aislamiento del agente causal.

La parte infectada del pelo muestra fluorescencia cuando se ilumina con luz de Wodd (una lámpara de luz ultra violeta).

Los pelos infectados, sacados del área interesada o escamas de la piel o uñas enfermas, se colocan en solución de hidróxido de potasio del 10 al 20% bajo un cubreobjetos y se examinan al microscopio. Las hifas ramificadas de Epidermophyton se encuentran generalmente en el material procedente de piel o uñas, mientras se ven masas de esporas, como se des criben anteriormente, formando un mosaico alrededor de la base del pelo en las infecciones por Microsporum o dispuestas en hileras paralelas de esporas, dentro o fuera del pelo en el caso de infecciones por Trichophyton.

La identificación definitiva de los dermatofitos se hace de ordinario por cultivos incubados durante dos o tres semanas a temperatura ambiente en medio de Sabouraud, al que se han agregado 10 unidades de penicilina y de 30 a 40 unidades de estreptomycin por mililitro, para inhibir el crecimiento de bacterias.

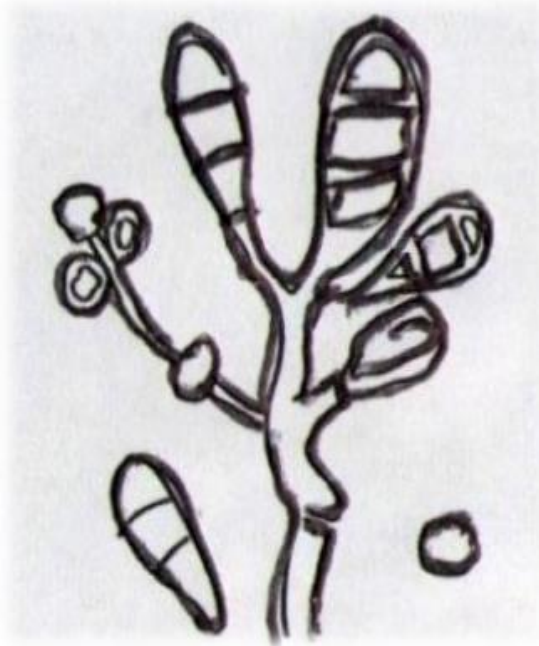
Las infecciones causadas por los Dematofitos son muy variadas y -se clasifican de acuerdo al agente causal y al sitio donde afectan, en seguida se muestra un cuadro indicando las más comunes:

### Micosis Superficiales

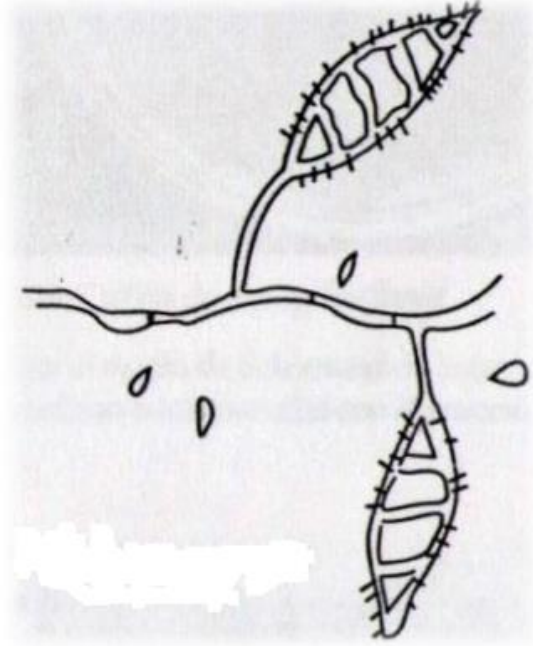
Micosis superficiales		
Nombre de la enfermedad	Naturaleza de la infección	Principales hongos causales
<b>Dermatofitosis</b>	Tiña del cuero cabelludo	Microsporium audouini Microsporium gypseum Microsporium canis Trichophyton tonsurans Trichophyton violaceum
<b>Tinea barbae</b>	Tiña de la barba	Varias especies de Trichophyton y Microsporium
<b>Favus</b>	Infección micótica crónica, generalmente del cuero cabelludo, con costras amarillas	Trichophyton schoenleini Trichophyton violaceum Microsporium gypseum
<b>Tinea corporis</b>	Tiña de la piel lampiña del cuerpo	Varias especies de Trichophyton y Microsporium
<b>Tinea cruris</b>	Tiña de la ingle (eczema marginado; dermatitis dhobie)	Epidermophyton floccosum, especies de Trichophyton
<b>Tinea pedis</b>	Infección micótica de los pies ("pies de atleta") (tiña de los pies)	Epidermophyton floccosum. Trichophyton mentagrophytes Trichophyton rubrum
<b>Tinea unguim</b>	Infección micótica crónica de las uñas de pies y manos	Especies de Trichophyton
<b>Tinea versicolor</b>	Infección micótica crónica de las cepas más superficiales de la piel	Malassezia furfur
<b>Erythrasma</b>	Infección micótica superficial de la piel generalmente en ingle o axilas	Nocardia minutissima
<b>Otomycosis</b>	Infección subaguda o crónica del conducto auditivo externo	Aspergillus y otros hongos comunes
<b>Chromoblastomycosis</b>	Infección crónica de la piel y vasos linfáticos, generalmente de las piernas, caracterizada por nódulos grandes, de diversa coloración y verrugas semejantes a la coliflor	Fonsecaea (anteriormente llamada Hormodendrum) pdrosoi y hongos relacionados



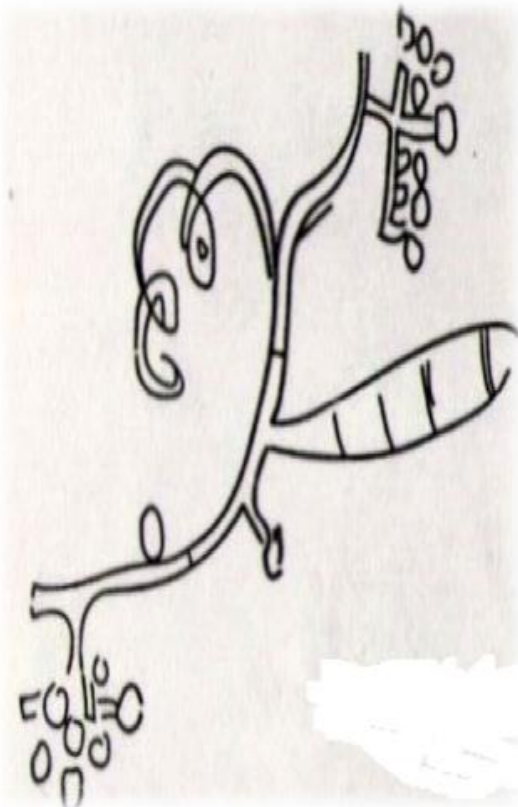
OBSERVACION MICROSCÓPICA DE ALGUNOS DERMATOFITOS



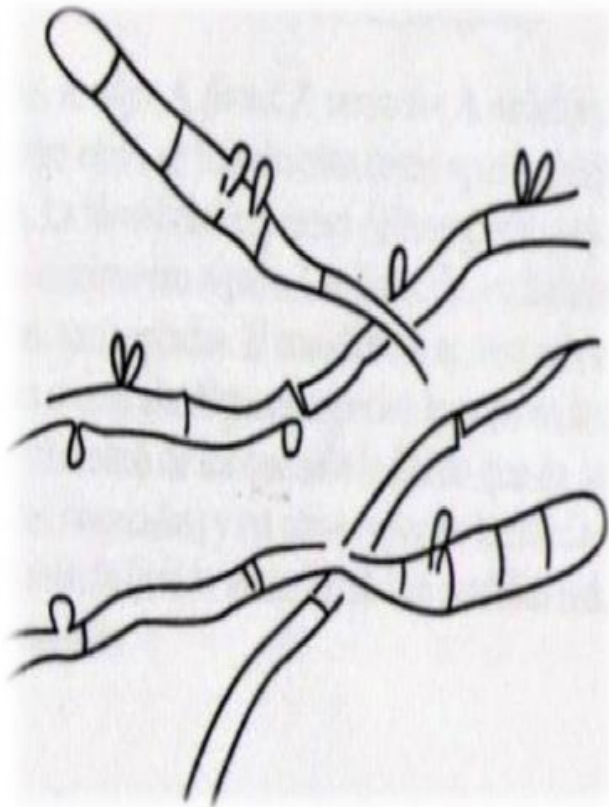
*Epidermophyton floccosum*



*Microsporum canis*



*Trichophyton mentagrophytes*



*Trichophyton rubrum*

## **MATERIAL**

- 1 caja Petri esterilizada con un triángulo de varilla de vidrio, un porta y un cubre objetos en el interior
  
- 1 Bisturi
  - Asa bacteriológica
  - Mechero
  
- 1 Caja con medio de cultivo (Sabouraud o PDA)
  - Agua glicerinada estéril
  - Cepas de hongos en tubo (Dermatofitos)

## **PROCEDIMIENTO**

- 1.- El medio de cultivo contenido en la caja Petri, se corta con ayuda del bisturí en forma de cuadrícula de 1 cm. de lado, quedando así los bloques de cultivo donde se sembrarán los hongos.
  
- 2.- Cocar con mucho cuidado el cuadro de agar en la caja de petri, sobre el porta objetos. Tener precaución para evitar contaminantes.
  
- 3.- Con el asa bacteriológica sembrar los hongos tomando una pequeña porción de la cepa, la punta del asa deberá estar doblada en ángulo recto para sembrar por picadura en cada uno de los lados del agar (solicitar instrucciones al Profesor).
  
- 4.- Colocar sobre el agar el cubre objetos y revisar que el conjunto quede perfectamente sobre el triángulo de vidrio.
  
- 5.- Adicionar el fondo de la caja de petri agua glicerinada y tapar.
  
- 6.- Dejar incubar durante 7 días a temperatura ambiente.

### Proxima sesion.

- 7.- Teñir y observar al microscopio.
  
- 8.- Observar características macroscópicas de Dermatofitos.

## **OBSERVACIÓN DEL MICROCULTIVO**

### **MATERIAL**

1 Microcultivo de la práctica anterior  
1 Pinzas de disección  
1 Frasco gotero con Lactofenol azul de algodón  
Porta Objetos  
Aza bacteriológica  
Mechero

### **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Con ayuda de las pinzas de disección, separar la laminilla cubre-objetos del microcultivo, con el bisturí o aguja de disección desechar el bloque de medio de cultivo.
- 2.- Colocar una gota de azul de algodón sobre un porta objetos limpio y colocar sobre la gota del colorante el cubre-objetos con la muestra del hongo.
- 3.- Observar las estructuras reproductivas del hongo con objetivo de 10X y 40X.
- 4.- Interpretar sus observaciones.

### **CUESTIONARIO**

- 1.- Establecer las diferencias entre infecciones micóticas superficiales y profundas.
- 2.- Mencionar varias formas comunes de micosis superficiales.
- 3.- Describir las características clínicas de la tina del cuero cabelludo, de la barba y de la piel lampiña.
- 4.- Describir la tina de pies y uñas y mencionar los hongos causales.
- 5.- Esbozar los métodos utilizados generalmente en el diagnóstico micológico de las dermatofitosis.
- 6.- ¿Con qué fin se añade el agua glicerinada a la caja?

## **PRACTICA NÚM. 4**

### **TOMA DE MUESTRA Y AISLAMIENTO DE HERIDAS INFECTADAS**

#### **OBJETIVO**

- El alumno conocerá y realizara las técnicas de toma de muestra de heridas infectadas, y determinará la importancia del diagnóstico de las infecciones bacterianas de la piel.

#### **INTRODUCCIÓN**

La infección piógena localizada puede presentarse en cualquier región u órgano del cuerpo y puede iniciarse por traumatismo, contaminación bacteriana secundaria, por alguna alteración local, que vuelve al tejido susceptible a la infección por microorganismos ya presentes como parte de la flora normal, la cual, por lo general, es resistente.

En condiciones adecuadas de menor resistencia tisular, casi cualquier bacteria común puede iniciar un proceso infeccioso; los-cultivos -de lesiones abiertas como la piel, frecuentemente contienen especies bacterianas, dentro de los que se pueden mencionar a los estafilococos, estreptococos y bacteroides. El estafilococo produce necrosis rápida y desde el principio, supuración, con gran cantidad de pus amarillo cremoso. Las infecciones por estreptococos beta hemolíticos del grupo A tienden a diseminarse rápidamente por los tejidos causando edema intenso y eritema, pero relativamente poca necrosis y exudados de escasa consistencia, con aspecto de suero; las bacterias anaerobias producen necrosis y pus abundante, de color pardo y olor fétido.

La identificación de los microorganismos infectantes es importante al elegir la quimioterapia local o general.

Existen otro tipo de infecciones adquiridas en el hospital (también llamadas infecciones nosocomiales), que son importantes por su alta tasa de morbilidad y mortalidad. Aunque muchas de éstas infecciones pueden ser prevenidas, otras no, y el término "adquirida" en el hospital no puede equipararse con infección iatrogénica que indica una infección causada por una intervención diagnóstica o terapéutica como la inserción de un catéter uretral o intravenoso.

La mayoría de las infecciones de heridas se manifiestan entre tres y siete días después de la cirugía. Las infecciones tempranas de la herida quirúrgica (de 24 a 48 horas) comúnmente son causadas por *Streptococcus* del grupo A o especies de clostridios, las infecciones estafilocócicas con características de cuatro a seis días después de la cirugía y las causadas por bacilos gram (-) y anaerobios pueden aparecer -en una semana o más.

En las heridas no quirúrgicas que incluyen quemaduras, sitios inyectados y úlceras de decúbito, los microorganismos encontrados son similares a los de infecciones de heridas con el antecedente de que las infecciones de quemaduras de tejidos blandos frecuentemente son causadas por *Pseudomona aeruginosa*.

## **MATERIAL**

Peróxido de hidrógeno

Colorantes para Gram y microscopio

1 caja de agar sangre

1 caja de agar Me Conkey

1 caja de agar sal manitol

1 caja de agar cetrimida (por grupo)

1 tubo de caldo tioglicolato con cultivo de *Clostridium*

1 tubo con caldo tioglicolato con cultivo de *Bacteroides* sp.

1 cepa de *Pseudomona aeruginosa*

1 cepa de *Staphylococcus aureus*

1 tubo con plasma citratado 1:4

## **PROCEDIMIENTO**

1.- Sembrar por la técnica de estría de aislamiento en la caja de agar sangre dividida por la mitad, las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

2.- Sembrar por la técnica de estría de aislamiento en la caja con medio de Mc Conkey la cepa de *Pseudomona*.

3.- A partir de las diferentes cepas hacer frotis y tinción de Gram.

4.- A partir de la cepa de *Staphylococcus aureus* hacer la prueba de la coagulase y catalasa.

5.- Reportar la morfología colonial y microscópica de los diferentes cultivos, después de incubación a 37°C.

6.- Observar morfología colonial de *Pseudomona aeruginosa* en agar cetrimida.

## **CUESTIONARIO**

- 1.- Describa la técnica de toma de muestra para cultivo de heridas.
- 2.- ¿Cuáles son los procedimientos y medios de cultivo útiles para el aislamiento de anaerobios?
- 3.- ¿Cuáles son los desinfectantes y antisépticos de uso tópico, útiles para el aislamiento y cultivo de microorganismos a partir de heridas, así como su uso en la terapéutica?
- 4.- Investigue los factores predisponentes para infecciones de la piel.

## PRACTICA NÚM. 5 LEISHMANIA MEXICANA

### OBJETIVO

- Estudiar las características de crecimiento y conocer recursos de laboratorio para establecer el diagnóstico de las leishmaniasis.

### INTRODUCCIÓN

Los agentes etiológicos de las leishmaniasis son protozoarios intracelulares del género *Leishmania*, morfológicamente idénticos entre sí. Pertenecen a diversos grupos que se denominan complejos los cuales causan en el hombre cuadros clínicos más o menos característicos. Así el complejo L.trópica produce el denominado "Botón de Oriente" del viejo mundo, el complejo L.donovani causa la leishmaniasis visceral o Kala- -Azar, el complejo L.brasilensis, la leishmaniasis mucocutánea y el complejo L.mexicana la úlcera de los chicleros que se presenta en Veracruz, Uaxaca, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.

Dentro de su ciclo biológico la Leishmania mexicana pasa por 2 estadios: amastigote y promastigote. El amastigote es la forma parasitaria y sólo se observa en los tejidos de los vertebrados o en cultivo de tejidos, mientras que el promastigote se observa en el transmisor y en -los medios de cultivo.

La lesión inicial se presenta después de la picadura por el transmisor, un mosquito del género *Phlebotomus*. Después de un periodo de tiempo la lesión se transforma en una úlcera, una placa o un nódulo, seguida de lesiones satélites vecinas.

Varios años después, aparecen nuevas lesiones a diferentes distancias y tienden a cubrir prácticamente toda la epidermis con excepción -del cuero cabelludo, la región inguinocrural y axila.



## **MATERIAL**

Microscopio

Preparaciones fijas de corte histológico de bazo con amastigotes de *L. donovani*.

Preparaciones fijas de frotis sanguíneo para búsqueda de tryposmastigotes.

Aceite de emersión

Papel seda (para limpiar lentes del microscopio)

## **PROCEDIMIENTO**

1.- Observar al microscopio las preparaciones fijas a 10x, 40x y 100x, reportar las observaciones de todo su trabajo.

## **CUESTIONARIO**

1.- Mencione el cuadro clínico de la úlcera de los chicleros.

2.- Describa aspectos morfológicos del amastigote y promastigote de las leishmanias.

3.- Explique detalladamente el ciclo biológico del parásito. ¿Cuál es el tratamiento a seguir en la leishmaniasis cutánea?



# **APARATO RESPIRATORIO**

## PRACTICA NÚM. 6

### IDENTIFICACION DE ESTREPTOCOCOS Y NEUMOCOCOS EN EL APARATO RESPIRATORIO

#### Objetivos

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

#### Introducción

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

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

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

Algunos microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* pueden presentar cápsulas polisacáridas que le confieren un aspecto mucoso a las colonias que se desarrollan sobre el agar, y son lisadas con facilidad por agentes tensoactivos, por ejemplo, las sales biliares<sup>2</sup>.

Parte de las características antes mencionadas pueden emplearse como fundamentos para una clasificación; sin embargo la agrupación de las diferentes especies en los grupos actualmente conocidos, fue establecida en 1930 por Rebeca Lancefield<sup>1</sup>, quien emplea antígenos específicos de la pared celular como base para dicha clasificación.

## ESTREPTOCOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

NOMBRE	Lancefiel d GRUPO	HEMOLISIS
<i>S. pyogenes</i>	A	Beta
<i>S. agalactiae</i>	B	Beta
<i>Enterococcus faecalis</i> y otros	D	Ninguna Alfa
<i>S. bovis</i>	D	Ninguna Alfa
<i>S. anginosus</i>	No tipificable A (C,F,G)	Alfa Beta
<i>S. viridans</i> múltiples especies	intipificabl es	Alfa
<i>S. pneumoniae</i>	Ninguna	Alfa
Peptostreptococcus	Ninguna	Alfa

### Material

- Asa bacteriológica
- Mechero
- Microscopio
- Juego de colorante para Gram
- Tinta china
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

- 2 placas de agar sangre
- 2 tubos de caldo lactosa + rojo fenol
- 2 tubos de caldo inulina + rojo fenol
- 2 tubos de caldo sorbitol + rojo fenol
- 2 tubos de glucosa + rojo fenol
  
- Cepa de *Streptococcus pyogenes*
- Cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
- 1 tubo con desoxicolato de sodio
- Discos de optoquina.

## Procedimiento

1. De la cepa *Streptococcus pyogenes*, tomar una asada y sembrar en el medio de cultivo Agar sangre con técnica de aislamiento. Seguir el mismo procedimiento para la cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
2. Tras la realización de la siembra, colocar un disco impregnado con optoquina en cada caja para observar la resistencia o sensibilidad de algunas colonias ante el reactivo.
3. Tomar una asada de la cepa de *Streptococcus pyogenes* y sembrar por agitación en el medio líquido que contiene lactosa con rojo de fenol.
4. Tomar una asada de la cepa de *Streptococcus pyogenes* y sembrar por agitación en el medio líquido que contiene sorbitol con rojo de fenol.
5. Tomar una asada de la cepa de *Streptococcus pyogenes* y sembrar por agitación en el medio líquido que contiene glucosa con rojo de fenol.
6. Seguir el mismo procedimiento con la cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
7. Tomar una asada de la cepa de *S. pneumoniae* e inocular el tubo con desoxicolato sódico.
8. Incubar a 37° durante 24 hrs.
  - a) Realizar frotis y tinción de Gram para cada cepa.

b) Realizar tinción de tinta china para *Streptococcus pneumoniae*.

---

### Técnica de tinción con tinta china

- Colocar una gota de agua en un portaobjetos limpio.
- Hacer una suspensión con una asada de la cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
- Colocar a un lado una gota pequeña de tinta china.
- Homogeneizar con el asa y colocar encima un cubre objetos.
- Observar al microscopio a 40x.

***Las cápsulas aparecen como zonas claras entre el contorno de las células y el fondo se observa oscuro.***

---

### CUESTIONARIO

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

### PRÁCTICA NÚM 7

### EXUDADO FARINGEO

## Objetivos

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

## Introducción

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

Para la obtención de buenos resultados, es recomendable la toma de muestra antes del inicio del tratamiento antimicrobiano y es de vital importancia la adecuada toma de la misma, para lo cual se recomienda sea de los sitios que tengan mayor afectación como los que presentan enrojecimiento o pus (en el caso de la orofaringe), tomando precauciones como la de no contaminar la muestra tocando lengua, labios u otro anexo de la cavidad bucal<sup>3</sup>.

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

---

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

---

***Streptococcus beta hemolyticus del tipo A.***

***Streptococcus alfa hemolítico.***

***Branhamella catarrhalis.***

***Neisserias.***

***Staphylococcus epidermidis.***

***Staphylococcus aureus.***

***Haemophylus haemolyticus.***

***Haemophylus influenzae.***

***Diplococos pneumoniae.***

***Bacilos difteroides.***

**Bacilos coliformes (Gram -).**

**Levaduras (*Cándida albicans*).**

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

### **Material**

- Hisopos de algodón estériles
- Asa bacteriológica
- Mechero de Bunsen
- Tubo con caldo cerebro corazón (BHI)
- Placa con Agar sangre



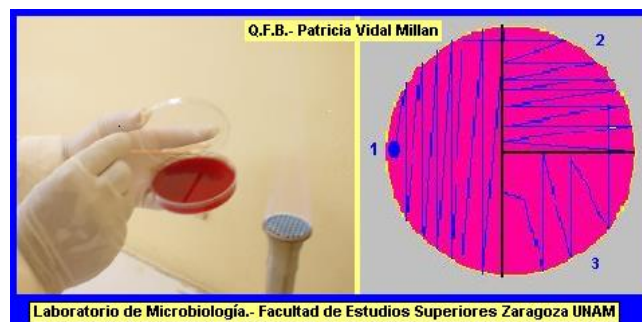
- Placa con Agar S110
- Placa con Agar McConkey
- Tubo con Agar Biggy

## Procedimiento

- Humedecer dos hisopos estériles en caldo cerebro corazón y pedir al paciente que abra la boca.
- Deprimir la lengua con un abatelenguas estéril.
- Juntando ambos hisopos, proceder a la toma de muestra, realizando un raspado suave de cualquier área que manifieste signos de inflamación, exudados o úlceras procurando no tocar la lengua, labios ni los otros anexos de la cavidad bucal del paciente.



- Con uno de los hisopos, realizar un frotis y proceder a teñirlo con la técnica de Gram.
- Con el otro hisopo, realizar la descarga del inóculo en los diferentes medios de cultivo.
- Con ayuda de un asa bacteriológica, realizar la distribución del inóculo empleando la técnica de estría cruzada.



- Incubar los diferentes medios por un periodo comprendido entre 24 y 48 horas a 37°C. Es importante que las placas de agar sangre se observen a las 24 horas para observar los patrones de hemólisis.
- Reportar la morfología colonial y guardar los cultivos en refrigeración para la siguiente sesión.



### Tinción de Gram

- 1.- Se hace un frotis delgado del material a estudiar y se deja secar al aire.
- 2.- Se fija la preparación pasándola un par de veces a través de la flama del mechero. De esta forma se evita que sea lavada durante la tinción.
- 3.- Cubrir la superficie del frotis con solución de cristal violeta por un lapso de un minuto.
- 4.- Enjuagar con agua destilada.
- 5.- Cubrir la superficie del frotis con la solución de yodo de Gram, dejando que esta actúe por un lapso de un minuto.
- 6.- Enjuagar con agua destilada.
- 7.- Cubrir la superficie del frotis con la solución de alcohol- cetona por un lapso de 30 segundos.

**8.- Enjuagar con agua destilada.**

**9.- Cubrir el frotis con la solución de safranina por 15 segundos.**

**10.- Enjuagar con agua destilada.**

**11.- Secar al aire.**

**12.- Observar al microscopio a 40x y 100x.**

### **CUESTIONARIO**

1.- Describa el procedimiento para la toma de la muestra del exudado faríngeo.

2.- Mencione a los virus y bacterias que ocasionan rinofaringoamigdalitis.

3.- Explique la importancia de realizar los frotis y tinciones de la muestra.

4.- Explique el método de siembra para aislamiento en placas.

5.- Explique el procedimiento para la toma de la muestra en el caso de los géneros *Haemophilus* o *Bordetella*.

### **PRÁCTICA NÚM 8**

#### **IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEL EXUDADO FARINGEO**

##### **Objetivo**

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

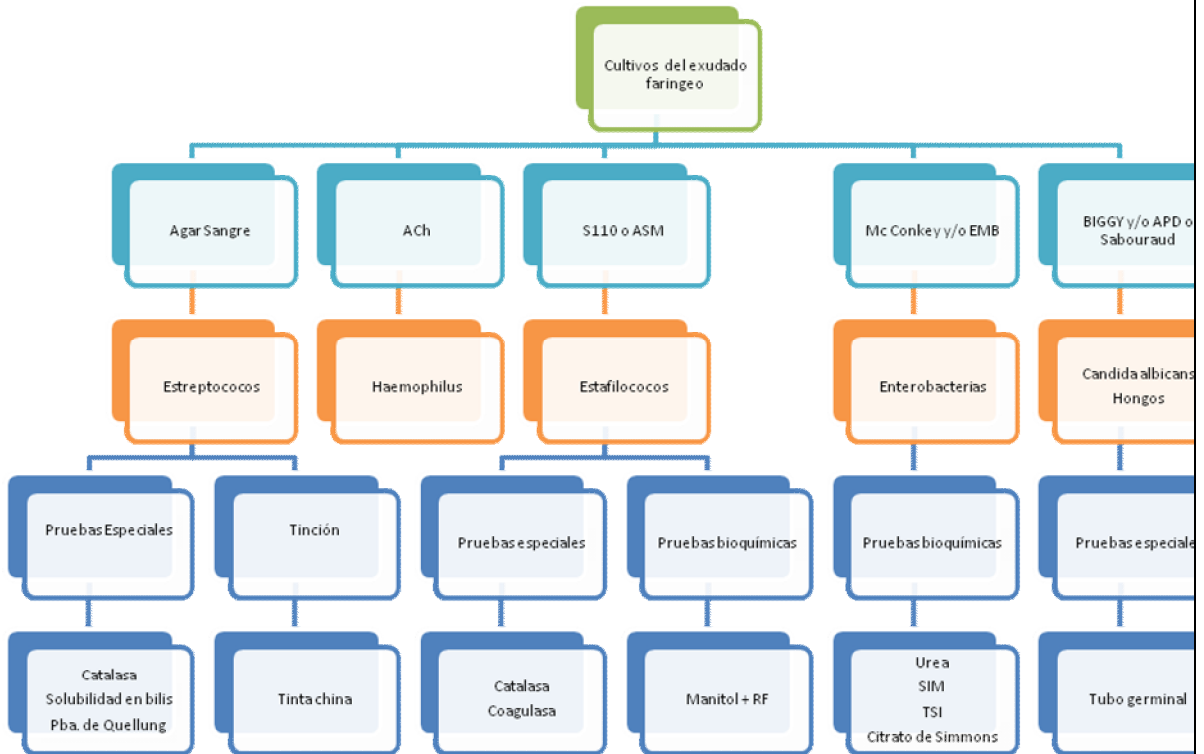
## **Introducción**

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

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

Una vez establecida la identidad del microorganismo causal de la enfermedad, es importante realizar pruebas de susceptibilidad a los diferentes antibióticos, para así poder brindar al paciente el tratamiento adecuado y evitar que se propague aún más la resistencia microbiana que ya constituye un serio problema de salud. Para esta evaluación, se utilizan discos de papel impregnados con los fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos grampositivos y gramnegativos, que tras ser colocados en medios inoculados masivamente con la cepa en cuestión permiten observar en pocas horas (24 . 48 hr) la acción de los fármacos por la formación de los llamados halos de inhibición (espacios sin crecimiento bacteriano), en los que dependiendo del diámetro se observa la eficacia del fármaco.

## Pruebas bioquímicas y especiales a partir de los cultivos



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

### Material

- Placas de agar con los cultivos de la sesión anterior.
- 1 tubo con medio de SIM.
- 1 tubo con caldo manitol con rojo de fenol.
- 1 tubo con caldo urea.

- 1 tubo con Citrato de Simmons.
- 1 tubo con plasma citratado.
- Discos impregnados con antibióticos.
- Colorantes para la tinción de Gram.
- Tinta china
- Asa bacteriológica
- Portaobjetos.
- Mechero de Bunsen.
- Microscopio.

## Procedimiento

1.- En caso de crecimiento en los medios de cultivo S110 o Agar Sal Manitol, selectivos para *Staphylococcus*:

- Tomar una asada partiendo de una colonia aislada y realizar una preparación fija y teñir con coloración de Gram.
- Con otra asada realizar prueba de catalasa en portaobjetos.
- Realizar prueba de coagulasa.
- Reportar los resultados obtenidos.

2.- Reportar (la observación realizada a las 24 horas de incubación), las características de las colonias que desarrollaron en agar sangre, así como el tipo de hemólisis.

3.- En caso de existir crecimiento de colonias en los medios selectivos para enterobacterias (EMB y Agar Mc Conkey), tomar los inóculos pertinentes a partir de colonias aislada e inocular las pruebas bioquímicas como se indica a continuación:

- Inocular por agitación en el medio líquido caldo urea.
- Sembrar por picadura en el medio de SIM con un asa recta, teniendo la precaución de no tocar el fondo del tubo.
- Inocular por estría y picadura el medio TSI.
- Inocular la prueba de citrato de Simmons solo con estría el pico de flauta.

Prueba de sensibilidad a antibióticos

- 1.- De una de las cajas con medio de cultivo en donde hubo desarrollo de colonias aisladas, tomar una asada y realizar una siembra masiva el medio BHI o Mueller Hinton.
- 2.- Colocar los discos impregnados con antibióticos.
- 3.- Incubar los cultivos a 37° C durante 48 hrs.
- 4.- Reportar los resultados indicando la inhibición (sensibilidad) o de resistencia de cada uno de los antibióticos.

### **CUESTIONARIO**

- 1.- Mencione las características morfológicas, de tinción, cultivo y pruebas específicas para la identificación del Género *Streptococcus*.
- 2.- Mencione Las características morfológicas de tinción y de crecimiento para la identificación de *Haemophylos influenzae*.
- 3.- Mencione dos medios de cultivo selectivos y dos diferenciales para el crecimiento e identificación de enterobacterias.
- 4.- Explique en qué consiste la prueba del Indol en el medio SIM y en que momento se considera positiva.
- 5.- Explique en qué consiste la prueba de la Urea y cuando se considera positiva.

### **PRÁCTICA NÚM.9**

#### **IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

##### **Objetivo**

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

## Introducción

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

El miembro causante de la tuberculosis, pertenece a la familia Mycobacteriaceae y al orden Actinomycetales; es una bacteria aerobia, no esporógena, bacilar que mide 0.5 por 3 mm. Se distingue por no captar con facilidad los colorantes, pero una vez teñidos, resisten la decoloración con alcohol ácido, razón por la cual reciben el nombre de bacilos ácido alcohol resistentes. La resistencia a la decoloración es debida a los lípidos estructurales de las membranas que forman la pared de estos microorganismos.<sup>4</sup>

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

En el año 2009 se reportaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de 8.5 millones de nuevos casos de tuberculosis (todas las formas, pulmonar y extrapulmonar); 95 % de los casos se reportaron en los países en vías de desarrollo. Sin embargo por la insuficiente detección de casos y la notificación incompleta, los casos reportados constituyen solo 63% de la estimación de casos totales.

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



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

## Material

- Mechero de Bunsen.
- Microscopio.
- Asa bacteriológica.
- Portaobjetos.
- Aceite de inmersión.
- Alcohol ácido al 39%
- Fucsina de Ziehl
- Azul de metileno
- 1 Tubo con cepa *Mycobacterium* sp.
- 1 Tubo con medio de cultivo Lowenstein Jensen
- 1 Caja con Agar glicerol telurito.
- Peróxido de Hidrógeno.

## Procedimiento

- 1.- Tomar una asada de la cepa y sembrar en los medios de cultivo.
- 2.- Incubar a 37° C durante 4 días.
- 3.- Hacer una tinción de *Mycobacterium* sp. con técnica de Ziehl Neelsen.
- 4.- Realizar la prueba de la catalasa para *Mycobacterium* sp.
- 5.- Reportar los hallazgos microscópicos.
- 6.- Reportar la morfología colonial del crecimiento en los medios de cultivo.

## TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN

- 1.- Preparar un frotis con la muestra (material orgánico con Mycobacterias).
- 2.- Cubrir el frotis con fucsina fenicada.
- 3.- Calentar hasta emisión de vapores durante 5 minutos (el exceso de calor destruye a los microorganismos). Colocar el portaobjetos sobre la malla de alambre moviendo el mechero de Bunsen acercando o alejando la flama, según requiera calor para emisión de vapores. Puede también calentarse el frotis, colocando un vaso de precipitado con agua (que hierve) sobre la malla de alambre y sobre el vaso el frotis.
- 4.- Lavar con agua corriente para eliminar el exceso de colorante.
- 5.- Decolorar con alcohol ácido, hasta que las capas finas de colorante adherido al portaobjetos se vuelvan casi incoloras, 30 segundos aproximadamente.
- 6.- Lavar con agua corriente para eliminar y neutralizar la acción del alcohol ácido.
- 7.- Agregar Azul de metileno por un periodo de 30 segundos.
- 8.- Lavar con agua.
- 9.- Secar al aire a temperatura ambiente o con calor suave en la flama del mechero de Bunsen.

### Interpretación

Las Mycobacterias se observan en forma de bastones ligeramente curvos de color rojo en un fondo azul marino.

## CUESTIONARIO

- 1.- Describa las características morfológicas del género Mycobacterium complejo tuberculosis.

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

# **APARATO CARDIOVASCULAR**

**PRÁCTICA NÚM. 10**  
**DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO**

## OBJETIVO

- Conocer los diferentes estadios del género *Plasmodium*, a través de preparaciones fijas.
- Estudiar los elementos importantes para el diagnóstico de paludismo.

## INTRODUCCIÓN

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

Hasta la fecha se conocen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan a mamíferos, aves y reptiles.

### Ciclo biológico

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

### Manifestaciones clínicas

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

### Diagnóstico

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

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

## **MATERIAL**

1. Preparaciones fijas de *Plasmodium ssp*
2. Microscopio óptico
3. Aceite de inmersión
4. Papel seda

## **PROCEDIMIENTO**

1. Observar al microscopio las preparaciones en los objetivos 10, 40 y 100X (inmersión).
2. Hacer descripción morfológica de lo observado.
3. Realizar esquemas para su reporte.

## **CUESTIONARIO**

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

## **PRÁCTICA NÚM. 11**

### **TRIPANOSOMIASIS**

## OBJETIVO

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

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

### Ciclo biológico

El ciclo biológico del parásito se inicia cuando el triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes sanguíneos; éstos se transforman y se multiplican. Cuando el vector infectado se alimenta, puede ingerir varias veces su peso corporal en sangre y defecarla en la piel o mucosas del mamífero, de esta manera arrastra su excremento e introduce tripomastigotes metacíclicos infectantes. También es posible que el mismo huésped se infecte al llevar las deyecciones a una solución de continuidad en la piel, mucosa o conjuntiva ocular. Luego, se transforman en amastigotes, se multiplican por fisión binaria y alcanzan la circulación sanguínea causando la muerte celular. El ciclo se completa cuando el triatomino se alimenta de un mamífero infectado.

La transmisión de la enfermedad puede ocurrir por transfusión sanguínea, congénita o trasplantes.

### Cuadro clínico

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

### **Diagnóstico**

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

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

### **MATERIAL**

5. Preparaciones fijas de tripanosomas
6. Microscopio óptico
7. Aceite de inmersión
8. Papel seda

### **PROCEDIMIENTO**

1. Observar al microscopio las preparaciones fijas de en los objetivos 10, 40 y 100X (inmersión).
2. Hacer descripción morfológica de lo observado.
3. Realizar esquemas para su reporte.

### **CUESTIONARIO**

1. ¿Cuál es la fase replicativa extracelular de *Trypanosoma cruzi*?
2. ¿Cuál es el ciclo completo de *Trypanosoma cruzi*?



3. ¿Cuáles son los mecanismos de patogenicidad en las infecciones por *T. cruzi*?
4. ¿Quién es el transmisor en la enfermedad de Chagas?
5. ¿Cuál es el fundamento del xenodiagnóstico?
6. ¿Cuáles son las características morfológicas de los estadios básicos por los que atraviesa el parásito?

## **PRÁCTICA NÚM. 12**

### **HEMOCULTIVO**

#### **OBJETIVO**

- Conocer la importancia del hemocultivo como método para el diagnóstico etiológico y tratamiento de las septicemias y fiebres de origen desconocido.
- Conocer a los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia en el hemocultivo.
- Conocer la técnica para la toma de muestra y la técnica para realizar el hemocultivo, así como interpretar los resultados de este.

## INTRODUCCIÓN

En numerosas enfermedades, los agentes infecciosos pasan a la sangre y producen septicemia o bacteriemia.

El hallazgo de estos agentes por hemocultivo proporciona un dato importante de los padecimientos infecciosos.

El hemocultivo es el procedimiento sencillo más importante que se hace en el laboratorio de microbiología para identificar los géneros y especies bacterianas causantes de septicemias, este método es esencial si se sospecha de una endocarditis infecciosa, aun en caso de que el paciente no muestre indicios de un padecimiento agudo o de gravedad. Por lo tanto, en la bacteriemia deberán efectuarse todos los esfuerzos posibles para aislar el microorganismo causal.

La contaminación del hemocultivo con flora cutánea normal se debe comúnmente a errores durante la recolección, por lo que se requiere de una técnica apropiada en este procedimiento.

Varios factores determinan si los hemocultivos producirán resultados positivos, por ejemplo, el volumen de sangre cultivada, su dilución en el medio de cultivo, el uso de medios de cultivo aerobio y anaerobio y el tiempo de incubación.

El hemocultivo se incuba de cinco a siete días, a menos de que el médico indique específicamente que puede estar presente un patógeno de crecimiento lento (Brucela). El número de muestras de sangre que debe extraerse y el periodo durante el cual deberá hacerse depende, en parte, de la gravedad del padecimiento clínico. En las infecciones hiperagudas, como, septicemia por Gram negativas con Choque o Septicemia por Estafilococos, es apropiado cultivar dos muestras de la sangre obtenida de sitios anatómicos distintos en un periodo de 10 minutos. En otras infecciones bacterémicas, como, endocarditis, se deberán obtener tres muestras durante un lapso que va desde algunas horas hasta 24 . Un total de tres hemocultivos descubren la bacteria infectante en más del 95% de

los pacientes. Se obtiene una proporción más elevada de resultados positivos cuando se toma la muestra durante un acceso febril.

Es necesario determinar el significado de un hemocultivo positivo. Los siguientes criterios pueden ser útiles para diferenciar las muestras ~~positivas~~ verdaderas+ de las contaminadas:

- 0 La proliferación del mismo microorganismo en cultivos repetidos, obtenidos en diferentes momentos de sitios anatómicos separados, es muy sugestiva de bacteriemia verdadera.
- 1 La proliferación de microorganismos diferentes en frascos de cultivo distintos sugiere contaminación, pero en ocasiones puede representar problemas clínicos como fístulas enterovasculares.
- 2 La proliferación de la flora cutánea normal, como Estafilococos, Difteroides o cocos anaerobios, Gram positivos, en solo uno o varios cultivos, sugiere contaminación. Su proliferación en más de un cultivo o en muestras de un paciente con prótesis vascular, incrementa la probabilidad de bacteriemia con significado clínico.
- 3 La proliferación de microorganismos como los Estreptococos o los Enterococos es, posible en los cultivos de pacientes en quienes se sospecha de endocarditis, y la de bacilos Gram negativos como Escherichia coli en los cultivos de enfermos con septicemia, por lo que si encontramos estos microorganismos tendrá importancia clínica.

Los siguientes microorganismos son los que se encuentran con mayor frecuencia en los hemocultivos.

Estafilococos

Estreptococos

Enterococos

Bacterias entéricas como Escherichia coli, Salmonella y Brucella.

Klebsiella pneumoniae

Pseudomona aeruginosa

Streptococo pneumonia

Haemophilus influenzae

Cándida y otras levaduras.

Las indicaciones para la obtención de cultivos de sangre son múltiples, pero básicamente lo son: un cambio súbito de frecuencia del pulso y temperatura, acompañado o no de escalofríos, postración e hipotensión, una historia de fiebre leve, intermitente y persistente, asociada con un soplo cardiaco y generalmente cualquier sospecha de sepsis.

La bacteriemia suele ser intermitente, con la notable excepción de la asociada a la endocarditis, que es constante, por esto es indispensable que se realicen más de un grupo de cultivos.

## MATERIAL

1 frasco de Medio Ruiz Castañeda

1 Jeringa estéril de 5 ml.

1 ligadura

Torundas con alcohol al 70%

1 Mechero Bunsen.

## MÉTODO

1.- Desinfectar con alcohol al 70% una zona de 2 cm aproximadamente de diámetro sobre la piel de la vena escogida para realizar el sangrado.

2.- Realizar la punción de la vena, extraer 3 ml. de sangre y depositarlos inmediatamente en el frasco del medio de cultivo de Ruiz Castañeda. Este proceso se realiza junto al mechero.

- 3.- Agitar lentamente el frasco por unos segundos e incubar a 37° C por media hora en posición horizontal, para que la sangre haga contacto con la fase sólida.
- 4.- Enderezar el frasco e incubar a 37° C y observar cada 24 horas si hay crecimiento en la fase sólida y/o turbiedad en la fase líquida.
- 5.- Incubar a 37° C y observar cada 24 horas si hay crecimiento en la fase sólida y/o turbiedad en la fase líquida.
- 6.- Leer e interpretar resultados, guardar el medio para aislamiento de microorganismos para, la próxima semana.

## CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cuáles son las indicaciones para realizar un hemocultivo?.
- 2.- ¿Qué es bacteriemia, Septicemia y Piemia.?
- 3.- ¿Cuáles son los principales agentes causales de Septicemias en orden de frecuencia?
- 4.- ¿Describa la técnica de toma de muestra del hemocultivo?
- 5.- ¿ Como es el medio de Ruíz Castañeda y de que esta compuesto?

## **PRÁCTICA NÚM. 13**

### **RESIEMBRA EN MEDIOS SELECTIVOS**

## OBJETIVO

- Conocer los medios de cultivo selectivos útiles para aislamiento de los microorganismos que, con mayor frecuencia, producen bacteriemias y septicemias. Interpretar y reportar las características de las colonias en los medios de cultivo.
- Conocer las características morfológicas con la tinción de Gram.

## INTRODUCCIÓN

Los hemocultivos como medios generales o enriquecidos permiten el crecimiento de un gran número de microorganismos, sin embargo, el aislamiento definitivo de un microorganismo bacteriano en un cultivo puro representa un serio problema ya que cada uno de estos microorganismos requiere de un ambiente y un medio adecuado.

Un hemocultivo que revela la presencia de algunas bacterias que pueden provocar invasión al organismo constituye un auxiliar valioso para el diagnóstico. Al sospechar que un cuadro febril pudiera ser ocasionado por una infección generalizada, y teniendo en cuenta que no siempre se puede aislar el agente causal en un primer cultivo, es conveniente repetirlo tantas veces como sea posible, procurando evitar la interferencia con tratamientos de antibióticos.

En general, son pocos los microorganismos que circulan en la sangre, por lo que para obtener resultados positivos hay que sembrar la sangre en un medio líquido que permita la moderada multiplicación de bacterias para hacerlas aparentes, haciendo transferencias a medios sólidos.

En el medio de Ruiz Castañeda sí se tuvo la precaución de bañar con la mezcla de caldo y sangre la capa sólida inmediatamente después de la toma. Esto sirve para darse cuenta si la siembra fue correcta, si ha habido error es posible que desde las primeras 24 o 48 horas se encuentre crecimiento, entonces sospechamos de contaminación.

La Salmonela, la Escherichia coli, la Klebsiella, la Pseudomona, el Proteus y otras enterobacterias suelen hacerse manifiestas en la capa sólida, como resultado de la primera resiembra. Otros gérmenes más delicados en su desarrollo como:

Brucelas, Estreptococos, Neumococos, Listeria etc., tienen una aparición más tardía.

En caso de sospechar de Brucelosis los hemocultivos deben observarse cada 24 horas y cada 7 días para descartar este microorganismo.

Es importante hacer la resiembra en medios selectivos para cada una de las bacterias de la cuales sospechemos como en agar sangre, medio enriquecido para observar la hemólisis, agar S110 si sospechamos de Estafilococos, agar chocolate en caso de Neisseria o Haemophilus, y medios para Gram negativos como agar EMB o Mac Conkey, también algún medio para Mycobacterium y si sospechamos algún hongo o levadura alguno de los medios para estos microorganismos.

## Material

1 Medio Ruiz Castañeda

1 caja agar EMB o Mac Conkey

1 caja agar sangre

1 caja agar chocolate

1 caja agar S 110

1 asa bacteriológica

1 mechero de Bunsen

## MÉTODO

1.- A partir de la muestra de Ruiz Castañeda, tomar una asada de las colonias que se desarrollaron tanto en el medio líquido como en el sólido, en la superficie y el

fondo, y sembrar por estría cruzada para observar la morfología colonial, y reportarla en cada uno de los medios de cultivo.

Agar sangre.

Agar chocolate

Agar S110

Agar EMB o Mac Conkey

2.- Incubar a 37° C durante 48 hrs. los medios de agar chocolate, EMB y S110.

3.- Incubar a 37° C durante 24 horas en agar sangre, leer morfología colonial y retirar a refrigerador para utilizar en la identificación.

4.- Leer la morfología colonial y guardar en refrigerador para utilizar en la siguiente sesión.

#### Cuestionario

1.- ¿ Qué microorganismo esperarías encontrar en Agar Sangre y por qué es importante leer en este medio a las 24 horas?

2.- ¿ Qué microorganismos esperarías encontrar en Agar chocolate y qué tipo de medio es?

3.- ¿Cuál es la etiología de la presencia de microorganismos en sangre?

4.- ¿ Después de cuanto tiempo debe darse como negativo un hemocultivo y por qué?.

## **PRÁCTICA NÚM. 14**

### **IDENTIFICACION DE BACTERIAS POR PRUEBAS BIOQUIMICAS**



## OBJETIVO

- Conocer el fundamento bioquímico de las pruebas útiles en la identificación de géneros y especies de microorganismos obtenidos en la resiembra de hemocultivo.
- Conocer la siembra e inoculación de los medios útiles en la identificación de géneros y especies a partir de la morfología colonial en los medios de cultivo y en las tinciones de cada microorganismo a identificar.

## INTRODUCCIÓN

Una vez obtenidos los cultivos puros en medios selectivos a partir del hemocultivo, se deben realizar pruebas bioquímicas para la identificación de los géneros y especies patógenas aisladas. La elección de las pruebas bioquímicas depende del microorganismo en estudio.

Las características morfológicas en los medios de cultivo y en la tinción son la base en el inicio para la diferenciación de género y especie en microorganismos Gram positivos y Gram negativos, aerobias o anaerobias, etc.

## MATERIAL

1 tubo con TSI

1 tubo con LIA

1 tubo Citrato de Simons

1 tubo Plasma Citrato

1 tubo con Caldo Urea

1 tubo con MIO

Peróxido de hidrógeno

Microscopio

Reactivos para tinción de Gram.

Mechero

Asa bacteriológica

Porta objetos y cubre objeto

## DESARROLLO

- 1.- En caso de encontrar desarrollo en el agar sangre hacer la descripción de la morfología colonial y el tipo de hemólisis que presentó.
- 2.- Si encontramos crecimiento en agar S110 proceder a la identificación de la especie con las pruebas ya conocidas: coagulasa, fermentación de manitol.
- 3.- Si existe crecimiento en los medios EMB o Mac Conkey proceder a la siembra e inoculación en los medios TSI, SIM, LIA, MIO, Citrato de Simons y Caldo Urea.
- 4.- Leer los resultados a las 24 horas e interpretarlos comparándolos con la tabla de pruebas bioquímicas por género y especie.

## CUESTIONARIO

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

## **PRÁCTICA Núm. 15**

### **REACCIONES FEBRILES**

## OBJETIVO.

- Conocer el método de laboratorio de Reacciones Febriles para seguir la secuencia de las infecciones causadas por diferentes bacterias.
- Conocer los diferentes métodos que se utilizan para seguir esta secuencia.

## INTRODUCCIÓN

Esta prueba representa un método de laboratorio útil para seguir la secuencia de ciertas infecciones con acceso febril, causadas por bacterias. Son reacciones de aglutinación entre los antígenos de Salmonella, Brucella y Proteus y los anticuerpos contra estos antígenos presentes en el suero del paciente.

Estas reacciones se basan en el hecho de que cuando el organismo humano es invadido por agentes infecciosos, éste responde produciendo anticuerpos aglutinantes contra ellos, los cuales se ponen de manifiesto al entrar en contacto el anticuerpo con el antígeno específico.

Para la detección de los anticuerpos se usa el suero del enfermo y antígenos purificados. El título de anticuerpos depende del tipo y curso de la enfermedad. Para que los resultados tengan valor diagnóstico el título de ellos debe aumentar.

Estas pruebas pueden efectuarse de dos maneras diferentes:

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

2. Aglutinación en tubo. Esta técnica de aglutinación es más segura que la de aglutinación en placa, además las reacciones cruzadas son menos frecuentes y pueden ser detectadas las reacciones zonales.

Estos son los microorganismos representantes típicos de los padecimientos con acceso febril, por lo tanto, el grupo de antígenos febriles se presenta con las siguientes suspensiones:

Salmonella typhi	Antígeno somático % <del>O</del> +
Salmonella typhi	Antígeno flagelar % <del>H</del> +
Salmonella paratyphi	Antígeno flagelar % <del>A</del> +
Salmonella paratyphi	Antígeno flagelar % <del>B</del> +
Brucella abortus	Antígeno somático
Proteus OX19	Antígeno somático

La demostración de aglutininas en el suero frente a las Salmonelas se conoce como la prueba de Widal.

La demostración de aglutininas para Brucella se conoce como prueba de Huddleson; la reacción de Weil . Félix se utiliza para Rickettsias dando reacción cruzada con Proteus OX-19.

## MATERIAL

Ligadura

2 tubos de vidrio 12 x 100

Centrífuga

Pipeta Pasteur

Torundas de algodón

Jeringa de 5 ml.

Reactivo de antígenos febriles

Placa de vidrio.

## DESARROLLO

- 1.- Extraer 5 ml. de sangre por punción venosa.
- 2.- Deje que coagule.
- 3.- Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
- 4.- Separar suero con pipeta Pasteur y proceder a realizar la colocación de los volúmenes de suero en las placas de vidrio.

Técnica de aglutinación rápida en placa.

- 1.- Utilizar de preferencia una placa de vidrio marcada con 2 hileras de 3 cuadros.
- 2.- Anotar el antígeno que le corresponde a cada serie.
- 3.- Agregar una gota de suero y una gota de antígeno.
- 5.- Mezclar con un aplicador limpio, comenzando con la última dilución de la derecha y siguiendo con las restantes de la izquierda ( utilizar un aplicador por cada serie).
- 6.- Agitar suavemente la placa por rotación (120 rpm) durante 2 a 3 minutos.

7.- Leer con luz indirecta.

Interpretación de resultados.

Método de aglutinación rápida en placa. Se observa la aglutinación macroscópica y se valora los resultados de la siguiente forma:

Grado de aglutinación

100 %	4+
75 %	3+
50 %	2+
25 %	1+
1. -	

Ejemplo:

Suero (ml)	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
Agglutinación	4 +	4 +	3 +	2 +	
Título correspondiente	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320

Resultado: Una titulación positiva es de 1/160 indica una gran probabilidad de enfermedad activa, la titulación deberá repetirse a la semana, mientras tanto los estudios complementarios deberán confirmar el diagnóstico y reorientar el tratamiento.

## CUESTIONARIO.

- 1.- ¿Cuándo está indicado realizar Reacciones Febriles?
- 2.-¿Cuántas técnicas existen para determinación de las reacciones febriles, descríbalas ?
- 3.- ¿Cuáles son los antígenos detectables en la Salmonelosis?
- 4.- ¿ Porqué se utiliza el antígeno Proteus 0X19 para el diagnóstico de Rickettsias?

# **APARATO DIGESTIVO**

## **PRÁCTICA NÚM. 16 CULTIVO DE ENTEROBACTERIAS**

### **OBJETIVO**



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

## **INTRODUCCIÓN**

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

### **Escherichia coli**

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

### **Proteus**

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

### **Salmonella**

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

### **Shigella**

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

## **MATERIAL**

9. Asa bacteriológica
10. Mechero
- 11.2 cajas de Agar Salmonella-Shigella (SS)
- 12.2 cajas de Agar Sulfito y Bismuto
- 13.2 cajas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)
- 14.2 cajas de Agar Verde Brillante
15. Juego de colorantes Gram
16. Microscopio óptico
17. Porta y cubreobjetos
18. Papel seda

## **Cepas**

19. Cepa de Salmonella sp
20. Cepa de Shigella sp
21. Cepa de Proteus
22. Cepa de Escherichia coli

## **PROCEDIMIENTO**

1. De cada una de las cepas hacer tinción de Gram.
2. Observar al microscopio y reportar morfología y tipo de Gram.
3. Dividir las cajas de medios de cultivo y sembrar por estría simple de aislamiento las diferentes cepas.
4. Incubar durante 48 horas a 37 °C.
5. Reportar morfología colonial
6. Guardar los medios de cultivo en refrigeración para realizar pruebas bioquímicas.

## CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los principales medios de cultivo diferenciales y selectivos para enterobacterias?
2. ¿Cuál es el componente que caracteriza a cada uno de los medios de cultivo utilizados en la práctica?
3. ¿Cuáles son los principales factores de patogenicidad de las enterobacterias estudiadas en la práctica?
4. ¿Por qué razones *Escherichia coli* se vuelve patógena en el tracto digestivo?
5. ¿Cuál es la morfología colonial de *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* y *Proteus*?

PRÁCTICA NÚM. 17

**COPROCULTIVO**

## OBJETIVO

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

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

## MATERIAL

- Muestra de heces en un frasco estéril
- 1 tubo de caldo de Tetrionato
- 1 tubo de caldo Selenito
- 1 caja de medio EMB
- 1 caja de medio SS (Salmonella-Shigella)
- 1 caja de medio Sulfito y Bismuto
- Asa bacteriológica
- Mechero
- 2 hisopos estériles

## **PROCEDIMIENTO**

1. Tomar una muestra de heces con el hisopo estéril y colocarlo en el medio de Tetracionato.
2. Tomar otra muestra y colocarla en el medio de Selenito.
3. Incubar durante 24 horas a 37°C, previo a la práctica.
4. Dividir las cajas de medio de cultivo en dos.
5. Descargar la muestra de heces con el hisopo, en un extremo de la caja del medio de cultivo, a partir del medio Tetracionato.
6. Descargar la muestra de heces con el hisopo, en el otro extremo de la caja del medio de cultivo, a partir del medio Selenito.
7. Quemar los hisopos.
8. Sembrar con el asa bacteriológica, por estría de aislamiento simple, en ambas secciones del medio de cultivo.
9. Seguir el mismo procedimiento para cada uno de los medios de cultivo.
10. Incubar durante 24 a 48 horas a 37°C.
11. Leer morfología colonial.

## **CUESTIONARIO**

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

## **PRÁCTICA NÚM. 18**

### **IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS A PARTIR DEL COPROCULTIVO**

## **OBJETIVO**

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

## **INTRODUCCIÓN**

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

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

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

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

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

## **MATERIAL**

- Asa bacteriológica
- Mechero
- Cajas de medios de cultivo de la práctica anterior
- 2 tubos de agar TSI
- 2 tubos de agar LIA
- 2 tubos de agar Citrato de Simmons

- 2 tubos de medio de SIM
- 2 tubos de caldo Urea
- 2 tubos de caldo Manitol rojo de fenol

## PROCEDIMIENTO

1. De una colonia aislada de *Salmonella*, tomar una muestra y sembrar por agitación en los medios: caldo Urea y caldo Manitol rojo de fenol.
2. Tomar otra muestra de *Salmonella* y por picadura, sembrar en el medio de SIM.
3. Tomar otra muestra de *Salmonella* y sembrar, por estría simple y picadura, en los medios: agar TSI, agar LIA y agar Citrato de Simmons.
4. Seguir el mismo procedimiento para sembrar las pruebas bioquímicas de los medios de cultivo de *Proteus*, *Shigella* y *Escherichia coli*.
5. Incubar durante 24 a 48 horas a 37°C.
6. Leer movilidad, producción de ácido sulfhídrico y producción de indol (adicionar el reactivo de Kovac o Erlich) en el medio de SIM.
7. Leer si las pruebas fueron positivas o negativas, para cada bacteria, y elaborar un cuadro de resultados.

## CUESTIONARIO

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

## PRÁCTICA NÚM. 19

### COPROPARASITOSCÓPICOS POR CONCENTRACIÓN (CUALITATIVOS)

#### OBJETIVO

- Realizar un estudio coproparasitológico cualitativo para el diagnóstico de parasitosis.
- Conocer los diferentes tipos de análisis coproparasitológicos que se realizan.

## **INTRODUCCIÓN**

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

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

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

En los métodos físico-químicos se asocia la acción disolvente de los reactivos empleados, que forman dos fases no miscibles, en una de las cuales se localizan preferentemente los parásitos, y en la otra los restos fecales. De entre ellos, el más universal es el método formol-éter (técnica de Ritchie), que puede utilizarse tanto en heces frescas como fijadas en formol. Básicamente se trata de diluir las heces directamente en formol al 10%, tamizar y agregar unos mililitros de éter etílico, emulsionar por agitación vigorosa y examinar, tras centrifugación, el sedimento donde se concentran los quistes de protozoos y los huevos de helminto.

Para las heces fijadas con MIF se puede utilizar la técnica de concentración de Blagg (MIF concentración). Es muy parecida a la técnica de Ritchie, y su principal diferencia radica en que, en lugar de éter etílico, se utiliza éter sulfúrico.

## **MATERIAL**

- Vaso de precipitado de 50 mL
- Tubos de 13x100 con tapón (4)



- Embudo de plástico
- Pipetas Pasteur (2)
- Varilla de vidrio
- Abatelenguas
- Gasas
- Asa bacteriológica
- Porta y cubreobjetos

### **EQUIPO**

- Centrífuga
- Microscopio

### **REACTIVOS**

- Lugol
- Solución de ZnSO<sub>4</sub>
- Éter sulfúrico
- Solución de formalina
- Solución salina isotónica

### **MUESTRA**

F. Materia fecal

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Técnica de Faust**

1. Poner con un aplicador aproximadamente 1g de materia fecal en un vaso de precipitados.
2. Agregar 10 mL de solución salina isotónica.
3. Filtrar las heces bien homogeneizadas a través de una gasa colocada en un embudo. Recoger la suspensión en un tubo de centrífuga.
4. Centrifugar durante 45-60 segundos a 2500 rpm.
5. Decantar el sobrenadante y añadir 2 a 3 mL de agua al sedimento.

6. Agitar y añadir agua hasta llenar el tubo.
7. Repetir los pasos 5 y 6 tres o cuatro veces, hasta que el sobrenadante se torne claro. Tirar el sobrenadante.
8. Agregar 8-9 mL de solución de sulfato de zinc (densidad 1:18). Agitar para homogeneizar y llenar el tubo con la misma solución.
9. Centrifugar durante 45-60 segundos a 2500 rpm.
10. Tomar con un asa bacteriológica la película superficial del líquido del tubo y colocarlo en un portaobjetos.
11. Añadir una gota de lugol. Homogeneizar la muestra y colocar un cubreobjetos.
12. Observar a seco débil y seco fuerte.

### **Técnica de Ritchie**

1. Poner con un aplicador aproximadamente 1g de materia fecal en un vaso de precipitados.
2. Agregar 10 mL de solución salina isotónica.
3. Filtrar las heces bien homogeneizadas a través de una gasa colocada en un embudo. Recoger la suspensión en un tubo de centrifuga.
4. Centrifugar durante 45-60 segundos a 2000 rpm. Desechar el sobrenadante.
5. Tirar el sobrenadante y añadir 2 a 3 mL de agua al sedimento.
6. Agitar y añadir agua hasta llenar el tubo.
7. Repetir los pasos 4, 5 y 6 tres o cuatro veces, hasta que el sobrenadante se torne claro. Tirar el sobrenadante.
8. Agregar 10 mL de formalina al 10% y dejar en reposo la suspensión durante 10 minutos (fijación).
9. Agregar 5 mL de éter, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos.
10. Centrifugar a 1500 rpm durante 1 minuto. Observar que se formarán cuatro capas: éter, restos fecales, formol y sedimento.
11. Introducir una pipeta pasteur y extraer cuidadosamente el sedimento.
12. Colocar una gota del sedimento en un portaobjetos.

13. Añadir una gota de lugol. Homogeneizar la muestra y colocar un cubreobjetos.
14. Observar a seco débil y seco fuerte.

### **CUESTIONARIO**

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

## OBJETIVOS

- Explicar por medio de un esquema el ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.
- Identificar microscópicamente trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.
- Conocer los medios de cultivo apropiados para la ameba.
- Analizar las diferentes técnicas para el diagnóstico de amebosis.

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

### Ciclo biológico

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

### Cuadro clínico

Los trofozoitos causan necrosis del epitelio intestinal, penetran la mucosa, y provocan una úlcera.

Basado en los mecanismos patógenos, la amebiasis es variable en relación con los síntomas que causa en el ser humano. Los parásitos pueden establecerse

sólo en el intestino grueso (ciego, sigmoide y recto), pero las cepas más patógenas son capaces de invadir otro órganos a través de vasos sanguíneos. Esto significa que la amebiasis puede ser intestinal o extraintestinal. Dentro de las complicaciones puede presentarse perforaciones del intestino, peritonitis, abscesos hepáticos, extenderse hasta el pulmón y cerebro.

## Diagnóstico

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

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

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

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

En casos de sospecha de amebiasis extraintestinal se pueden realizar pruebas serológicas como: contraelectroforesis, inmunofluorescencia, ELISA, reacción de floculación, inhibición de hemaglutinación indirecta, precipitación en agar, fijación de complemento, inmovilización de trofozoitos, intradermorreacción con la histolicina. Se puede valorar el daño con placa radiográfica, colonoscopia, colon por enema, gammagrafía, centellografía, ultrasonografía, tomografía axial computada, resonancia magnética.

## MATERIAL

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

## MÉTODO

- Observar al microscopio las preparaciones fijas de las dos especies de *Entamoeba* en los objetivos 10, 40 y 100X (inmersión).
- Hacer descripción morfológica de lo observado.
- Realizar esquemas para su reporte.

## CUESTIONARIO

1. ¿Cómo es el ciclo de vida de la *Entamoeba histolytica*?
2. ¿Qué son los medios de cultivo axénicos, monoaxénicos y plurixénicos para aislar a las amebas?
3. ¿Cuál es el cuadro clínico de la Amebosis intestinal?
4. ¿Qué otros tipos de amebosis se pueden presentar?
5. ¿Cuáles son las principales medidas higiénico-dietéticas para la prevención de la amebosis?
6. ¿En qué difiere la disentería amebiana de la disentería bacilar?
7. ¿La progresión de una úlcera típica producida por *Entamoeba histolítica* podría poner en peligro la vida del paciente?

# **APARATO GENITOURINARIO**

**PRÁCTICA NÚM. 21**  
**DIAGNOSTICO DE SIFILIS**

## OBJETIVO

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

## INTRODUCCIÓN.

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

La infección con *Treponema* es exclusiva del hombre, ésta se transmite por contacto sexual y la lesión infecciosa se localiza en la piel o mucosas de los órganos genitales.

Las espiroquetas se multiplican localmente en el sitio de entrada y algunas se diseminan a los ganglios linfáticos locales y alcanzan la corriente sanguínea, de 2 a 10 semanas después de la infección aparece la pápula en el sitio de entrada y se desintegra para formar una úlcera de base limpia y dura (chancro duro), la inflamación se caracteriza por el predominio de linfocitos y células plasmáticas.

La Sífilis pasa por periodos clínicos relativamente bien definidos: etapa primaria, secundaria, terciaria y latente. Las lesiones primarias y secundarias son ricas en espiroquetas y son muy infecciosas, en las lesiones terciarias los *treponemas* son muy raros y la exagerada respuesta del tejido se atribuye a la hipersensibilidad, ocasionalmente se pueden encontrar *treponemas* en ojos o sistema nervioso central, en la Sífilis tardía.

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



1. Inespecíficas ( No treponémicas). Incluyen las pruebas de floculación como las de Khan, Mazzini, Kline, la prueba rápida de reagina. Las pruebas no treponémicas detectan anticuerpos IgG e IgM frente a cardiolipinas, colesterol y lecitina producidas por tejidos dañados por el treponema o por otras enfermedades. Por esta razón no son pruebas específicas para *Treponema pallidum* y RPR, que han demostrado ser muy útiles para el diagnóstico temprano de Sífilis se utilizan como tamizaje.
2. Específicas (Treponémicas). Detectan anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de *Treponema pallidum*. Las más comunes son FTA-ABS y la TPHA, ELISA. La FTA . ABS IgM es una prueba más específica, utiliza inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos séricos contra las espiroquetas, se efectúa en suero en Sífilis primaria y secundaria. Existen otras pruebas como TPI Ab (Anticuerpo Inmovilizante de *Treponema pallidum*).

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

## MATERIAL

1 jeringa de 3 ml.

Alcohol y ligadura

Centrífuga

Tubos de vidrio 13 x 100

Reactivos VDRL

Placa de vidrio.

## MÉTODO

- 1.- Obtener 3.0 ml de sangre y dejar coagular.
- 2.- Centrifugar y separar el suero.
- 3.- Colocar una gota de suero (0.05ml) sobre un portaobjetos.
- 4.- Añadir una gota de antígeno (0.05 ml) al suero y rotar la placa durante 4 minutos sobre una superficie plana, limitado a un círculo de 5 cms. de diámetro a razón de 120 rotaciones por minuto.
- 5.- La reacción se lee directamente después de la rotación.
- 6.- Es conveniente efectuar la reacción con controles positivo y negativo.
- 7.- Observación de resultados:

La reacción se lee al microscopio con objetivo seco débil.

Resultado positivo : observación de agregados

Resultado débil +: observación de agregados finos

Resultado negativo: No se observan agregados.

## CUESTIONARIO

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

## PRÁCTICA NÚM. 22

### UROCULTIVO

#### OBJETIVO

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

#### INTRODUCCION

La infección del tracto urinario (ITU) es la enfermedad más frecuente del aparato urinario. Afecta principalmente a mujeres. Las infecciones de tracto urinario se define como la presencia y proliferación de gérmenes en el tracto urinario. Habitualmente son bacterias raramente es micótica o vírica. Se pone en evidencia mediante el cultivo de orina en medios de crecimientos apropiados. Si hay bacterias crecerán formando colonias que pueden ser contadas como unidades formadoras de colonias por milímetro (UFC/m<sup>2</sup>).

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

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

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

Se utilizan diferentes técnicas para el urocultivo:

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

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

3. Se utiliza también el método de papel absorbente en el cual se atrapan las bacterias en el poro de este y se coloca en los medios de cultivo ya mencionados. Se procede al conteo de las colonias en estos medios de cultivo.

En general, las cuentas de menos de 10 000 bacterias por milímetro de orina indican contaminación.

Cuando el número está entre 10 000 y 100 000 se sospecha de infección, y si es mayor a 100 000 UFC/ml se confirma la sospecha.

## MATERIAL

Asa Bacteriológica calibrada .01 o .001 ml.

Mechero

Muestra de orina

1 caja agar sangre

1 caja agar chocolate

1 caja agar S110

1 caja agar EMB o Mac Conkey

1 caja agar Biggy.

## MÉTODO

1.- Coloque la muestra de orina cerca del mechero.

- 2.- Agite suavemente la muestra y destápela.
- 3.- Tome una asada de orina y siembre por estría simple en cada medio de cultivo proporcionado.
- 4.- Incubar a 37°C por 24 ó 48 horas.
- 5.- Leer contando cada una de las colonias desarrolladas y multiplicar según el asa utilizada.
- 6.- Guardar los cultivos para efectuar la identificación.

## CUESTIONARIO

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

## **PRÁCTICA NÚM. 23**

### **IDENTIFICACION DE BACTERIAS EN ORINA**

## OBJETIVO

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

## INTRODUCCION

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

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

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

## MATERIAL

Asa bacteriológica

Mechero

Juego de colorantes para Gram.

Cultivos de la sesión anterior

1 tubo TSI

1 tubo SIM

1 tubo Caldo manitol rojo de fenol

1 tubo caldo Urea

1 tubo Citrato de Simons

1 Microscopio

## MÉTODO

1.- Tomar una asada de una colonia del medio de cultivo EMB o Mac Conkey y sembrar en cada uno de los medios proporcionados.

2.- De la misma colonia preparar un frotis y realizar la tinción de Gram. Observar al microscopio con objetivo 100 x y aceite de inmersión.

3.- Incubar los tubos con los medios inoculados a 37° C / 24 horas.

4.- Leer resultados e interpretar utilizando las tablas bioquímicas y dar el diagnóstico de acuerdo con los resultado obtenido.

## CUESTIONARIO

1.-¿Cuál es el fundamento de la prueba TSI y cómo reportaría esta prueba en caso de encontrar Proteus y Escherichia coli?.

2.- ¿ Cuántos aspectos se pueden determinar en el medio SIM?.

3.- ¿Si encontramos crecimiento en el medio S110, qué pruebas utilizaría para la identificación de especie?.

4.- ¿Cuál es el fundamento de la prueba Caldo urea.

## **PRÁCTICA NÚM. 24**

### **EXAMEN GENERAL DE ORINA**

## (Sedimento Urinario)

### OBJETIVO.

- Que el alumno sea capaz de utilizar este examen de laboratorio como una de las principales herramientas de diagnóstico.

### INTRODUCCIÓN.

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

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

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



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

1. Examen físico. Que incluye color, aspecto, turbidez (una orina recién emitida es límpida o ligeramente turbia, pero puede enturbiarse debido a la refrigeración por precipitación de uratos amorfos) y densidad (anteriormente se utilizaban un urinómetro o un refractómetro ahora este análisis está dentro de los parámetros que mide la tira reactiva).
2. Examen químico. Antiguamente se basaba en reacciones químicas que ponían de manifiesto los compuestos químicos que se deseaba analizar y necesitando para ello todo un laboratorio de química analítica, en la actualidad este estudio se ha simplificado por el uso de tiras reactivas simples o múltiples por lo que ahora es un estudio sensible y rápido con el que se puede analizar hasta 9 pruebas diferentes en 60 segundos. Incluye determinaciones de densidad, pH, proteínas, glucosa, cetonas, sangre oculta, bilirubinas, urobilinógeno, reducción de nitritos, etc.
3. Examen microscópico. Este examen constituye una parte vital del análisis urinario, es una herramienta diagnóstica muy valiosa para la detección y evaluación de trastornos renales y del tracto urinario así como de otras enfermedades sistémicas, la mejor muestra es la primera de la mañana que está más concentrada y debe de observarse lo antes posible para evitar degeneración de células y cristales, si no es posible puede refrigerarse unas horas, aunque en orinas alcalinas y baja densidad pueden disolverse los cilindros o lisarse los eritrocitos, en ocasiones pueden utilizarse colorantes pero pueden enmascarar otras estructuras. En este análisis se incluye la observación de células (leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, etc), cristales, cilindros, microorganismos (bacterias, parásitos, hongos, etc), estructuras diversas (espermatozoides, filamentos de moco, gotas de grasa), artefactos (cristales de almidón, talco, vidrio, fibras, cabello, polen, etc.).

## MATERIAL.

Muestra de orina  
Tubos de ensayo de 18 x 150  
Gradilla  
Portaobjetos  
Cubreobjetos  
Centrifuga  
Microscopio  
Tiras reactivas

## PROCEDIMIENTO.

a) Para el examen físico.

1. Observar la orina y reportar color, olor, aspecto, turbidez, densidad y cantidad.

b) Para el examen químico.

- Sumergir la tira reactiva en orina bien mezclada y sin centrifugar, retirar la tira sin tocar las áreas reactivas con los dedos, en la orilla del frasco eliminar el exceso de orina.
- Verificar en el envase el tiempo para la lectura de resultados que viene en el envase.
- Comparar el color de las áreas reactivas con la tabla de colores del envase, la lectura debe realizarse con buena iluminación y en el tiempo requerido.
- Reportar por cruces, la densidad en valor numérico y cuando la tira marca leucocitos verificar con la observación microscópica.

c) Para el examen de microscópico (sedimento urinario).

- 1 Homogenizar la muestra en el frasco de recolección.
- 2 Separar 10 ml en el tubo de ensaye (3/4 partes del tubo).
- 3 Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos.
- 4 Eliminar el sobrenadante decantando, dejando solo el sedimento.
- 5 Resuspender el sedimento.
- 6 Colocar una gota pequeña en un portaobjeto bien limpio, de preferencia nuevo.
- 7 Colocar un cubreobjeto de 20 x 20 mm.
- 8 Observar al microscopio con poca luz o luz amortiguada (se logra cerrando parcialmente el iris del diafragma y ajustando el condensador hacia abajo hasta lograr el contraste óptimo) para lograr el mayor contraste que facilite no pasar por alto elementos como los cilindros y algunos cristales.
- 9 Enfocar primero con el objetivo seco débil y posteriormente con el seco fuerte.
- 10 Deben observarse por lo menos 15 campos y promediar para reportar los resultados.
  
- 11 Reportar los resultados en forma subjetiva las bacterias o cristales (escasos, regular cantidad, abundante, etc.) las células y cilindros en número por campo, las Trichomonas sólo como positivo, etc.

## CUESTIONARIO.

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

## PRÁCTICA NÚM. 25

## **CULTIVO DE SECRECIONES URETRALES Y VAGINALES.**

### **OBJETIVOS.**

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

### **INTRODUCCION.**

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

Los componentes de la flora normal generalmente son Lactobacilos (bacilos de Döderlein) y Estreptococos alfa hemolíticos cuyas alteraciones pueden indicar infecciones o cambios funcionales del aparato genital femenino.

La presencia de bacterias, levaduras y protozoarios como microorganismos importantes nos exige el empleo de una amplia utilización de métodos de estudio, como sería microscopia y medios de cultivo para poder identificar que produce esta infección.

En las infecciones crónicas con manifestaciones clínicas o sin ellas, es muy difícil tanto en hombres como en mujeres encontrar *N. gonorrhoeae*, por microscopía y se vuelve más difícil en mujeres asintomáticas, en este caso los cultivos bacteriológicos dan resultados positivos.

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

Toma de muestra en mujeres:

En las mujeres las muestras se deben tomar de:

Cérvix: es el mejor sitio.

- 1) Use el espejo vaginal y dos hisopos estériles. es conveniente el uso de hisopos de alginato, humedecerlo en agua destilada o solución salina.
- 2) Introducir el espejo vaginal y con un primer hisopo limpiar el moco que recubre el cérvix.
- 3) Con un segundo hisopo el exudado endocervical.
- 4) Sembrar con cada uno de ellos en los medios de cultivo indicados.
- 5) con un tercer hisopo hacer frotis y observación microscópica en fresco para buscar *Trichomonas*, levaduras, leucocitos, células epiteliales, etc.

Recto: De este sitio se pueden obtener cultivos positivos cuando el cultivo de cérvix es negativo.

- 1) Se debe limpiar perfectamente la zona perianal, introducir en el recto como a unos 2.5 cm de profundidad el número necesario de hisopos hasta que salga limpio de materia fecal visible.
- 2) Introducir un hisopo humedecido presionar las paredes del recto (criptas) para recolectar la muestra y sembrar en los medios de cultivos indicados.

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

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

Toma de muestra en hombres:

En el hombre el sitio más común de la infección gonocócica es la uretra.

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

## MATERIAL.

1 caja con agar Biggy

1 caja con Harina de Maíz

1 caja con agar chocolate

1 cepa *Candida albicans*

1 cepa *Neisseria gonorrhoeae*

Preparaciones fijas de frotis exudados vaginales y uretrales

1 microscopio

## PROCEDIMIENTO.

- 1.- Hacer frotis de Gram. con las cepas bacterianas proporcionadas..
- 2.- Sembrar en los medios de harina de maíz y Biggy la cepa de Candida proporcionada.
- 3.- Sembrar en agar chocolate la cepa de Neisseria proporcionada durante 24 horas a 37°.
- 4.- Observar la preparaciones fijas.

## CUESTIONARIO

- 1.- ¿Mencione los agentes causales más frecuentes de las vulvovaginitis?.
- 2.- ¿ Mencione los medios de cultivo indicados en las infecciones genitales?.
- 3.- ¿Describa las características morfológicas de la Trichomonas vaginalis? .
- 4.- ¿ Mencione las tinciones indicadas en la infecciones genitales?.

# **SISTEMA NERVIOSO Y ORGANO DE LOS SENTIDOS**

**PRÁCTICA NÚM 26  
MENINGITIS BACTERIANA**



## Objetivo

- Conocer las características morfológicas y de tinción, así como los métodos de cultivo e identificación de las principales bacterias causantes de meningitis bacteriana.

## Introducción

La meningitis bacteriana se define como un proceso inflamatorio producido por la infección bacteriana de la piamadre, aracnoides vascular, líquido cefalorraquídeo, ventrículos cerebrales, plexo coroideo y otros órganos del sistema nervioso, convirtiéndose en una infección cerebroespinal.

Dentro de los agentes causales, *Haemophilus influenzae* es la causa más frecuente de muerte, seguido de *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*.

- *Streptococcus pneumoniae* causa de un 30% a 50% de casos en adultos, de un 10% a 20% en niños y hasta un 5 % en lactantes.
- *Neisseria meningitidis* produce del 10% a 35% de los casos en adultos y un 25% al 40% en niños de hasta 15 años de edad y es poco frecuente en lactantes.
- *Haemophilus influenzae* tipo B responsable del 40% al 60% de casos en niños y únicamente del 1% al 3% de casos en adultos y prácticamente no se presenta en lactantes.

Otros agentes de importancia son: *Staphylococcus aureus* asociado a intervenciones neuroquirúrgicas, infecciones vertebrales y endocarditis. Los bacilos gramnegativos se asocian a traumatismos craneoencefálicos y procedimientos quirúrgicos, destacando *Escherichia coli*, *Klebsiellas*, *Proteus*, *Pseudomonas*, etc.

Las manifestaciones clínicas de los pacientes con una infección del SNC dependen de los siguientes factores: agente causal, localización de la infección, duración de la enfermedad, edad y estado previo de salud del paciente. Considerando estos factores, pueden presentarse diferentes situaciones.

La mayor parte de las infecciones del SNC se manifiestan como una enfermedad febril aguda o subaguda con afectación neurológica difusa. Los síntomas y signos más frecuentes son cefaleas, náuseas, vómitos y alteración del nivel de conciencia o de las funciones mentales. Este cuadro clínico se denomina síndrome meníngeo.

Ante un cuadro clínico de estas características, debe practicarse una punción lumbar (PL) para confirmar o descartar una posible meningitis viral o bacteriana. Sin embargo, algunos enfermos, además del síndrome meníngeo descrito, pueden presentar un mayor deterioro del nivel de conciencia (estupor o coma), con crisis convulsivas y disfunción cerebral difusa. En estos enfermos es preciso determinar por medio del examen de fondo de ojo y del estudio del encéfalo con Tomografía Axial Computarizada TAC, la presencia de Hipertensión Intracraneana (edema de la papila y de toda la retina del ojo y la presencia de distensión de los ventrículos por incremento del volumen del Líquido cefalorraquídeo. La hipertensión Intracraneana contraindica la punción Lumbar.

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

## **Material**

1. Asa bacteriológica
2. Microscopio
3. Juego de colorantes para tinción de Gram
4. Placa de Agar Sangre
5. Placa de Agar Chocolate
6. Placa de Agar EMB
7. Cepa de *Escherichia coli*
8. Cepa de *Neisseria sp*
9. Cepa de *Streptococcus pneumoniae*

## **Procedimiento**

1. Sembrar las cepas en las placas correspondientes por la técnica de estría cruzada. Reportar la morfología colonial a las 24 y 48 horas.
2. Realizar preparaciones y teñir con la técnica de Gram. Observar a 100X.

### **CUESTIONARIO**

1. ¿Cuál es el aspecto del líquido cefalorraquídeo que procede de una infección bacteriana?
2. ¿Cuántos tubos de muestra se extraen para el análisis del LCR? Justifique su respuesta.
3. ¿Qué valores de referencia se tienen para cada uno de los aspectos que comprenden al examen físico del LCR?
4. ¿Qué aspectos comprende el examen citológico del LCR?
5. ¿Qué aspectos comprende el examen qu del LCR?

### **PRÁCTICA NÚM. 27**

### **MENINGITIS VIRAL**

## Objetivos

- Conocer las principales características biológicas y los métodos de cultivo e identificación de los principales agentes causales de meningitis viral.

## Introducción

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

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

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

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

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

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

## **Procedimiento**

Presentación de Seminario

### **CUESTIONARIO**

1. ¿Qué aspectos incluye el análisis del LCR?
2. ¿Qué indica el aumento de leucocitos entre 100 y 200 por  $\text{mm}^3$  en una muestra de LCR?
3. ¿Qué alteraciones se pueden encontrar en el examen físico del LCR en el caso de meningitis viral?
4. ¿Qué alteraciones se pueden encontrar en el examen citológico del LCR en el caso de meningitis viral?
5. ¿Qué alteraciones se pueden encontrar en el examen químico del LCR en el caso de meningitis viral?

### **PRÁCTICA NÚM 28**

### **DIAGNOSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS**

## Objetivos

- Conocer e identificar las características morfológicas y el ciclo de vida de *Taenia solium* haciendo énfasis en la fase larvaria (*Cysticercus cellulosae*).

## Introducción

La neurocisticercosis es la infección de los órganos y el tejidos nervioso por las larvas quísticas de la *Taenia solium* (cisticercos), en la cual el paciente se comporta en forma similar al hospedero intermediario porcino, al ingerir los huevos infectantes del parásito provenientes de otro individuo portador de una *T. solium* en el intestino.

El cisticerco de la *T. solium* es una pequeña vesícula, de pocos milímetros o centímetros de diámetro, llena de líquido de tamaño variable, en muchos casos con un escólex o cabeza del parásito, plegada e invaginada en su interior. Se denomina cisticercos racemosos a los cisticercos en los cuales el escólex no puede ser identificado; constituyen quistes grandes o un conglomerado de vesículas de tamaño normal adheridos entre sí.

La cisticercosis, tanto humana como porcina es cosmopolita, afecta a comunidades rurales y urbanas con nivel socioeconómico y cultural bajo aunados a patrones higiénicos deficientes.

Con respecto al ciclo biológico, el hombre suele albergar en su intestino delgado un ejemplar único de *Taenia solium* (de donde procede el nombre de %solitaria+), el cual puede alcanzar una longevidad de hasta 25 años. Los anillos grávidos se desprenden periódicamente y salen al exterior durante la defecación, así llegan al suelo y pueden contaminar agua y verduras, o bien tras medidas higiénicas deficientes (ausencia o mal lavado de manos) contaminar alimentos.

Una vez que los huevecillos se ingieren, pasan al estómago y en el intestino delgado, eclosionan las oncosferas y ayudadas por sus ganchos, atraviesan la mucosa intestinal y son arrastradas a la circulación hepática; desde el hígado llegan al corazón por vía sanguínea, para diseminarse por todo el organismo y fundamentalmente a los músculos estriados esqueléticos.

Llegados a su destino comienzan a crecer, adquieren estructura vesiculosa y se forma el escólex en la pared interna de la vesícula; al cabo de unas 10 semanas han completado su desarrollo y se han transformado en larvas cisticerco. El *Cysticercus cellulosae*, como se denomina esta larva, mide unos 10 mm de largo y unos 5 mm de ancho y en su pared se observa una invaginación, del tamaño de un perdigón, en cuyo interior se halla ya formado el escólex de la futura tenia.

En muchos pacientes, los quistes permanecen asintomáticos. Cuando son sintomáticos, el periodo de incubación es altamente variable (de ordinario de 1 a 5 años, pero a veces más corto). Las manifestaciones se deben al efecto de masa, respuesta inflamatoria u obstrucción de los orificios encefálicos y sistemas ventriculares. Los datos neurológicos son variados e inespecíficos y son determinados en gran parte por el número y localización de los quistes.

### **Material**

- Microscopio
- Preparaciones fijas
- Cisticercos conservados en formol.

### **Procedimiento**

Observación de las preparaciones fijas a 40X y reportar los hallazgos.

## **CUESTIONARIO**

1.- En el caso de la ingesta de carne de cerdo mal cocida, ¿se puede desarrollar cisticercosis o teniasis? Explique su respuesta.

2.- Describa el ciclo biológico de *Taenia solium* especificando las derivaciones en teniasis y cisticercosis.

3.- ¿Cuál es la importancia de la oncosfera en el desarrollo de la cisticercosis?

4.- ¿Cuáles son las principales manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis?

5.-¿Cuáles son las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de la neurocisticercosis?

**PRÁCTICA NÚM 29**  
**CULTIVO DE CLOSTRIDIUM**



## Objetivo

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

## Introducción

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

### ***Clostridium botulinum***

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

### ***Clostridium tetani***

*Clostridium tetani* es el agente causal del **tétanos**; se trata de microorganismos grampositivos, anaerobios estrictos, que miden hasta 4 micras

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

GENERO	TOXINA	FISIOLOGIA
C. botulinum ( Botulismo)	Libera toxinas (toxina botulínica, ) se conocen siete variedades (A-G) <b>A, B y E</b> (ocasiones F) principales enfermedades en el ser humano. <b>A y B</b> se vincula con los alimentos <b>C</b> causa botulismo en aves <b>D</b> causa el botulismo en mamíferos <b>E</b> principalmente con alimentos de pesca	La toxina se absorbe en el intestino, va a torrente, a ganglios uniéndose a receptores de membrana presináptica en neuronas motiras del SNP y pares cráneales. Inhibiendo la liberación de acetil-colina dando como resultado la ausencia de contracción muscular y la presencia de parálisis.
C. tetani	Toxina tetanosmasmina	Se fija a receptores de membrana degradando a la sinaptobrevina (proteína necesaria para la aproximación de vesículas neurotransnisoras a la membrana presináptica) bloqueando la liberación deglicina y ácido -aminobutírico pero no inhibe las neuronas motoras. Esto da como resultado hiperreflexia, espasmos musculares y parális espástica.

### Material

- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen

- Agar Sangre
- Caldo tioglicolato
- Cepa de Clostridium sp.
- Colorantes para tinción de Gram
- Colorantes para tinción de esporas

### **Procedimiento**

- Con inóculo liviano sembrar la placa de agar sangre por la técnica de estría cruzada en cuatro cuadrantes. Reportar a las 24 horas.
- Con inóculo liviano realizar la inoculación del caldo tioglicolato por técnica de agitación. Reportar a las 24 horas.
- Realizar una preparación y teñir con tinción de Gram
- Realizar una preparación y teñir con la técnica de Shaeffer-Fulton

<b>Tinción de esporas (Shaeffer-Fulton).</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cubrir la preparación con verde de malaquita y calentar a emisión de vapores por un minuto. Es importante no permitir que la preparación se seque.</li> <li>2. Lavar con agua.</li> <li>3. Cubrir la preparación con safranina por 15 minutos.</li> <li>4. Enjuagar con agua.</li> <li>5. Dejar secar al aire.</li> </ol>
<b>INTERPRETACIÓN:</b> Las esporas se tiñen de color verde y el citoplasma de color rojo.

## CUESTIONARIO

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

## PRÁCTICA NÚM. 30

### IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO CLOSTRIDIUM

#### Objetivo

- Conocer las principales pruebas para la diferenciación de las especies de Clostridium que afectan al SNC.

#### Introducción

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

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

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

## **Material**

1. Asa bacteriológica
2. Mechero de Bunsen
3. Tubos con caldo glucosado con sello
4. Tubos con leche tornasol.
5. Tubos con medio SIM
6. Cultivo de Clostridium de la sesión anterior.

## **Procedimiento**

1. Inocular cuidadosamente cada prueba bioquímica con inóculo tomado del cultivo de la sesión anterior. Reportar los resultados a las 24 horas.

## **CUESTIONARIO**

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

## **BIBLIOGRAFÍA BÁSICA**

1. Jawetz E, et al. Microbiología Médica. 25ª ed. Mc Geaw . Hill Interamericana de España S. L.; 2011.
2. Murray P.R, Pfaller M.A., Rosenthal. Microbiología Médica. 6ª ed. Elsevier; 2009.
3. Mims C, Playfeir JH, Roitt I. Microbiología Médica. 2ª ed. Elsevier; 1999.
4. Ash Lawrence R. Atlas de Parasitología Humana. 5ª ed. Panamericana 2010.
5. Prats G. Microbiología Clínica. Panamericana S. A. 2010.
6. Koneman E. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. Panamericana 1999.
7. Becerril MA. Parasitología Médica. 3ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.L. 2011.
8. Romero C. R. Microbiología y Parasitología Humana. Medica Panamericana 2000.
9. Prats G. Microbiología, Virología y Parasitología. Médica Pnamericana S.A. 2012.
10. Mac Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana. 2003.

## **BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA**

- 1.- Tortora, GJ; Funke, BR; Case, CL. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Ed. Médica Panamericana. México 2007.
- 2.- Tay, Lara, Velasco, Gutierrez. Parasitología Médica. 6ª ed. Ed. Méndez editores. 1996.
- 3.- Bonifaz, A. Micología Básica. 3ª ed. Ed. Mc Graw Hill. 2010.
- 4.- Collier, L; Oxford, J. Virología humana 3ª ed. Ed. Mc Graww Hill. 2008.
- 5.- López PMC, Corredor AA, NichollsORS. 2ª ed. Manual Moderno Colombia 2012.

## **APOYOS EN LÍNEA PARA EL APRENDIZAJE**

1. Departamento de Microbiología y parasitología UNAM. Facultad de Medicina <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/micosis>.
2. [www.salud.gob.mx/unidades/ddi/nomssa.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/ddi/nomssa.html) 027 y 032.
3. [www.paltex.poho.org](http://www.paltex.poho.org).

## **EVALUACIÓN.**

La evaluación de laboratorio es determinada para cada alumno en base a los resultados obtenidos en las evaluaciones previas, exposición de seminario, el trabajo desarrollado en la práctica y en la entrega de un reporte.

Para determinar las evaluaciones previas y el trabajo desarrolla en la practica es necesario la presentación de un reporte de practicas, conteniendo las siguientes características:

- El reporte de cada practica deberá ser entregado en la siguiente sesión de laboratorio, en el momento de realizar la siguiente práctica.

- El reporte de la práctica se entregara en folder adicional y deberá constar de:

a) Objetivo

b) Introducción

c) Resultados

d) Conclusiones

e) Cuestionario

f) Bibliografía. Anotar los libros consultados (3 citas como mínimo), en la elaboración del reporte, la cual deberá ser actualizada y siguiendo los criterios de Vancouver.

- Exámenes parciales, se realizara un examen antes de cada práctica, de acuerdo al numero de practicas, si no se acreditan los exámenes parciales se hará un examen final abarcando todas las practicas que se realizará en una fecha posterior al final del módulo.

- Evaluación total de laboratorio, se determina en base al siguiente porcentaje:

A) Promedio de exámenes 70%

B) Promedio de evaluación previa 15%

C) Promedio de reportes 15%



