

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



**Universidad de El Salvador**  
*Hacia la libertad por la cultura*

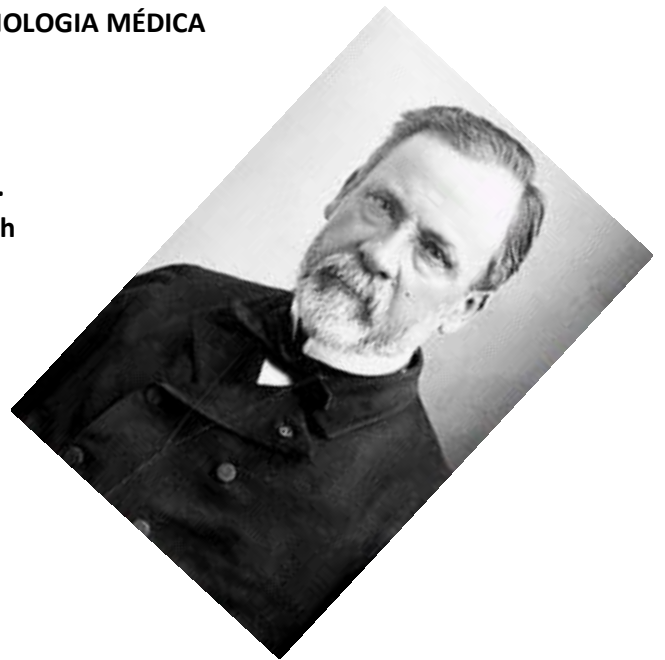
# MANUAL Y PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA OCULAR

LICENCIATURA EN OPTOMETRIA. ESCUELA DE TECNOLOGIA MÉDICA

COORDINADOR

DR. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO, PhD.MD. Prof.  
Médico Microbiólogo Salubrista Scientific Research

**CICLO I-2019**



**27 de diciembre de 1822.Francia**

## 1. GENERALIDADES

**CARRERA** : Licenciatura en Optometría

**ASIGNATURA** : Microbiología Ocular

**CÓDIGO** : MPM 1101

**CICLO DE ESTUDIO** : III ciclo, segundo año

**PRERREQUISITOS** : Biología Humana ( Bioquímica, Anatomía General, Fisiología General )

**ASIGNATURAS CORRESPONDIENTES AL III CICLO:**

Introducción a la Optometría

Óptica Geométrica

Fisiología Ocular y Neurofisiología de la Visión

Anatomía

**UNIDADES RESPONSABLES** : Escuela de Medicina ,Departamento de Microbiología

**UNIDADES DE APRENDIZAJE** : 3 uv

**HORAS PRESENCIALES:** 82 horas presenciales con alumnos

**ACTIVIDADES** :

Clases teóricas

Prácticas de laboratorio

Seminarios

Artículos científicos

## 2. GENERALIDADES DE LA ASIGNATURA

Los estudiantes de Licenciatura en Optometría aprenderán los aspectos básicos de la microbiología ocular y la importancia de su estudio en la salud ocular, ya que en la asignatura se estudian contenidos de una microbiología general ocular. Con los conocimientos básicos de una microbiología adquiera las habilidades y destrezas para que pueda referir al médico oftalmólogo cualquier anormalidad que detecten en el examen visual, además de educar al paciente para prevenir infecciones mediante la aplicación de medidas higiénicas que reduzcan la probabilidad de contaminaciones con microorganismos.

De acuerdo al perfil de los estudiantes, la Microbiología Ocular inicia con los contenidos básicos de una microbiología general , para facilitar posteriormente el estudio de los grupos de agentes infecciosos: bacterias , virus, hongos y parásitos, que causan enfermedades en el ojo y sus anexos , incluyendo los mecanismos generales de la respuesta inmune del hospedero enfatizando los que acontecen a nivel ocular, se describen algunas técnicas de diagnóstico microbiológico y las medidas de prevención y control .

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Que al finalizar el curso, los estudiantes tengan la capacidad de : Interpretar las características estructurales, funcionales y ecológicas de los agentes causales de las enfermedades oculares y sus anexos, sus mecanismos de patogénesis ,patologías , respuesta inmune del hospedero, procedimientos diagnósticos de laboratorio y las medidas de prevención y control .

#### Objetivos afectivos

Que los estudiantes tengan la capacidad de :

1. Fortalecer la capacidad de trabajar en equipo
2. Adquirir conocimientos practicando diferentes formas de enseñanza
3. Participar con responsabilidad de su propio aprendizaje
4. Desarrollar el hábito del estudio y la capacidad de ser autodidactas
5. Fomentar los valores y la convivencia con sus semejantes

#### Objetivos psicomotores

Que los estudiantes tengan la capacidad de :

1. Practicar la técnicas básicas en el laboratorio de microbiología
2. Conocer algunas características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos que causan enfermedades oculares.
3. Desarrollar la habilidad para trabajar en equipo
4. Fortalecer las habilidades para exponer los contenidos teóricos en actividades de seminarios y clases tutoriales por medio de guías.

#### 4.COMPETENCIAS DE HABILIDADES Y DESTREZAS:

1. Capacitar a los estudiantes para conocer procesos infecciosos en el ojo y sus anexos para referir a los pacientes al especialista en oftalmología y prevenir complicaciones posteriores ..
2. Adquirir los conocimientos para educar a los pacientes y a los demás miembros de la comunidad en la prevención de infecciones oculares.
3. Participar en el equipo responsable de mantener la salud integral, en la que se incluye la salud visual.

4. Contribuir positivamente al mantenimiento y mejora de la salud ocular.

## 5. ACTIVIDADES ACADÉMICAS

FORMA DE ENSEÑANZA	NUMERO DE HORAS	NUMERO DE ACTIVIDADES	HORAS POR ACTIVIDAD
Clases teóricas	44	22	2
Laboratorios	28	10	2 a 4 horas
Seminarios con artículos científicos	11	11	1
<b>TOTAL</b>	<b>83</b>	<b>43</b>	

## 6. METODOLOGIA

### I. Clases TUTORIALES. (45%). Días lunes de 8 a 11 am en Local de optometría

En las clases tutoriales se desarrollarán los temas basados en los objetivos del programa el cual trata de temas generales de la microbiología general o de un microorganismo o agente infeccioso. La duración de la actividad es de al menos una hora con treinta minutos incluyendo discusión grupal. Se le proporcionará una guía al estudiante para el desarrollo de la clase y ser discutida con el grupo de estudiantes. Se distribuirá el número de clases entre los estudiantes por tema que puede ser individual o en parejas. Pueden hacer uso de carteles, separatas, multimedia u otros, el libro de texto es Murray y/o **Jawetz** u otro que considere apropiado. Tienen cuarenta y cinco minutos de clase y el resto de treinta para discusión. La nota se pondera así: **2.5 % presentación escrita con folder y 2.5 % exposición, 40% de 3 parciales para un total de 45 % de su nota evaluativa.** No hay diferido de clase, tiene cero de nota si no presenta la clase y se dará por vista. No hay examen final. El examen parcial serán tres y se dividirá entre el número de clases, será sobre lo visto en clase cada semana. Cada tema y guía tiene que estar desarrollado escrito en folder y entregado al coordinador una semana antes para distribución de estudiantes por el expositor y ser discutido el tema en la exposición. Se pasará lista en cada clase para firmar asistencia por estudiante. Se Entregará bibliografía en PDF para consulta.

Para el desarrollo del curso los contenidos teóricos se dividen en seis áreas que se describen a continuación:

1. Generalidades de la microbiología

2. Introducción a la inmunología
3. Bacterias causantes de infecciones oculares
4. Hongos causantes de infecciones oculares
5. Parásitos causantes de infecciones oculares
6. Virus causantes de infecciones oculares

#### **OBJETIVOS PARTICULARES DE CADA AREA**

Que al finalizar el curso los estudiantes tengan la capacidad de:

1. Identificar los aspectos generales que comprende la microbiología
2. Conocer el tipo de respuesta del sistema inmune a nivel ocular y los factores y mecanismos de defensa que participan.
3. Describir las bacterias de importancia clínica en infecciones oculares, su fisiología, factores de patogenia, ecología, diagnóstico microbiológico, epidemiología, prevención y control.
4. Describir los hongos de importancia clínica en infecciones oculares, su fisiología, factores de patogenia, ecología, diagnóstico de laboratorio que facilitan su identificación.
5. Describir los virus de importancia médica en infecciones oculares, su fisiología, factores de patogenia, ecología, diagnóstico clínico que facilitan su identificación.
6. Describir los parásitos de importancia médica en infecciones oculares, su fisiología, factores de patogenia, ecología, diagnóstico clínico que facilitan su identificación

#### **Temas de clases tutoriadas:**

1. Historia de la microbiología.
2. Técnicas de observación microbiana ocular mas frecuentes
3. Agentes físicos en el control microbiano
4. Desinfectantes y antisépticos de uso en optometría
5. Agentes químicos en el control microbiano
6. Flora humana normal. Película lagrimal
7. Infecciones oculares, toma de la muestra, procesamiento de laboratorio
8. Morfología y estructura bacteriana
9. Nutrición y metabolismo bacteriano
10. Generalidades de Bacterias causantes de enfermedades oculares
11. Generalidades de micología causantes de enfermedades oculares
12. Generalidades de parasitología causantes de enfermedades oculares
13. Generalidades de virología causantes de enfermedades oculares.
14. Generalidades de diagnóstico clínico y diferencial de infecciones oculares
15. Epidemiología de las enfermedades infecciosas oculares

16. Fisiopatogenia y patogenia de infecciones oculares
17. Complicaciones oculares causadas por microorganismos
18. Prevención y control de enfermedades oculares
19. Antibióticos, antiparasitarios, antifúngicos y antivirales más frecuentes usados en infecciones oculares
20. Generalidades de inmunología ocular
21. Respuesta Antígeno Anticuerpo
22. Genética microbiana

Se proporcionará por el coordinador 22 guías de clase, para ser desarrollada por el estudiante en forma individual o por parejas según se estime conveniente por número total de estudiantes una semana antes de la exposición. Entregará reporte escrito de clase con base a la guía proporcionada, la que servirá para exámenes parciales. El reporte tendrá un mínimo de 15 páginas y un máximo de 25 páginas en formato Word, times new Román 11, a espacio y medio a doble cara con Bibliografía en folder sencillo.

**Se evaluará:** 5 % reporte escrito clase en folder con bibliografía y 5 % exposición clase. 3 parciales 35 %. Los parciales serán sobre las guías y exposición de clase. Todos los estudiantes contarán con la clase escrita y guía desarrollada para los exámenes teóricos.

## **II.Seminarios/artículos (20%). Días viernes de 8 a 10 am. Local de optometría.**

Se asignarán al inicio del ciclo, se organizarán los grupos por orden de lista, los temas van a ser sorteados y se dará la fecha de exposición. Los estudiantes harán una revisión bibliográfica, al final se expondrán los temas con equipo multimedia y se entregará un informe escrito. Se trabajará en parejas o en grupos de tres estudiantes. Además entregará un artículo científico de microbiología ocular del tema para ser comentado en diez minutos. Se pasará lista en cada seminario para firmar por estudiante. Se hará examen corto del seminario.

### **TEMAS DE SEMINARIOS :**

1. Bioseguridad para optometristas
2. Alergias oculares
3. Infecciones relacionadas con lentes de contacto
4. Infecciones oculares producidas por clamidias
5. Diagnostico microbiológico de infecciones oculares
6. Principales parásitos causantes de infecciones oculares

7. Principales Virus causantes de infecciones oculares
8. Principales Bacterias causantes de infecciones oculares
9. Principales Hongos causantes de infecciones oculares
10. Control y tratamiento de los microorganismos que causan infecciones oculares
11. Traumas oculares y su relación con infecciones oculares.

**El informe escrito deberá contener el siguiente orden lógico:**

1. Carátula
2. Índice
3. Introducción
4. Objetivos generales y específicos
5. Introducción del tema, historia
6. Agente causal, morfología, fisiología, estructura, ciclo de vida según caso.
7. Condiciones de crecimiento, Estructura antigénica.
8. Epidemiología
9. Patología, patogenia
10. Enfermedad clínica
11. Diagnóstico de laboratorio en optometría
12. Diagnóstico diferencial
13. Complicaciones
14. Prevención y control
15. Referencias bibliográficas.
16. Anexos

Se evaluará:

**Informe escrito anillado con artículo científico 10 %**

**Calidad de la presentación con power point 5 %**

**Defensa y Exámen escrito 5 %**

Los temas se van a exponer en el transcurso del ciclo, por lo tanto se tienen fechas asignadas para cada seminario y a los estudiantes a, los que corresponden los primeros temas deberán acercarse a la coordinación para las respectivas asesorías según hora disponible. Se presentaran formal a la exposición varones con manga larga y pantalón negro y señoritas blusa y pantalón negro. El grupo se encargara del equipo multimedia.

**III.Prácticas de laboratorio (30%).**

**Días martes y miércoles de 7 a 9 am en el departamento de microbiología de la Facultad de Medicina segundo nivel.**

**Es obligatorio presentarse con su gabacha gris manga larga, guantes, mascarillas, gafas, conservar las medidas de bioseguridad, de lo contrario no podrá realizar sus prácticas. Presentarse diez minutos antes de cada práctica. Hay prácticas con dos sesiones de grupo en días diferentes.**

El alumno deberá llevar impreso su manual de laboratorio completo. No existe cobro alguno, ni venta de manuales ni cuotas de laboratorio por el momento si así lo fuere se gestionara en colecturía de la facultad de Medicina con previa aprobación de junta directiva.

Son diez prácticas de laboratorio. Antes de cada laboratorio, deberán ser leídas previamente, se contestará el cuestionario, se harán anotaciones de los resultados y observaciones durante la práctica. También leer las clases teóricas relacionadas con el tema y la bibliografía correspondiente. Al inicio de cada laboratorio, se hará un examen corto de los contenidos vistos de la práctica anterior (Sera de diez preguntas por escrito). El estudiante deberá presentarse con su gabacha gris y manual de laboratorio, anotar y hacer esquemas de cada laboratorio que le serán de utilidad para comprender los contenidos. Se pasara lista en cada laboratorio para firmar por estudiante.

#### **COMPETENCIAS DE HABILIDADES Y DESTREZAS EN LABORATORIO:**

1. Capacidad de organización y planificación.
2. Capacidad para resolver problemas.
3. Capacidad para tomar decisiones.
4. Tener capacidad para trabajar en equipo y para relacionarse con otras personas del mismo o distinto ámbito profesional.
5. Tener capacidad para el manejo del microscopio
6. Tener capacidad en métodos y técnicas de laboratorio.

#### **MATERIALES QUE EL ESTUDIANTE DEBERÁ LLEVAR PARA EL LABORATORIO**

1. Gabacha gris manga larga limpia.
2. Caja de fósforos
3. Papel higiénico o papel toalla
4. Lápiz graso o tirro
5. Jabón
6. Alcohol gel

7. Toalla de manos
8. Mascarillas, guantes de látex, gafas
9. Zapato cerrado.

### **PRACTICAS DE LABORATORIO**

1. Introducción al laboratorio de microbiología. Uso del microscopio
2. Cultivo bacteriano .Técnica de estrías
3. Frotis . Tinción simple y compuesta
4. Acción del calor en el control microbiano
5. Desinfectantes y antisépticos en el control microbiano
6. Reacciones antígeno-anticuerpo
7. Flora humana normal y ambiental
8. Bacterias causantes de infecciones oculares
9. Hongos causantes de infecciones oculares. Demostrativo.
10. Parásitos causantes de infecciones oculares. Demostrativo.

Se evaluará: 10 exámenes cortos de practica anterior a la siguiente semana en local de laboratorio B, los días martes de cada semana.

#### **NOTA :**

La asistencia a todas las actividades es obligatoria, después de los 15 minutos se considera como inasistencia, excepto en los casos que presente por escrito la justificación debidamente comprobada. No hay prácticas diferidas. Los exámenes cortos diferidos serán orales.

### **EVALUACION**

No	ACTIVIDAD.	PORCENTAJE
3	Exámenes parciales.	40 %
22	Clases tutoriadas. (2.5% presentación escrita ,2. 5 % exposición)	5 %
10	Exámenes cortos de prácticas de laboratorio	30 %
11	Seminarios	20 %
	Nota formativa	5 %
<b>Nota de promoción</b>		<b>100 %</b>

Por ley no hay examen final ni acumulativo. Solo suficiencia. El examen de suficiencia lo realizan los estudiantes con promedio nota final no alcanzó el 6.0.

### **COMPETENCIAS EVALUADAS**

El manual es propiedad de la Facultad de Medicina. Microbiología Ocular. Universidad de El Salvador. Prohibida su reproducción parcial o total con fines comerciales. Lo imparte el departamento de microbiología. Escuela de Medicina/Escuela de Tecnología Médica.

<b>Competencia Evaluada</b>	<b>Métodos / Instrumentos Criterios de Valoración</b>	Examen escrito clases      40 %  - Dominio de la materia.  - Coherencia en las respuestas.  - Capacidad y análisis de comprensión.  -Análisis y síntesis contenidos del tema  -clases tutoriales 5 %
<b>Competencia Evaluada</b>	<b>Ponderación Métodos / Instrumentos Criterios de Valoración</b>	Seminarios  - Exposición de un trabajo en grupo. Se evaluará la claridad expositiva y la capacidad de ceñirse al tiempo fijado de exposición.  - Se evaluará un resumen del trabajo presentado al profesor, en función de su contenido, redacción y capacidad de ceñirse a la extensión máxima fijada por el profesor.  - Se evaluará la defensa de la clase expositiva
<b>Competencia Evaluada</b>	<b>Ponderación Métodos / Instrumentos Criterios de Valoración</b>	Prácticas de laboratorio  - Asistencia obligatoria.  - Motivación, atención y destreza en el laboratorio.  - El contenido de las prácticas se evaluará en el examen escrito.
	<b>Ponderación</b>	<b>20 %</b>  <b>30 %</b>

## BIBLIOGRAFÍA.

Murray P:R: ,Rosenthal y Pfaller. Microbiología Medica. 5ª edición, Elsevier. España. 2006  
 Brooks, G:F: y Moarse. Microbiología Medica de Jawetz, Melnick. 18 edic. Edit. Manual Moderno.  
 Mexico .2005

- Botero, D. y Restrepo M. Parasitosis humana. 4ª. Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín Colombia. 2003.
- Arenas-Guzman, R. Micología médica ilustrada. 2ª edición. Mc Grs. Hill Interamericana editores S.A.de C.V. México, D.F. 2003.
- Sherris, DC: Y Champoux, C. Microbiología Médica, 3ª ed., Ediciones Doyma, 1993.
- Rojas, Immunología. Edit CIB. Colombia. 2012
- Zinsser (Joklin-Willett-Amos-Wilfert) Microbiología 20ª ed. Editorial Médica Panamericana, 1994.
- Benenson, AS. El Manual Para el Control de las Enfermedades Transmisibles, 16ª ed.,
- Henry, JB. Diagnóstico y tratamientos Clínicos por el laboratorio. 9ª. Edición. Ediciones científicas y técnicas , S.A. Barcelona, España. 1993
- Kanski, J. Oftalmología clínica. 7ª edición edit Elsevier. 2012.

## REGLAMENTO ACADEMICO

### Tipos de Evaluación del Aprendizaje.

**Artículo 135.** La evaluación de los aprendizajes en la Universidad de El Salvador, comprende la evaluación diagnóstica, formativa y sumativa en forma integrada.

a) Evaluación diagnóstica, es un conjunto de acciones, que deben realizar los docentes al inicio de una unidad de aprendizaje, a fin de obtener información de los estudiantes, con el propósito de la toma de decisiones para una mejor orientación del proceso de enseñanza aprendizaje;

b) Evaluación Formativa, está referida a los distintos aspectos del desarrollo humano, donde el docente y los estudiantes interactúan, siendo el primero facilitador del conocimiento. Forma en valores a los estudiantes para conocer, interpretar las actitudes de estos, a efecto de transformarlas para mejorar en este su aspecto personal y profesional, a fin de modificar y mejorar el proceso de enseñanza aprendizaje; y

c) La Evaluación Sumativa, es el proceso mediante el cual el docente mide y cuantifica el nivel de aprendizaje adquirido por el estudiante, respecto a los contenidos de la unidad de aprendizaje. Proporciona información para realizar una medición del conocimiento. Mide resultados.

**Artículo 146.** Para efectos de asignar una calificación a una evaluación en los procesos de aprendizaje, se utilizara una escala de notas de cero punto cero cero (0.00) a diez punto cero cero (10.00).

La nota mínima de aprobación por unidad de aprendizaje será de seis punto cero cero (6.00) para las carreras a nivel de grado, debiendo obtener al final de la carrera el Coeficiente de Unidades de Merito establecido en el Reglamento correspondiente.

**Artículo 147.** El estudiante para tener derecho a las evaluaciones en cada unidad de aprendizaje, deberá tener una asistencia a las actividades académicas mayor o igual al 75%.

### Revisiones.

**Artículo 148.** Una vez publicada la nota de la medición sumativa, los estudiantes que no estén conformes con la misma, tendrán derecho dentro de los tres días hábiles siguientes a la publicación oficial de estas, a solicitar en forma individual y por escrito la revisión ordinaria de la prueba ante el Jefe o Director de Escuela responsable.

**Artículo 150.** Si el estudiante no se presenta a una evaluación por causa justificada, éste podrá solicitar por escrito su realización en forma diferida a más tardar dentro del tercer día hábil de haberse realizado ésta, ante el jefe de departamento o director de escuela, quien resolverá a más tardar al día siguiente hábil de presentada la solicitud , concediéndola o denegándola

**Artículo 151.** Se admitirán únicamente como motivos justificativos de ausencia a una actividad evaluada Sumativa, los siguientes:

- a) Problemas de salud;
- b) Problemas laborales;
- c) Muerte del cónyuge o parientes hasta el segundo grado de consanguinidad;
- d) Programación de dos o más evaluaciones en la misma fecha;

- e) Cumplimiento de actividades oficiales;
- f) Cumplimiento de misiones oficiales; y
- g) Caso fortuito y fuerza mayor debidamente comprobados.

### **Repetición de Pruebas Sumativas.**

**Artículo 152.** Cuando en una prueba sumativa ordinaria escritas, resultaren reprobados entre el 51 y 60% de estudiantes, estos tendrán derecho a solicitar al Jefe de Departamento o Escuela respectivo, la repetición de la prueba en la unidad de aprendizaje de que se trate, dentro del plazo de tres días hábiles después de haber sido publicadas oficialmente las notas. El jefe de Departamento o Director de Escuela vista la solicitud, resolverá señalando lugar, día, hora y responsable de practicar la prueba dentro de las 48 horas siguientes a la solicitud previo notificación a los solicitantes.

Cuando resultaren reprobados más del 60 % de estudiantes en una prueba sumativa, esta se repetirá de oficio, observando el trámite anterior.

En ambos casos, el Jefe de Departamento o Director de escuela, junto con el docente responsable efectuaran un análisis de los factores que ocasionaron los resultados, a efecto de establecer criterios que mejoren el proceso de aprendizaje.

La repetición de pruebas se realizará una sola vez y a ella se someterá solo los estudiantes que así lo deseen. La nota obtenida en la prueba repetida sustituirá a la anterior.

### **Pruebas de Suficiencia.**

**Artículo 153.** Los estudiantes de todas las Facultades de la Universidad de El Salvador que al finalizar el ciclo académico, obtuvieren una nota final entre cinco punto cero cero (5.00) y cinco punto noventa y cuatro (5.94) en una Unidad de Aprendizaje, tendrán derecho a un examen de suficiencia, en el cual se examinaran todos los contenidos desarrollados en la misma y podrán incluir pruebas y/o prácticas clínicas o de laboratorio y otros, según las particularidades de la especialidad.

**Artículo 154.** En el caso de la realización de la prueba de suficiencia, la nota obtenida en el mismo se promediará con la nota final obtenida en el ciclo, y el resultado será la nota final definitiva que deberá registrarse en la respectiva Administración Académica. Para las pruebas de suficiencia no aplicara la repetición de pruebas.

**Artículo 155.** Cuando se compruebe fraude por parte del estudiante en la realización de una evaluación, se sancionará según la gravedad de la misma, de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento Disciplinario de la Universidad de El Salvador.

## **UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

## MANUAL PRACTICAS DE LABORATORIO



**MICROBIOLOGIA OCULAR**

**2019**

**COORDINADOR**

**DR. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO, Ph.D.MD, Prof.**

**JEFATURA DEPTO DE MICROBIOLOGIA DE MEDICINA  
Lic William Armando Merino**

**DIRECTORA LICENCIATURA EN OPTOMETRIA DE TECNOLOGIA MÉDICA**

**LICDA LILIANA ALFARO DE MURCIA**

# 1

## PRACTICA No. 1

### NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. USO DEL MICROSCOPIO.

---

#### INTRODUCCION

**P**ara estudiar a los microorganismos que causan enfermedad al humano, se requiere de procedimientos, técnicas, materiales, equipos y normas que en el primer laboratorio el estudiante tendrá la oportunidad de conocer y poner en práctica en el desarrollo de las prácticas de la asignatura. Toda persona que labora en el área de microbiología debe conocer las normas básicas de seguridad y el manejo adecuado de los materiales y equipo necesarios para el trabajo en esta especialidad. Deberá presentarse con gabacha manga larga gris, mascarilla, lentes y guantes en sus prácticas de laboratorio, para evitar contraer enfermedades según nivel de seguridad.

#### OBJETIVOS

Que al finalizar la práctica el estudiante:

- a) Aplique las normas de seguridad en el laboratorio de microbiología
- b) Conozca el equipo y materiales de laboratorio de un laboratorio de microbiología
- c) Conozca las partes de un microscopio de luz y el uso adecuado del mismo.

#### MATERIAL Y EQUIPO

Un microscopio

Frotis coloreado con *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*.

Papel limpia lentes

#### NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

1. El estudiante debe tener presente que durante el desarrollo de las prácticas de laboratorio, estará manejando material infeccioso o potencialmente infeccioso, por lo que deberá tomar en cuenta algunas normas de seguridad para su protección y la de sus compañeros.
2. Deberá presentarse al laboratorio con su gabacha, lentes y guantes. Quien no lo haga no hará el laboratorio.

3. La gabacha gris deberá estar confeccionada con tela resistente a la penetración de líquidos, manga larga, que cubra hasta la rodilla. Debe utilizarse abotonada y mantenerse limpia.
4. No deberá usar la gabacha de laboratorio en comedores, bibliotecas, salas de reuniones y otros .
5. La gabacha deberá llevarse a casa en bolsa plástica para ser lavada en forma individual.
6. Durante el desarrollo de su trabajo evite el contacto de sus manos con la boca, ojos, nariz, cara y cabello.
7. Deberá usar las uñas recortadas para evitar acumulación de suciedad o contaminación; así como también evitar el uso de anillos, pulseras u otras prendas que puedan contribuir a su contaminación.
8. No deberá fumar, maquillarse, comer o masticar chicle en las áreas de laboratorio. Las señoritas deberán recoger su cabello si es demasiado largo. Se recomienda el uso de zapatos cerrados para evitar contaminaciones.
9. Si accidentalmente se contaminara la boca o los ojos con algún cultivo, enjuáguese inmediatamente con abundante agua tibia. Sí en el caso fuese la boca, enjuáguese con la solución débil de peróxido de hidrógeno (1%).
10. Las mesas de trabajo deberán ser adecuadamente desinfectadas, antes y después de cada práctica. con el agente químico proporcionado para tal fin.
11. En caso de romper un tubo, caja de Petri u otro frasco que contenga microorganismos o que se derrame su contenido, cubra el material derramado con desinfectante, coloque un papel absorbente encima y espere de 10 a 15 minutos.
12. Todo material en uso que presuma está contaminado (pipetas, cajas de Petri, tubos, láminas, etc.), deberá ser colocado, al terminar de usarse, en los depósitos asignados.
13. Si sus manos se contaminan accidentalmente, pida inmediatamente la colaboración de su instructor para que se le aplique un antiséptico correspondiente.

14. Las bacterias en un frotis fijado pueden no estar muertas, por lo tanto manéjelos con cuidado y descártelos en el depósito apropiado.
15. Descartar el material contaminado que haya usado durante la práctica en los recipientes adecuados.
16. Para evitar accidentes graves, siempre rotule: láminas, cultivos o algún otro recipiente que contenga material potencialmente infeccioso.
17. Antes de retirarse del laboratorio se lavará las manos con abundante agua y jabón.
18. No tocar los microscopios con guantes, deberá quitárselos para enfocar, luego se los pondrá de nuevo para otros procedimientos.

## **DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.**

El docente hará una demostración para que los estudiantes practiquen lo concerniente a la práctica.

### **1. Uso del desinfectante**

El desinfectante debe aplicarse sobre su mesa de trabajo, antes y después de finalizada su práctica de laboratorio. Los desinfectantes son sustancias de naturaleza química que se aplican sobre objetos o materia inerte, con el fin de eliminar microorganismos especialmente patógenos. Los que más se utilizan en los laboratorios de Microbiología son: el cloruro de benzalconio al 0.1 % y fenol 5 %. Por su naturaleza irritante los desinfectantes deben manipularse con precaución, por lo que es recomendable lavarse bien las manos con abundante agua y jabón después de utilizarlos.

### **2. Uso del mechero**

El mechero es un instrumento de uso rutinario en el laboratorio de microbiología. Funciona a base de gas propano y el flujo está regulado por medio de dos válvulas; una adaptada a la tubería central y la que trae el mechero. Antes de encenderlo :

- ✓ Cerciórese o revise de que ambas válvulas estén cerradas y de que la manguera o tubo que facilita el paso del gas desde la tubería al mechero, esté en buenas condiciones.
- ✓ Colóquelo a una distancia aproximada a los 25 centímetros de la orilla de su mesa de trabajo; en caso de emergencia, esta distancia le permitirá cierto grado de movilidad o seguridad.
- ✓ Encienda el mechero colocando el chispero o el fósforo encendido, a un lado del tubo y

cercano a la boquilla del mismo; nunca sobre la boquilla.

- ✓ Apague el mechero inmediatamente después de finalizado su trabajo. No lo deje encendido innecesariamente
- ✓

### 3. Esterilización del asa bacteriológica

En este procedimiento se utiliza el principio de incineración para esterilizar materiales.

Tome el asa por el mango y lleve el extremo hacia el centro de la llama hasta que se torne roja ( incandescente ) levántela lentamente hasta que todo el alambre haya tomado ese color. Después de realizado este paso el asa estéril debe permanecer en el área del mechero encendido sin hacer contacto con ningún tipo de superficie.

### 4. Uso de los descartes

Todo material o artículo que haya terminado su vida útil en una determinada práctica o técnica, debe descartarse inmediatamente en su respectivo lugar.

Sobre la mesa de trabajo así como también en sus proximidades, encontrará varios depósitos, la mayoría de los cuales sirven para coleccionar el material a descartar. Sobre la mesa encontrará frascos que contienen agua jabonosa o con desinfectante, estos sirven para descartar láminas y laminillas; depósitos metálicos para aplicadores de madera , baldes para material contaminado y basura, además de bandejas para colorear.

Si ha utilizado portaobjetos y cubre-objetos en un montaje, al momento de descartarlas, sepárelas con un palillo o con un objeto similar en el frasco de descarte correspondiente.

Si ha utilizado pipetas, estas serán descartadas en el depósito con tapadera ubicado al extremo de cada mesa de trabajo.

## Microscopio

Del microscopio corriente se conocen dos tipos: El simple y el compuesto. Los microscopios simples son instrumentos que solo sirven para amplificar las imágenes de los objetos a investigar, ejemplo: las lupas, Los microscopios compuestos, son aquellos en los que se incluyen estructuras de soporte y elementos que son capaces de amplificar, clarificar e identificar estructuras que normalmente no se pueden observar con uno simple.

### MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

- Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente.
- Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
- Comenzar la observación con el objetivo de 4x o colocar el de 10 aumentos (10x) si la preparación es de bacterias.
- Para realizar el enfoque acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.

- Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación.
- Empleo del objetivo de inmersión. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre la preparación .
- Una vez finalizada la práctica limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

## MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES

- Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
  - Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
  - Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
  - No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
1. Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
  2. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
  3. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra.
  4. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
  5. Al terminar , para retirar la preparación, baje la platina , en especial si está enfocando con el objetivo de inmersión, ya que puede rayar el lente.

Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos

### a) Sistema Mecánico

Este sistema contiene las siguientes partes:

PIE: La base que sostiene el aparato para situarlo.

BRAZO: Se utiliza para trasladarlo de un lugar a otro.

TUBO ESTATIVO: Mantiene fija la distancia entre el ocular y el objetivo.

TORNILLO MACROMETRICO: Se logra grandes movimientos y enfoque aproximado.

**TORNILLO MICROMETRICO:** Proporciona pequeños movimientos y enfoque exacto (nitidez).

**REVOLVER:** Sostiene los objetivos y permite los cambios de uno a otro objetivo.

**PLATINA:** Placa que sostiene la preparación y permite el paso a la luz por orificio central.

**CARRO:** Sirve para mover la preparación; se logra desplazamiento de izquierda a derecha y de adelante hacia atrás y viceversa.

**CREMALLERA DEL CONDENSADOR:** Sube y baja el condensador.

### **b) Sistema Óptico**

Este sistema está formado por:

**OCULARES:** Lentes que están en la parte superior del tubo estativo y permite al observador ponerlo al contacto directo con el ojo.

**OBJETIVOS:** Juego de lentes situados en el revólver: panorámico 4X, seco débil 10X, seco fuerte 40X, e inmersión 100X.

**CONDENSADOR:** Lentes que permiten concentrar los rayos de luz procedentes de la fuente de iluminación.

### **c) Sistema de iluminación**

Puede ser un espejo o una lámpara. El flujo de luz pasará por el diafragma y condensador. Si las lentes están sucias, húmedas o rayadas, la imagen será oscura y la observación del objeto en estudio será difícil. Los microscopios modernos, tienen un dispositivo regulador de la intensidad de luz que emite, para que enfrie paulatinamente evitando así que la lámpara reciba los cambios bruscos de corriente cuando es encendida o apagada.

**DIAFRAGMA:** Dispositivo unido al condensador, amplía y disminuye la apertura.

**FILTRO:** Vidrio unido al condensador, atenúa la intensidad de luz y selecciona los rayos luminosos.

#### **NOTA :**

Desarrolle el hábito de limpiar los oculares y los objetivos luego de finalizada la práctica. siempre use papel especializado para limpiar lentes, nunca use papel filtro o cualquier sustituto.

### **Principios del funcionamiento del microscopio compuesto.**

El principio básico que sustenta la observación y el estudio de una muestra u objeto bajo el microscopio, se apoya en el hecho de que se utilizan dos tipos de lentes; el primero (el objetivo), tiene la propiedad de dar una imagen real y aumentada de tamaño de la imagen del objeto en estudio y el segundo (el ocular), de una imagen virtual y o aumentar el tamaño de la imagen proporcionada por el objetivo.

Si un haz de rayos luminosos provenientes de una fuente, es desviado hacia el objetivo por un espejo adecuadamente colocado, éstos serán refractados por el condensador antes de llegar a la muestra en estudio. (Un condensador es de buena calidad cuanta más amplia es su abertura numérica y mayor la cantidad de rayos que deja pasar). Este se encuentra

colocado entre el espejo y la muestra a observar y está provisto de un diafragma iris que sirve para eliminar el exceso de luz, reducir o aumentar su abertura y permitir o no el paso de los rayos que corren paralelos entre sí y de aquellos con muy poca divergencia. Los que pasan por el condensador, emergen para concentrarse a nivel del plano en donde se encuentra el objeto en estudio. Al atravesar el objetivo, proyectan hacia el ocular, una imagen real, invertida y mayor. Esta imagen, es proyectada primero hacia una serie de dos o tres lentes que se encuentran ubicados inmediatamente por encima del objetivo y sirven para corregir deficiencias y mejorar la imagen y la nitidez de la misma, pero no para agrandarla.

**El ocular**, está formado por un conjunto de 2 ó 3 lentes que magnifican el tamaño de la imagen suministrada por el objetivo. Cuando el objetivo proyecta la imagen hacia el ocular, ésta es llevada hacia un plano ubicado dentro de la distancia focal del ocular u oculares. Esta imagen al ser observada por el operador a través de las lentes del ocular, la ve como una imagen virtual, magnificada o mayor, que parece estar proyectada sobre un plano situado exactamente por encima del espejo o de la fuente de luz del microscopio.

De toda la cantidad de rayos emitida inicialmente, solo relativamente pocos llegan al ocular: Unos se pierden al llegar al espejo, condensador, platina a través del objeto y al objetivo. Para evitar una pérdida mayor de los rayos, que van desde el objeto en estudio hasta el objetivo y obtener un aumento mayor, se utilizan los objetivos 100X también llamados de inmersión. Estos tienen una distancia focal muy corta y una abertura numérica muy pequeña o muy limitada pero mayor poder de resolución (capacidad de una lente para revelar detalles). A éste se le coloca una gota de aceite transparente o incoloro de índice de refracción similar al del vidrio y se regula el diafragma del condensador, para permitir el paso de mayor cantidad de luz hacia el objetivo. La presencia del aceite, evita una mayor dispersión de éstos.

En condiciones ideales, el poder de resolución de estos lentes es aproximadamente igual a la mitad de la longitud de onda de la luz utilizada: Si esta fuera de 0.4 mm. los diámetros más pequeños observables serían de 0.2 mm.; así como también, si se utiliza un objetivo de 100 diámetros (100X) de aumento con oculares 10X, se hace posible obtener magnificaciones del objeto investigado, 1,000 veces mayor.

### **Técnica de enfoque.**

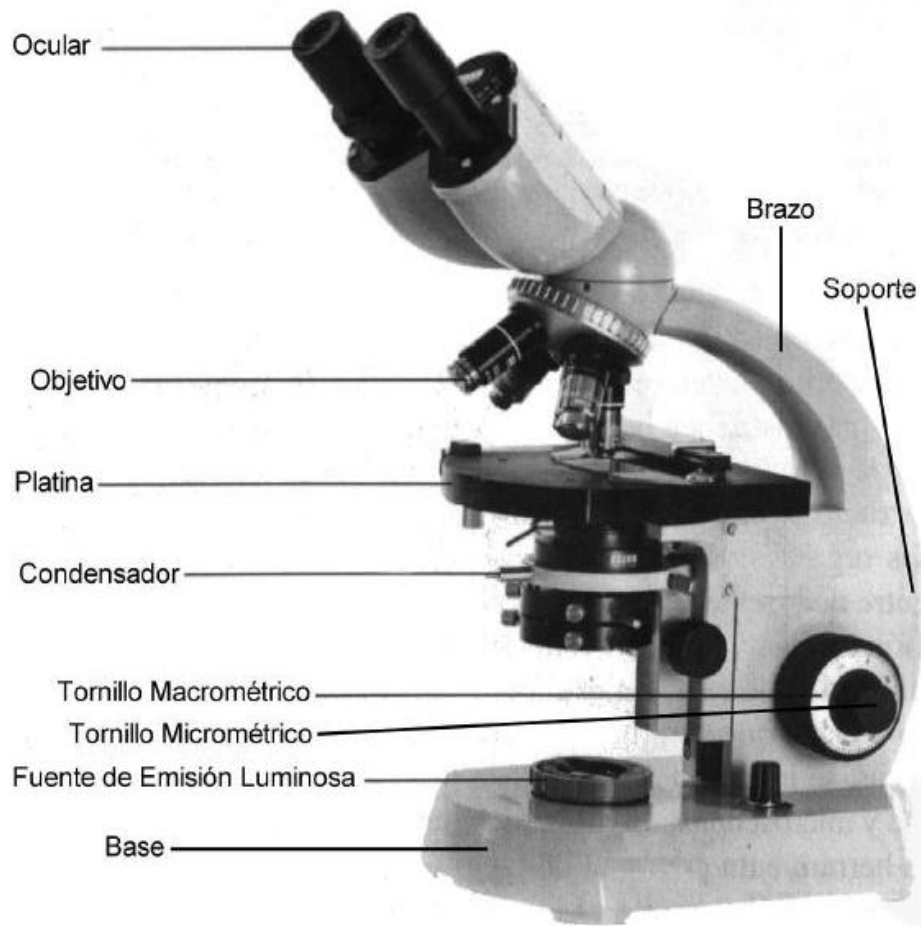
- a. Revise si la fuente de luz del microscopio esta adecuadamente conectada.
- b. Observe si la lámpara enciende al accionar el switch y si el objetivo 4X está en posición de trabajo. Y si es necesario gire el dispositivo regulador de la intensidad de luz Deje encendida la lámpara
- c. Coloque el frotis bacteriano proporcionado sobre la platina. Centre el frotis.
- d. Adecue la distancia entre los oculares según la distancia anatómica que existe entre sus ojos.
- e. Con el tornillo macrométrico suba o baje completamente la platina. Con el mismo tornillo, ascienda o descienda lentamente según el caso hasta lograr un enfoque aproximado. Haga girar el tornillo micrométrico hasta observar el objeto y la imagen se

- vea clara y precisa. Centre la imagen visualizada según convenga a la práctica.
- f. Coloque el objetivo 10X en posición de trabajo y proceda a enfocar la imagen visualizada utilizando solamente el tornillo micrométrico.
  - g. Coloque el objetivo 40X, siguiendo el procedimiento desarrollado en el paso anterior.
  - h. ANTES DE colocar el objetivo 100X, deposite una pequeña gota de aceite de inmersión en el centro del campo que observó con el 40X en el área del porta objetos en donde se observa que hay una mayor concentración de rayos. Acerque completamente el condensador a la platina y abra totalmente el diafragma; proceda con el tornillo micrométrico y visualice el objeto en estudio procurando obtener una imagen nítida. Finalizado el proceso de búsqueda, identificación y estudio, retire la lámina porta objetos de la platina y coloque el objetivo 4X en posición de trabajo.
  - i. Descarte el porta-objetos
  - j. Limpie cuidadosamente y sin presionar las lentes con papel fino, absorbente y limpio, con el objeto de remover el remanente de aceite de inmersión del objetivo 100X.
  - k. Observe si el objetivo 4X quedó en posición de trabajo y cerca de la platina; si es necesario gire el dispositivo regulador de la intensidad de la luz hasta el mínimo.
  - l. Apague la fuente de luz, desconecte el cable tomándolo directamente del toma corriente, no lo hale, enrolle el cable alrededor del microscopio y déjelo sobre la mesa.

#### **INDICACIONES ÚTILES.**

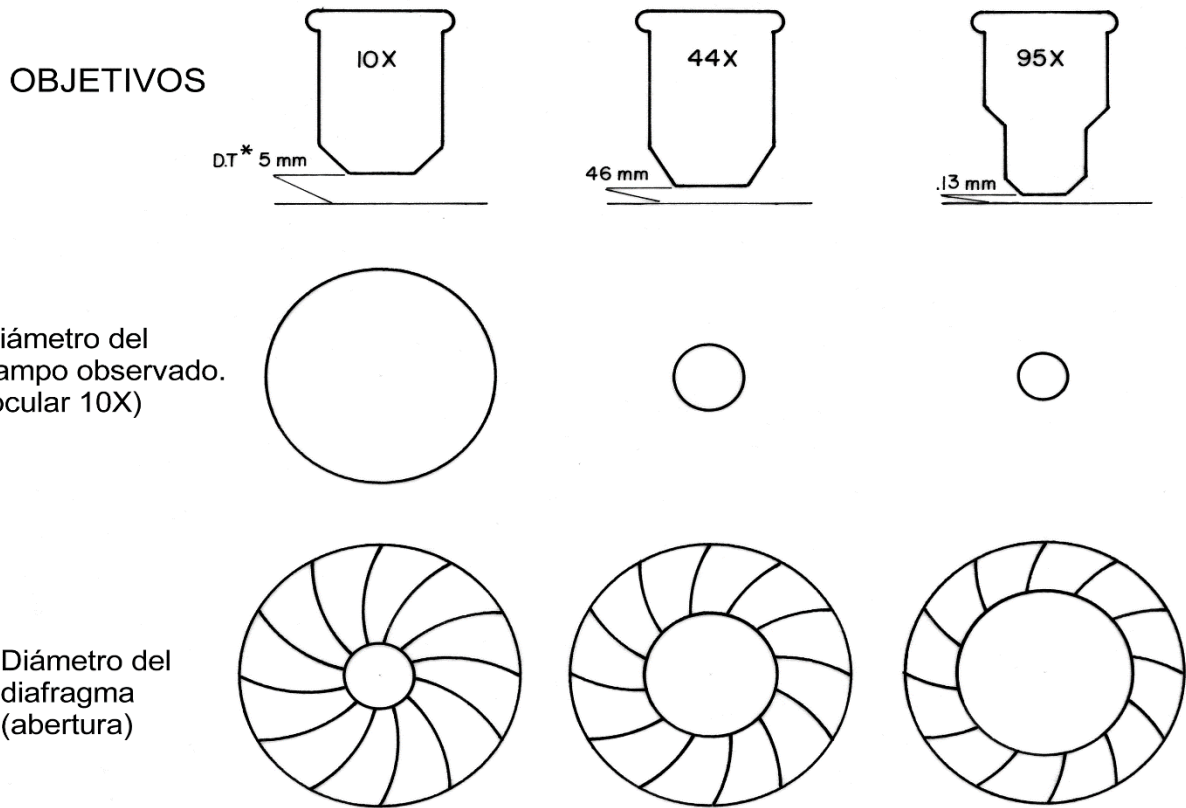
A cada grupo de estudiantes se le asignará un número adecuado de microscopios. Estos serán de completa responsabilidad del grupo que los reciba, así como también reposición de pérdida del resto de material o equipo que se les proporcione o que se encuentre en el área del laboratorio en el que realizan sus prácticas. Deberá avisar al encargado del preparador que su práctica ya finalizó para recoger el equipo utilizado. Los materiales los depositara en recipiente de descarte de laboratorio como tubos, placas etc, las láminas en descarte de láminas, las pipetas en descarte de pipetas etc.

- Cuide el material y el equipo asignado evite problemas innecesarios.
- No toque las lentes con los dedos. El sudor puede opacarlos.
- No juegue con ningún componente del microscopio.
- No lo arrastre sobre la mesa.
- Siempre manténgalo en posición correcta, nunca en el borde de la mesa.
- Si no funciona adecuadamente, notifique de inmediato al instructor.
- Si debe trasladarlo, tómelo del brazo con una mano y con la otra, sostenga su base.
- No maltrate el microscopio, el buen manejo del mismo, alarga su vida útil.
- No tocar con guantes para enfocar en el microscopio.



**Fig. 1.1 Microscopio Optico Compuesto.**

## INFORMACIÓN SOBRE EL USO DEL MICROSCOPIO



	DISTANCIA FOCAL	OBJETIVO AUMENTO	OCULAR AUMENTO	OBJETO AUMENTO
SECO DEBIL	16 mm	10X	10X	100
SECO FUERTE	4 mm	44X	10X	440
INMERSION	1.8 mm	95X	10X	950

\*Distancia de trabajo

Murray, Patrick; Rosenthal, Ken; Kobayashi, George; et al; MICROBIOLOGÍA MÉDICA 5ª. edición. ELSEVIER, España 2006

Sherris, J C MICROBIOLOGÍA MÉDICA 4ª edición Editorial Mac Graw Hill Barcelona 2004



## PRACTICA No. 2

### CULTIVO DE MICROORGANISMOS. MÉTODO DE ESTRÍAS.

---

#### INTRODUCCIÓN

**P**ara efectuar el estudio de los microorganismos, se han diseñado diversos métodos que permiten cultivarlos bajo condiciones artificiales en el laboratorio. Una de las técnicas más usadas consiste en transferir una muestra microbiológica de un ambiente determinado a un medio de cultivo, lo que permite obtener cultivos microbianos. Al efectuar este procedimiento, es necesario considerar que en el área de trabajo, existen muchos otros microorganismos; debido a esto, es necesario tomar precauciones para impedir que éstos penetren y contaminen los cultivos en estudio.

Por otra parte, considerar no sólo el aspecto nutricional, sino también las condiciones ambientales de su hábitat natural, por lo que en el medio de cultivo se debe ajustar el pH y concentración de sales, en la incubación considerar condiciones como la temperatura, aireación la luminosidad tiempo.

Cultivar un microorganismo significa promover intencionalmente el desarrollo de éste en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas. La población de microorganismos desarrollada en un medio se denomina cultivo. Cuando éste contiene una sola especie de microorganismo, se denomina cultivo puro o axénico, cuando contiene más de una especie de microorganismos se denomina cultivo mixto. En los medios naturales -por ejemplo, en el suelo, agua, o en el cuerpo humano- existen cultivos mixtos. En un cultivo mixto, viven muchas y diferentes especies de forma conjunta.

Un cultivo axénico se obtiene artificialmente en el laboratorio. A la hora de obtener un cultivo axénico se han de tomar precauciones especiales, ya que los microorganismos están por todas partes, en la naturaleza, en el laboratorio y en los instrumentos y recipientes usados en los experimentos. Estos microorganismos no deseados o contaminantes deben ser eliminados de un cultivo para que éste pueda ser axénico. El segundo paso para obtener un cultivo axénico es inocular o introducir, una sola célula de un microorganismo en un medio sólido o líquido, esterilizado previamente. De esta manera, aislamos un solo microorganismo del resto y se podrá multiplicar en condiciones favorables.

La forma de sembrarlos y cultivarlos depende del tipo de microorganismo y propósito específico del estudio. En el estudio de cultivos bacterianos algunos de los criterios que se emplean para caracterizarlos incluyen: tamaño, morfología celular, forma de agrupación, reacción a la tinción de Gram, formación de esporas, movilidad, presencia de inclusiones de reserva y características culturales en medios líquidos y sólidos en los que presentan patrones de desarrollo en cuanto a la forma, tamaño, elevación y color de las colonias. Una colonia es un clon lo suficientemente grande como para ser visible sobre la superficie de un medio sólido. Un clon está constituido por una población de células descendientes de un solo microorganismo.

### **Técnica de siembra por estría en placa**

Es el método más fácil y el más usado para obtener cultivos puros. Para ello, con un asa de siembra se toma una muestra de la población mixta y a continuación se hacen estrías sobre la superficie de un medio sólido preparado en una placa. Conforme se van haciendo estrías en zigzag con el asa, cada vez se van depositando en la superficie del medio menos microorganismos. A continuación, se flamea el asa, se toca en la región donde se han realizado las últimas estrías y se continúa la siembra con la misma técnica, en la superficie de medio sin sembrar aún. Repitiendo este proceso varias veces se logra separar células individuales. A continuación, las placas se incuban en un lugar adecuado, permitiendo que las células aisladas experimenten un número suficiente de divisiones para formar colonias visibles.

En el **método de vertido en placa**, las muestras diluidas se mezclan con agar fundido y se vierten en placa. Algunas colonias quedarán embebidas en el agar y otras crecerán en la superficie.

### **OBJETIVOS.**

Que el estudiante sea capaz de:

1. Reconocer algunas características macroscópicas de las colonias bacterianas.
2. Inocular los medios de cultivo líquidos y sólidos.
3. Practicar el método de estrías.

### **MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.**

Placas de Petri con agar Tripticasa soya (TSA)  
Tubos con caldo nutritivo inoculados con microorganismos  
Asas bacteriológicas.

### **DESARROLLO.**

#### **1. Inoculación de un medio líquido ( caldo ).**

La inoculación de los medios líquidos consiste en colocar una colonia bacteriana o parte de una muestra clínica; en un tubo que contiene un medio de cultivo líquido.

#### Técnica.

1. Esterilice el asa bacteriológica adecuadamente.
2. Sostenga la base de la caja de Petri y tome una colonia con la punta del asa.
3. Tome el tubo correctamente, destápelo, introduzca el asa en el medio líquido, y

- agite la punta del asa dentro del medio.
4. Retire el asa, flamee la boca del tubo y posteriormente tape el tubo.
5. Esterilice el asa.
6. Incube los tubos a 37° C en aerobiosis

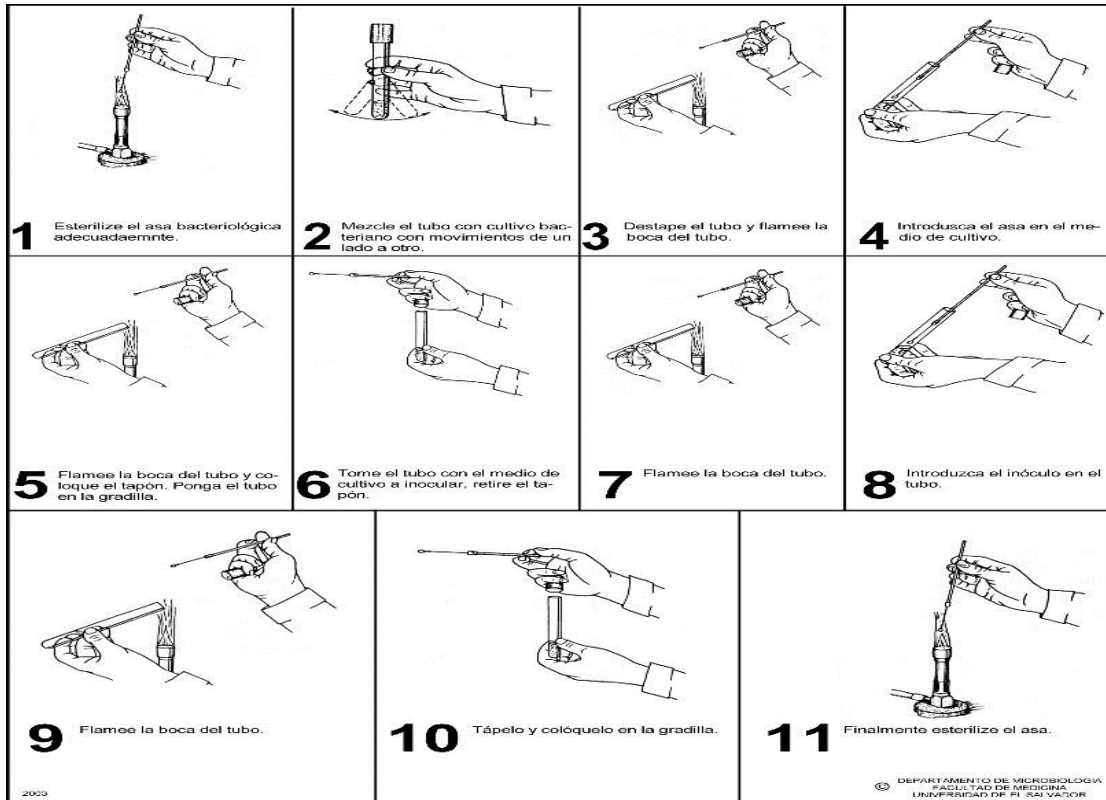


Fig. 1

### Inoculación de un medio sólido ( agar ).

Para la inoculación de una muestra clínica en la superficie de un medio sólido se utiliza el método de estrías (figura 2 ), **este tiene como objetivo principal la obtención de colonias aisladas de microorganismos**, en consecuencia el material a transferir no debe ser excesivo y debe ser adecuadamente distribuido.

#### Técnica

7. Esterilice el asa bacteriológica.
8. Retire el asa, flamee la boca del tubo, tape el tubo.
9. Cerca del mechero, abra la placa de TSA y realice la técnica de estrías
10. Identifique la placa de Petri con sus iniciales, numero de grupo, fecha e incúbela a 37° C por 24 horas en aerobiosis.

Fundamento del método de estrías : diluir el inóculo para obtener colonias aisladas.

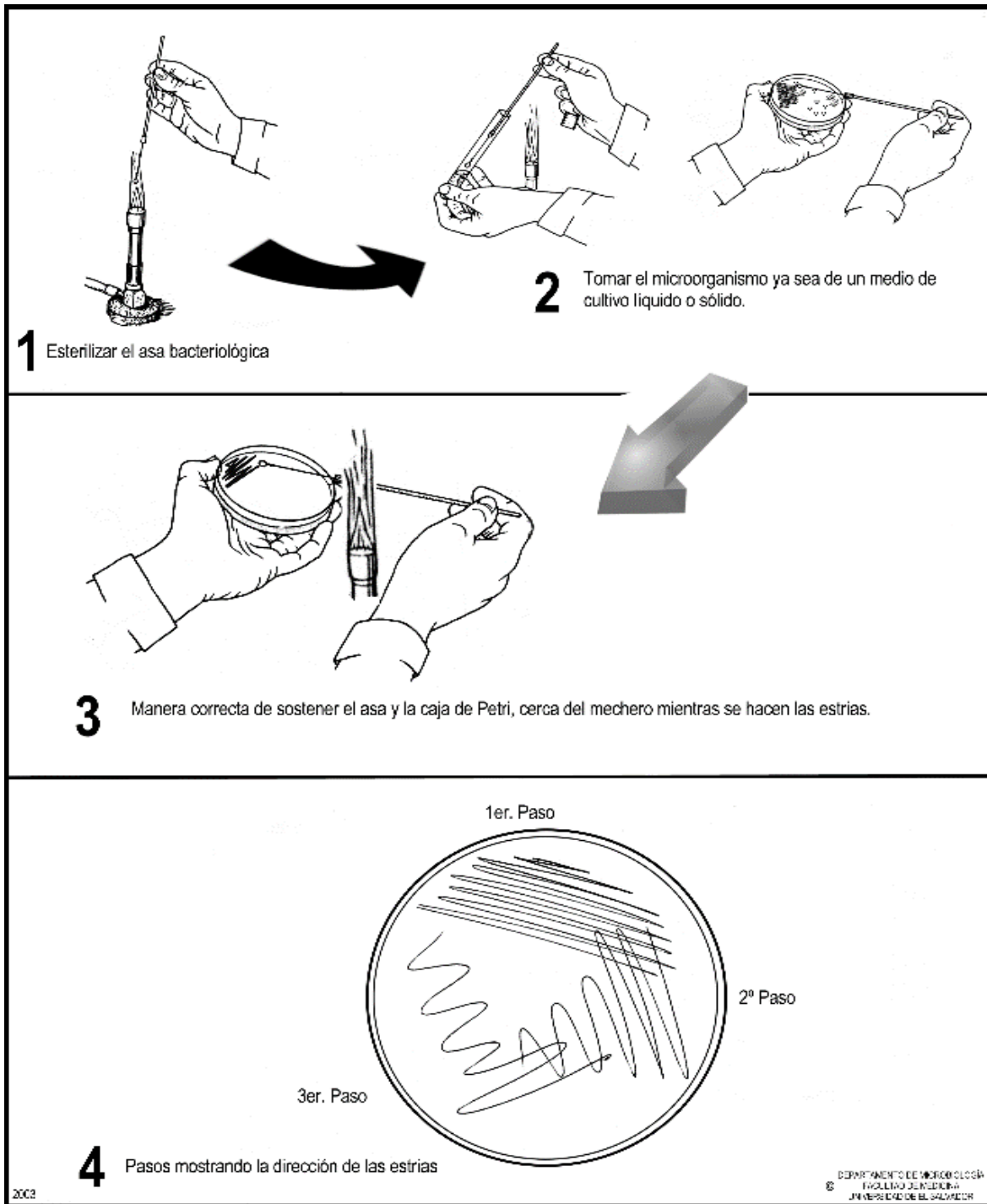


FIG 1

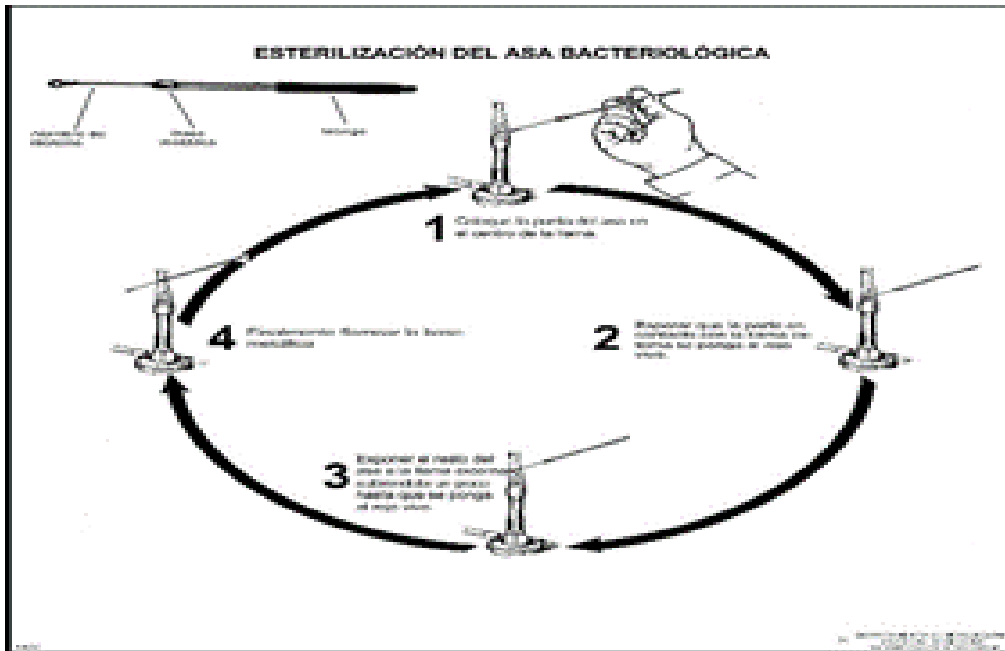
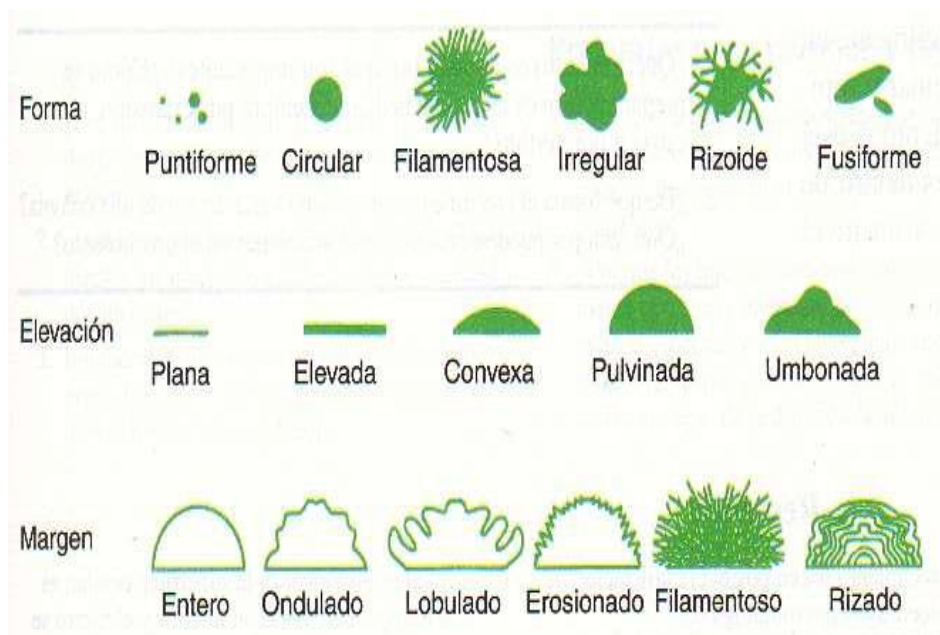


FIG 2

### Estudio de las características morfológicas de las colonias.

Observe las características macroscópicas de las colonias bacterianas que se le han proporcionado (color, textura, dimensiones, bordes superficie). Elabore un cuadro con estas características y discuta con su instructor.



**CUESTIONARIO**

1. ¿Qué es un medio de cultivo

\_\_\_\_\_

¿Qué es un cultivo  
puro? \_\_\_\_\_

2. Escriba dos razones por las que un medio de cultivo sólido se puede contaminar con bacterias del medio ambiente 1.

\_\_\_\_\_

2.

3. ¿Qué le indica que en un medio de cultivo sólido hay crecimiento bacteriano? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ ¿ y si es un medio líquido

? \_\_\_\_\_

4. Además del medio de cultivo ¿Qué otras condiciones necesitan las bacterias para su crecimiento ?

\_\_\_\_\_

5. ¿Cuál es el objetivo de realizar la técnica de estrías

? \_\_\_\_\_

¿ Y en qué se fundamenta ?

\_\_\_\_\_

6. ¿Qué significa inocular un medio de cultivo

? \_\_\_\_\_

7. Escriba tres características macroscópicas de las colonias que observó en la práctica

\_\_\_\_\_

8. ¿Qué es un clon

? \_\_\_\_\_

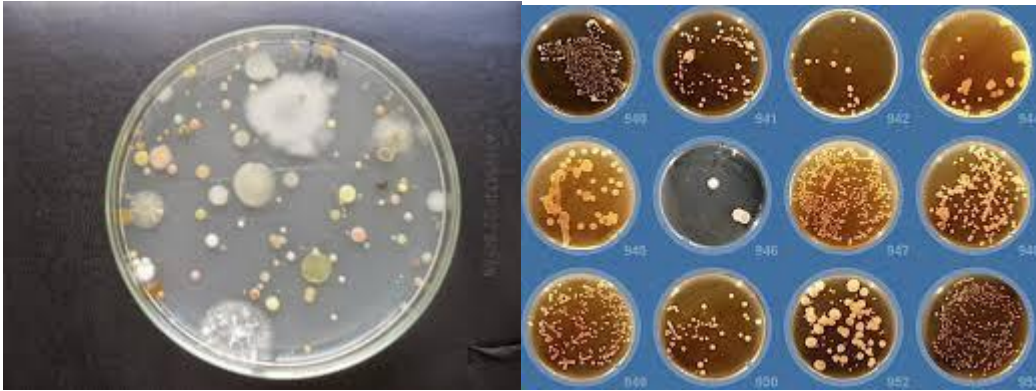
¿Qué es una colonia bacteriana

? \_\_\_\_\_

**BIBLIOGRAFÍA**

Pelczar et al, Microbiología , 4ª. Edición , Editorial Mc Graw Hill, México , 1977

Prescott, et al, Microbiología, 5ª. Edición, editorial Mc Graw Hill, Madrid, 2002

**PLACAS DE PETRI CON COLONIAS. METODOS DE ESTRIAS.**



### PRACTICA No. 3

#### COLORACION DE GRAM Y SIMPLE CON AZUL DE METILENO

---

#### INTRODUCCION

Para observar las bacterias teñidas es necesario, en primer lugar, hacer un frotis de las bacterias y fijarlo. Se denomina frotis a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo con objeto de separar lo más posible los microorganismos, ya que si aparecen agrupados en la preparación es muy difícil obtener una imagen clara y nítida. Este frotis debe ser posteriormente fijado al vidrio del portaobjetos para poder aplicar los métodos habituales de tinción que permiten la observación al microscopio de las bacterias sin que la muestra sea arrastrada en los sucesivos lavados. La fijación de una extensión bacteriana hace que las bacterias queden inactivadas y adheridas al vidrio alterando lo menos posible la morfología y bacteriana y las posibles agrupaciones de células que pudiera haber.

Para hacer un **frotis**, cuando se parte de un cultivo de bacterias en medio líquido, se toma una o varias cargas directamente con el asa y se extienden sobre el portaobjetos. Si se parte de un cultivo en medio sólido, debe depositarse previamente una asada de solución salina 0.85 % sobre el portaobjetos. A continuación, se toma con el asa una pequeña parte de la colonia y se dispersa en la solución salina, realizándose la extensión como en el caso anterior.

La **fijación** tiene por objeto provocar modificaciones en la composición físico-química de la bacteria (coagulación de las proteínas, etc.) de forma que ésta conserve definitivamente una estructura similar a la que tenía en vivo, sin deformarse como consecuencia de los tratamientos a que se verá sometida durante la tinción. Por otra parte la fijación impide el arrastre de los microorganismos al quedar estos adheridos al portaobjetos y hace que la pared celular sea más permeable a los colorantes.

Para la fijación pueden utilizarse agentes químicos (formol, metanol) o el calor. Nosotros emplearemos el calor, y para ello el frotis, una vez seco, se pasa dos o tres veces sobre la llama. Hay que procurar que el calor nunca sea excesivo, pues se alterarían las estructuras de la bacteria: en ningún momento el portaobjetos, colocado sobre el dorso de la mano, debe quemar.

#### **Material:**

Làminas portaobjetos.

Mechero Bunsen.

Asa de siembra.

Tubos con cultivos de bacterias

Bandejas de tinción

Colorantes para las tinciones: Cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina.

Coloración de azul de metileno

microscopios

### **OBJETIVOS.**

Que el estudiante logre:

- a) Aprender a hacer un frotis de bacterias.
- b) Realizar una técnica de tinción simple (Azul de Metileno)
- c) Realizar una técnica de tinción compuesta (Gram)
- d) Comparar la coloración de las bacterias con azul de metileno y el método de Gram.
- e) Describir la forma y agrupación de las bacterias suministradas

### **REALIZACIÓN DEL FROTIS**

1. Colocar con el asa una pequeña gota de solución salina 0.85 % en el centro de un portaobjetos limpio.
2. Flamear el asa de siembra, tomar, en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y transferirlo a la gota de solución salina . Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.  
Si la muestra se toma de un cultivo en medio líquido, no es necesario realizar los dos primeros pasos ya que basta con colocar y extender una gota de la suspensión bacteriana, que se toma con el asa de siembra, directamente sobre el portaobjetos.
3. Esperar hasta que el líquido se evapore colocándolo cerca de la llama del mechero. En este caso hay que tener mucha precaución de no calentar demasiado el portaobjetos pues las células pueden deformarse o romperse.

### **FIJACIÓN DE LAS BACTERIAS AL PORTAOBJETOS**

4. Por calor: Pasar tres veces el portaobjetos por la llama durante unos segundos. Dejar enfriar el porta entre los pases. Una vez realizado el frotis y fijadas las bacterias, las preparaciones pueden ser observadas al microscopio, continuar con el proceso de tinción.

### **TINCIÓN DEL FROTIS BACTERIANO**

5. Cubrir el frotis con abundante colorante y dejarlos actuar durante el tiempo que indique el protocolo de cada tinción concreta.
6. Lavar la preparación con agua para eliminar el colorante. Esta operación se realiza inclinando el portaobjetos y aplicando el chorro de agua en su parte superior de manera que resbale sobre el frotis, pero sin que vaya dirigido directamente sobre él, pues podría

- arrastrar parte del frotis consigo. Eliminar la máxima cantidad de agua de los portaobjetos golpeándolos por su canto con cuidado contra la superficie de la mesa de trabajo.
7. Secar el porta presionando entre dos papeles de filtro, pero en ningún caso se debe frotar el porta.
  8. Observar la preparación al microscopio llegando hasta el máximo aumento.

### COLORACION SIMPLE

Es la tinción en la que se utiliza un solo colorante.

Como colorantes utilizaremos el azul de metileno .

1. Hacer el frotis, secarlo y fijarlo.
2. Cubrir con colorante la preparación y dejarlo actuar durante un minuto.
3. Lavar suavemente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
4. Secar al aire y observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x) empleando el aceite apropiado.

Esta técnica permite observar la morfología y tamaño de las bacterias, así como los tipos de agrupaciones que forman.

### TINCIÓN DE GRAM

Es la tinción diferencial más utilizada en bacteriología pues permite separar las bacterias en dos grandes grupos, las Gram-positivas y las Gram-negativas. La tinción de Gram requiere cuatro soluciones:

1. **Primer colorante.** Es un colorante básico que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. **Solución mordiente.** Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, por ejemplo, una solución diluida de yodo.
3. **Agente decolorante.** Es un disolvente orgánico, por ejemplo, alcohol-acetona (1:1).
4. **Colorante de contraste.** Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, como, por ejemplo, la safranina. Los dos grupos bacterianos a los que anteriormente nos referíamos difieren en el color con el que finalmente aparecen. Las bacterias Gram positivas se teñirán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias Gram negativas perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina. La diferencia está determinada por la composición de su envoltura celular. Las bacterias gram positivas poseen una malla de peptidoglicano en su parte más externa, mientras que las bacterias gram negativas, recubriendo una fina capa de peptidoglicano, presentan una membrana externa que envuelve toda la célula.

#### **Notas**

No olvide que en los frotis fijados al calor, queda una buena cantidad de bacterias vivas; esto constituye para el operador, una fuente de infección, por lo que se le recomienda, guardar las precauciones necesarias para evitar contaminaciones indeseables.

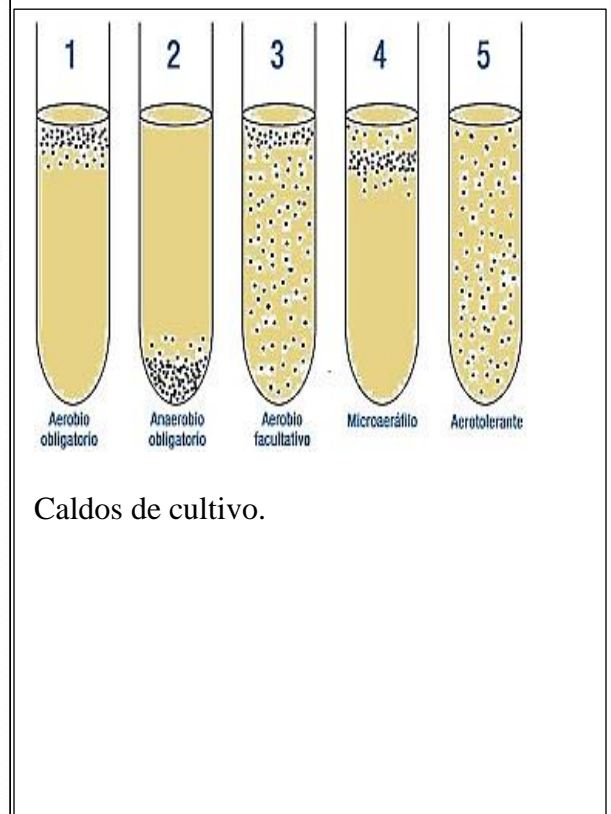
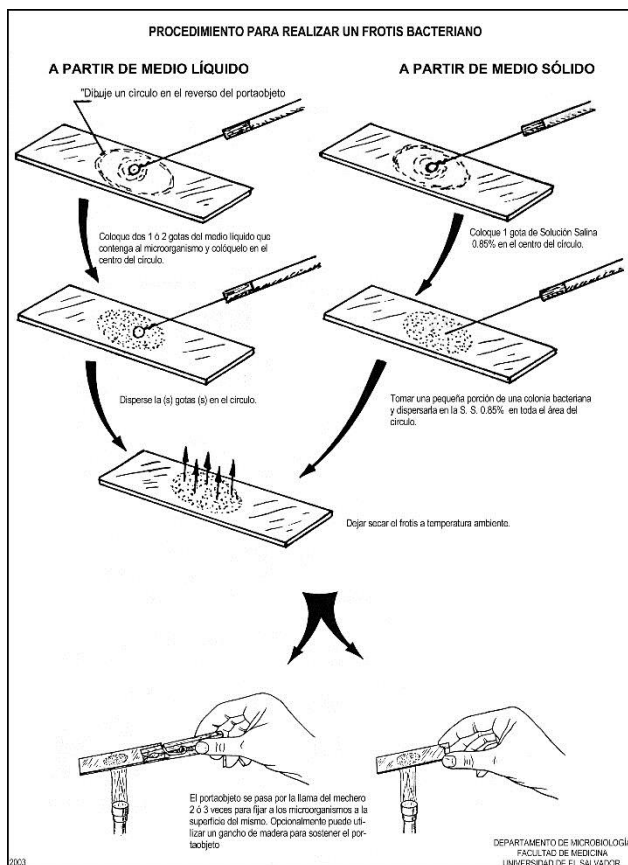
El método de tinción es el siguiente:

1. Se prepara el frotis, se seca y se fija.
2. Se cubre con cristal violeta durante un minuto.
3. Lavar suavemente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
4. Se traza con lugol un minuto. El lugol actúa como mordiente aumentando la afinidad del colorante por la bacteria.
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Se gotea alcohol-acetona de forma continua hasta que la preparación deje de perder color y se lava enseguida con agua abundante.
7. Se cubre la preparación con un colorante de contraste, como la safranina, durante un minuto.
8. Se lava con agua y se seca al aire, observándose a continuación con el objetivo de inmersión

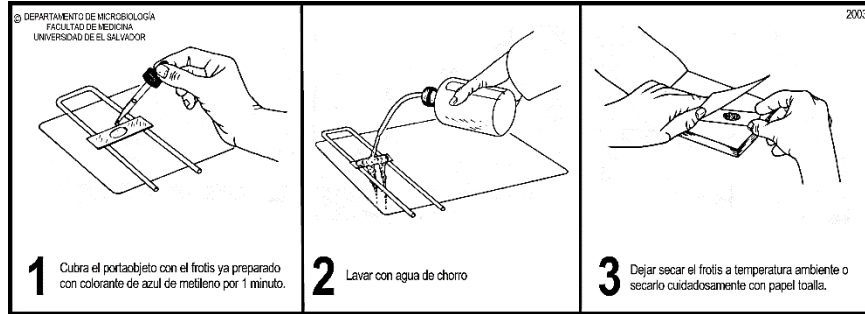
### OBSERVACIÓN DE LAS TINCCIONES DE BACTERIAS AL MICROSCOPIO.

Las bacterias Gram-positivas presentarán una coloración violeta mientras que las Gram-negativas la presentarán roja o rosa.

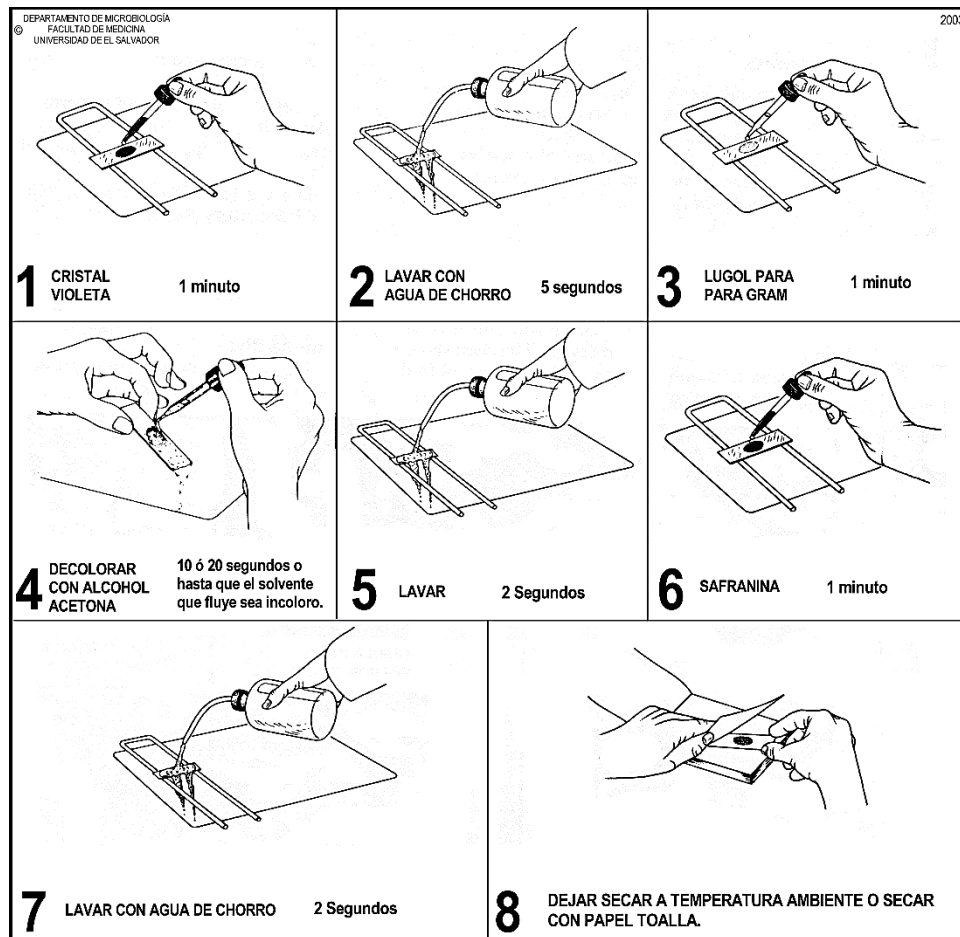
### PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN FROTIS BACTERIANO



## PROCEDIMIENTO PARA TINCION SIMPLE

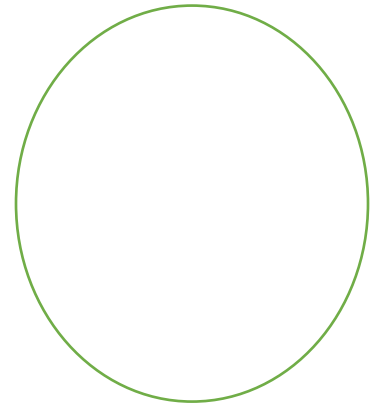
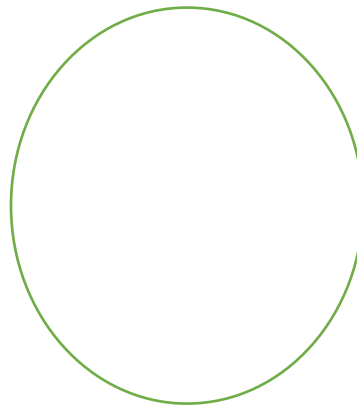
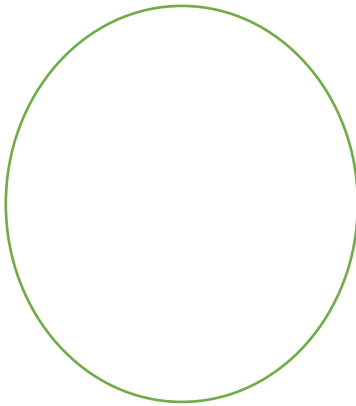
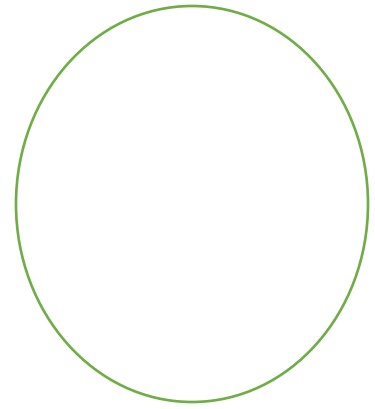
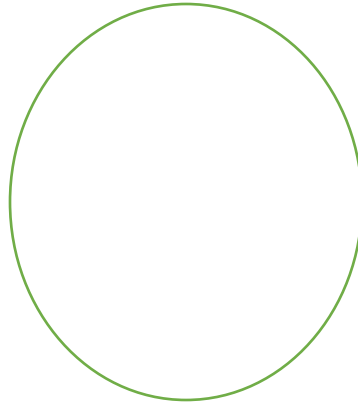
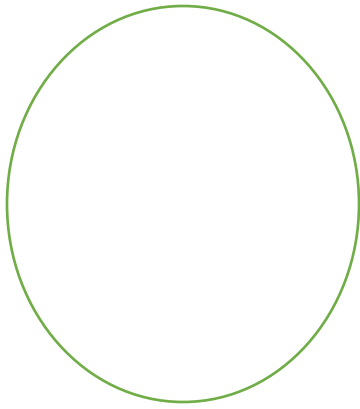


## COLORACION DE GRAM

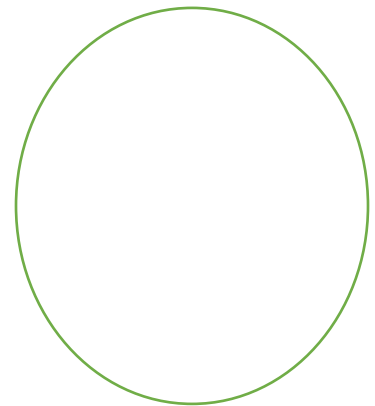
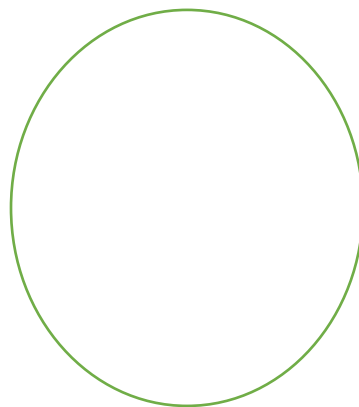
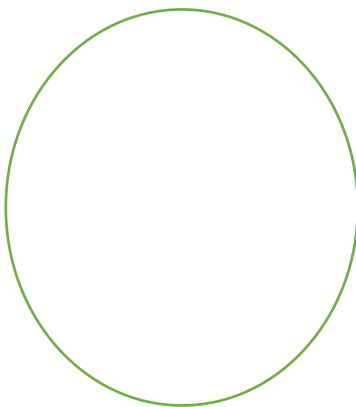


## COLORACION GRAM

El manual es propiedad de la Facultad de Medicina. Microbiología Ocular. Universidad de El Salvador. Prohibida su reproducción parcial o total con fines comerciales. Lo imparte el departamento de microbiología. Escuela de Medicina/Escuela de Tecnología Médica.



### **COLORACION SIMPLE**



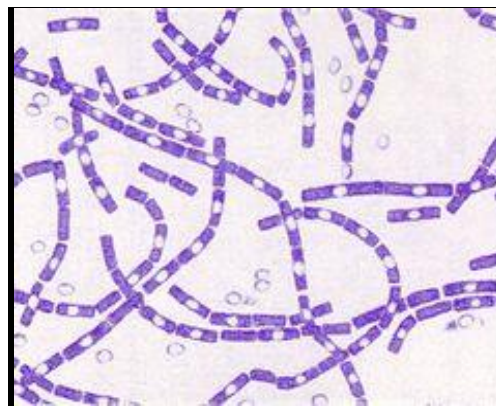
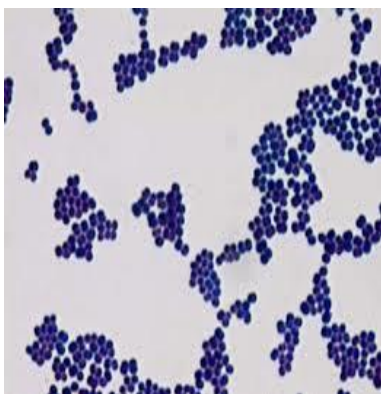
### **PREGUNTAS.**

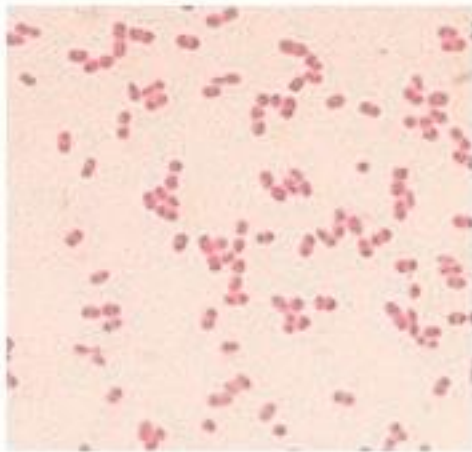
1. ¿Cuál de las dos coloraciones (azul de metileno y Gram) es la más usada para el diagnóstico microbiológico y por qué? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
2. ¿ Quién fue el creador de la coloración de Gram? \_\_\_\_\_
3. ¿ Qué es un frotis  
? \_\_\_\_\_
4. ¿ Cuál es la función de fijar el frotis  
? \_\_\_\_\_
5. Escriba el nombre del colorante de contraste de la coloración de Gram  
\_\_\_\_\_
6. ¿Cuál es la función del alcohol-acetona? \_\_\_\_\_
7. Explique el fundamento de la coloración de Gram -  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

#### BIBLIOGRAFÍA

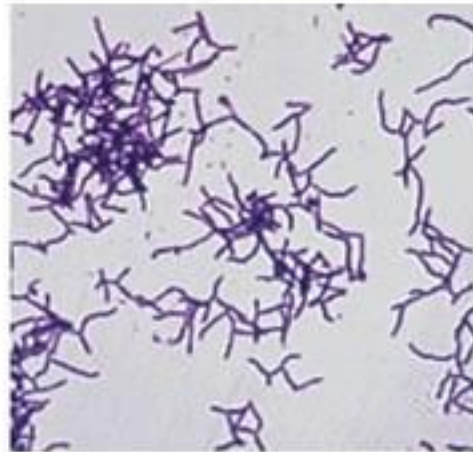
Pelczar et al, Microbiología , 4ª. Edición , Editorial Mc Graw Hill, México , 1977

Prescott, et al, Microbiología, 5ª. Edición, editorial Mc Graw Hill, Madrid, 2002





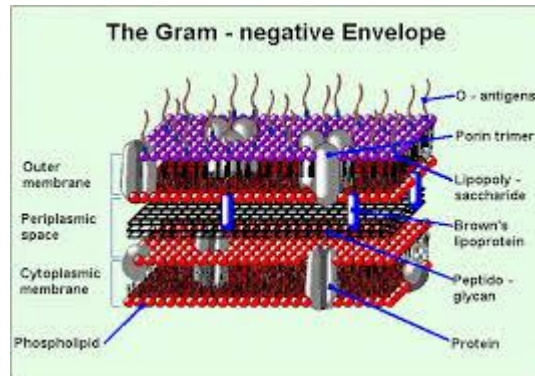
Gram-negativo



Gram-positivo

### TINCIÓN DE GRAM

Gram +	Pasos	Gram -
	Fijación	
	Colorante principal: cristal violeta	
	Mordiente: lugol	
	Decoloración: alcohol/acetona	
	Colorante de contraste: safranina	



### BIBLIOGRAFÍA

Pelczar et al, Microbiología , 4ª. Edición , Editorial Mc Graw Hill, México , 1977

Prescott, et al, Microbiología, 5ª. Edición, editorial Mc Graw Hill, Madrod, 2002

**PRACTICA No. 4****REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO: TIPEO SANGUINEO.****INTRODUCCION**

**E**l sistema sanguíneo ABO fue descubierto en 1901 por Karl Landsteiner al observar la aglutinación de los eritrocitos humanos con otros sueros también de humanos. En 1949 Landsteiner y Wiener descubrieron que el factor Rh estaba en el 85 % de los eritrocitos humanos y los del mono Rhesus.

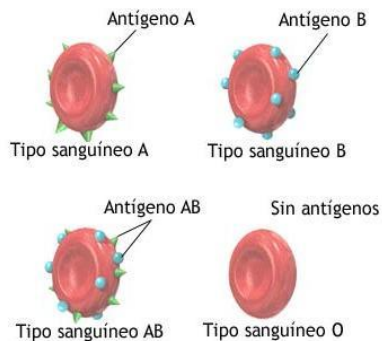
El examen para determinar el grupo sanguíneo se denomina sistema o tipificación ABO. La sangre a examinar se mezcla con anticuerpos anti-A, anti-B, anti-Rh y la muestra se observa para ver si los glóbulos sanguíneos se pegan o aglutinan. Si dichos glóbulos se aglutinan, eso significa que la sangre reaccionó con uno de los anticuerpos. La sangre a menudo se clasifica de acuerdo con el sistema de tipificación ABO. Este método separa los tipos de sangre en cuatro categorías: A, B, AB, O.

El tipo de sangre (o grupo sanguíneo) depende de los tipos que haya heredado de sus padres. La determinación del grupo sanguíneo también se hace para decir si usted tiene o no una sustancia llamada factor Rh en la superficie de los glóbulos rojos. Si se tiene la sustancia se considera Rh+ (positivo) y los que no la tienen Rh- (negativo). La tipificación del Rh utiliza un método similar al sistema ABO.

Este examen se hace para determinar el tipo de sangre de una persona. Los médicos necesitarán conocer el tipo de sangre antes de realizar una transfusión de sangre o un trasplante, debido a que no todos los tipos de sangre son compatibles entre sí. Por ejemplo: personas de sangre tipo A, únicamente puede recibir sangre tipo A y tipo O; los de sangre tipo B, únicamente puede recibir sangre tipo B y tipo O; los de tipo AB, pueden recibir sangre tipo A, B, AB y O y los de tipo O, únicamente puede recibir sangre tipo O.

Si el paciente es Rh positivo, puede recibir sangre Rh positivo o Rh-, pero si es Rh negativo, únicamente puede recibir sangre Rh negativo.

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Sangre roja célula				
Anticuerpos	Anti-B	Anti-A	Ningunos	Anti-A y Anti-B
Antígenos	A antígeno	B antígeno	A y B antígeno	No antígenos



### Materiales y reactivos

Reactivos anti A, anti B, anti D  
 Aplicadores de madera  
 Láminas de vidrio 1x2 ½ plg.  
 Lancetas estériles  
 Frascos con algodón y alcohol

### Procedimiento para extraer la sangre

1. Hacer sentir bien al paciente, que no esté nervioso y que se sienta lo más cómodo posible
2. Tener listo el material necesario para el estudio
3. Tomar la mano del paciente y tomar el dedo anular el cual se limpia con una torunda de algodón con alcohol
4. Con la lanceta realizar el pinchazo rápido para que el paciente no se desespere y sienta menos dolor
5. Coloque tres gotas de sangre en la lámina previamente rotulada
6. Agregar una gota de antisuero A, antisuero B, antisuero D (Rh)
7. Mezclar con aplicador diferente para cada prueba
8. Rotar la lámina por 1 a 2 minutos. Observe la presencia o ausencia de aglutinación
9. Presencia de grumos indica que la prueba es positiva

### Cuestionario

1. Escriba la definición de antígeno \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
2. Escriba la definición de anticuerpo \_\_\_\_\_
3. ¿ Adónde se localiza el antígeno que se busca en el tipo sanguíneo ? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
4. ¿ Cómo observó la reacción Ag-Ac en el tipo sanguíneo ? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### Referencias

Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud , OPS , 1983

### TIPEO SANGUINEO EN HUMANOS.

TIPO DE SANGRE	POEDE DONAR A	POEDE RECIBIR DE
<b>A+</b>	A+ AB+	O+ O- A+ A-
<b>A-</b>	A+ A- AB+ AB-	O- A-
<b>B+</b>	B+ AB+	O+ O- B+ B-
<b>B-</b>	B+ B- AB+ AB-	O- B-
<b>AB+</b>	AB+	TODOS
<b>AB-</b>	AB+ AB-	AB- O- A- B-
<b>O+</b>	A+ B+ AB+ O+	O- O+
<b>O-</b>	TODOS	O-

A		B		D		TIPO
	MUESTRA		MUESTRA		MUESTRA	RESULTADO
0		0		+		O Rh +
+		0		+		Tipo A Rh +
0		+		0		TIPO B Rh -
+		+		+		TIPO AB Rh +

# 5

## PRACTICA No. 5 EFECTO DE LOS AGENTES FISICOS (CALOR ) EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

---

### INTRODUCCIÓN.

**H**ay compuestos químicos y factores físicos que interfieren el desarrollo, alteran la vitalidad o provocan la destrucción de los microorganismos. Esto ha sido utilizado para ejercer un mejor control sobre la mayoría de ellos.

**En el caso de los agentes físicos, el calor** es el que más frecuentemente se utiliza para este fin. Si se aplica a semejanza de la temperatura del cuerpo humano, las bacterias, en especial las patógenas para el hombre, crecerán y se desarrollarán, toda vez de que se encuentren en el medio adecuado para hacerlo. El calor, así como puede ayudar a crecer y/o desarrollar a los microorganismos, también puede destruirlos. Si se utiliza una temperatura cercana a los cien grados centígrados, todos los microorganismos sometidos a esta temperatura serán destruidos, a excepción de los esporulados. Para destruir a los esporulados, el calor puede utilizarse de dos maneras diferentes: El calor seco y el calor húmedo a presión. El calor seco se les aplica cuando se introducen a la estufa. Con este método se logra la destrucción de todos ellos por oxidación, debido a que las bacterias pierden gradualmente todas las moléculas de agua que contienen. Este proceso es largo y requiere de su aplicación un lapso no menor algunas veces, a las dos horas. Si se utiliza en forma de calor húmedo a presión también serán destruidos, debido a que el vapor penetra en las bacterias coagulando las proteínas. Este método es efectivo y más rápido que el calor seco.

La aplicación de uno u otro método, depende de la naturaleza del objeto o del material a esterilizar. Durante las prácticas de laboratorio, se utiliza una forma diferente de esterilización. En éste, el objeto (asa bacteriológica) se coloca directamente a la llama del mechero, incinerando todo el contenido del área expuesta. Este método es fácil, seguro y rápido de ejecutar.

Cuando se quiere esterilizar sustancias que son fácilmente degradadas por el calor o pequeños volúmenes, por ejemplo de suero, se utilizan filtros permeables de poro muy pequeño (0.2- 0.4 µm.) llamados filtros milipore. Para ello, se utilizan filtros de tamaño adecuado, a los cuales se les aplica presión positiva o negativa para reforzar el paso de la sustancia a esterilizar a través del filtro.

**OBJETIVOS:**

Que al finalizar la práctica el estudiante tenga la capacidad de:

- a) Explicar el efecto que produce el calor en la viabilidad de los microorganismos y establezca sus variables.
- b) Compare los resultados al aplicar diferentes temperaturas en el crecimiento bacteriano

**MATERIALES Y EQUIPO**

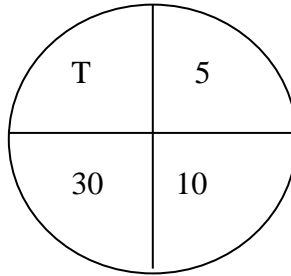
Cultivo de bacterias en caldo de tripticasa soya ( TSC)  
 Soporte y aros de metal, malla de asbesto para baño de agua a 100° C  
 Baño de agua calibrado a 60° C  
 Placas con agar Tripticasa Soya (TSA)  
 Pinzas para tubos  
 Incubadoras a 37° C  
 Colorantes para Gram  
 Microscopios  
 Láminas portaobjetos 3x1 plg

**PROCEDIMIENTO****PARTE I . DIA JUEVES****EFFECTO DEL CALOR EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO**

Una pareja de estudiantes trabajará a temperatura de 60 ° C y otra lo hará a 100 ° C.

1. Con un lápiz grueso, divida la placa de TSA en cuatro partes y rotule las secciones así: testigo ( T ), 5 , 10 y 30 minutos.
2. Agite el cultivo y siembre con una estría en el cuadrante donde rotulado el testigo que servirá como patrón de crecimiento antes de aplicar el calor.
3. Tape el tubo e introdúzcalo en el baño de agua a 60 ° C y aplique calor por 5 minutos
4. Retire el tubo del calor, agite, destape y realice la estría en el cuadrante rotulado con 5 minutos.

5. Repita el paso anterior recordando que el tiempo es acumulativo hasta completar los 30 minutos.
6. Incubar el medio de cultivo invertido debidamente rotulado, a 37 ° C por 24 horas.



### PARTE II. DIA VIERNES

1. Retire los cultivos de la incubadora
2. Encienda el mechero y observe el crecimiento en cada uno de los cuadrantes de la placa
3. Describa las colonias macroscópicamente
4. Reporte los resultados y anótelos en un cuadro.

#### TEMPERATURA DE 60 ° C

##### CRECIMIENTO BACTERIANO

Bacteria	testigo	5 min.	10 min.	30 min.

#### TEMPERATURA DE 100 ° C

##### CRECIMIENTO BACTERIANO

Bacteria	testigo	5 min.	10 min.	30 min.

**CUESTIONARIO**

1. Definir los siguientes términos

Estéril: \_\_\_\_\_

Desinfectante: \_\_\_\_\_

Séptico: \_\_\_\_\_

Aséptico: \_\_\_\_\_

2. Para esterilizar medios de cultivo, solución salina se utiliza el siguiente equipo

\_\_\_\_\_

3. Para esterilizar cristalería, aceite, polvos, pinzas de metal, se hace uso del siguiente equipo

\_\_\_\_\_

4. El procedimiento que practica en el laboratorio para esterilizar el asa bacteriológica recibe el nombre de \_\_\_\_\_

5. Escriba tres procedimientos o equipo para esterilizar materiales por métodos físicos

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

6. Escriba tres factores que influyen cuando se aplica calor para matar a los microorganismos

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

7. ¿Cuál es la finalidad de inocular el testigo? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

8. ¿Cuáles fueron los resultados esperados con la bacteria productora de espora al aplicar la temperatura de ebullición durante 30 minutos? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

9. ¿Cuál es el método físico que se aplica para la desinfección de LC en usuarios alérgicos a alguna sustancia química de las diferentes soluciones ?

REFERENCIAS:

JAWETZ, E., et. al. Microbiología médica, 17ª edición, Manual Moderno, México, 2002.

Saona Santos, Carlos Luis, Contactología Clínica, Editorial Mason, 2002, eEspaña

### CURVAS DE TEMPERATURA EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO BACTERIANO

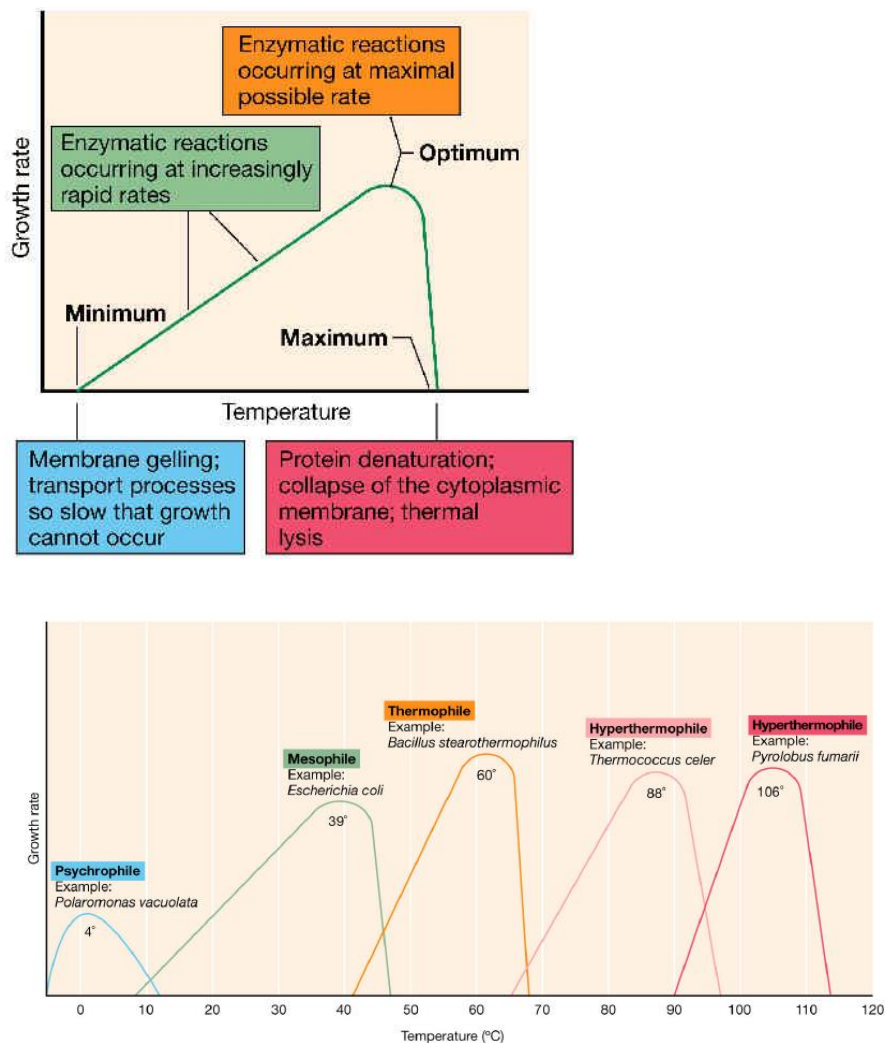


Figura 2. Clases de microorganismos según la temperatura.



## PRACTICA No. 6

### EFFECTO DE LOS AGENTES QUIMICOS: DESINFECTANTES Y ANTISEPTICOS EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

---

Cuando se controlan los microorganismos con los agentes químicos, la efectividad depende de varios factores a tomar en cuenta; por ejemplo, la naturaleza del producto, su concentración, tiempo de exposición, presencia o ausencia de materia orgánica y de la utilización o no de la temperatura; aun así, no existe una línea de separación entre la acción bacteriostática y la bactericida, porque no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo ni todos los desinfectantes tienen el mismo poder bactericida. Dependiendo de su concentración, un agente puede en algunos casos, no causar ningún efecto; en otros, la misma, concentración puede estimular su desarrollo y/o crecimiento y en otros, retardarlo o destruirlos.

**El antibiograma o prueba de susceptibilidad** sirve para determinar in vitro a qué antibióticos es susceptible o resistente una determinada cepa bacteriana aislada del paciente. Este método permite al médico escoger el antibiótico más adecuado con base científica proporcionada por el laboratorio, y evitar dar tratamientos inútiles.

Las lecturas posibles en el antibiograma son:

**Susceptible:** Cuando los microorganismos responsables de una infección son inhibidos por concentraciones de antibióticos obtenidas con un régimen usual de dosificación.

**Intermedio:** Cuando los microorganismos son inhibidos por concentraciones altas de antibiótico.

**Resistente:** Si los microorganismos que causan infección, toleran concentraciones de antibiótico superiores a las que pueden obtenerse en la sangre por medio de un régimen usual de dosificación.

#### OBJETIVOS:

Que al finalizar la práctica el estudiante tenga la capacidad de :

- c) Explicar el efecto que producen algunos agentes químicos sobre la viabilidad de los microorganismos y establezca sus variables.

- d) El efecto que producen algunos antibióticos sobre las bacterias.

## **MATERIALES Y EQUIPO**

Cultivo de bacterias en caldo de tripticasa soya ( TSC)

6 tubos con 5 ml caldo TSC

Placas con agar Tripticasa Soya (TSA).

gradillas con seis tubos de vidrio 13 x 100 mm. con tapón con rosca cada uno con 1 ml. de las seis soluciones siguientes:

Agua destilada estéril.

Thimerosal

Peróxido de hidrógeno 3%

Cloruro de benzalconio 0.1%.

Tintura de Yodo al 3%

Hipoclorito de Sodio al 3%

Solución multipropósito

Alcohol gel

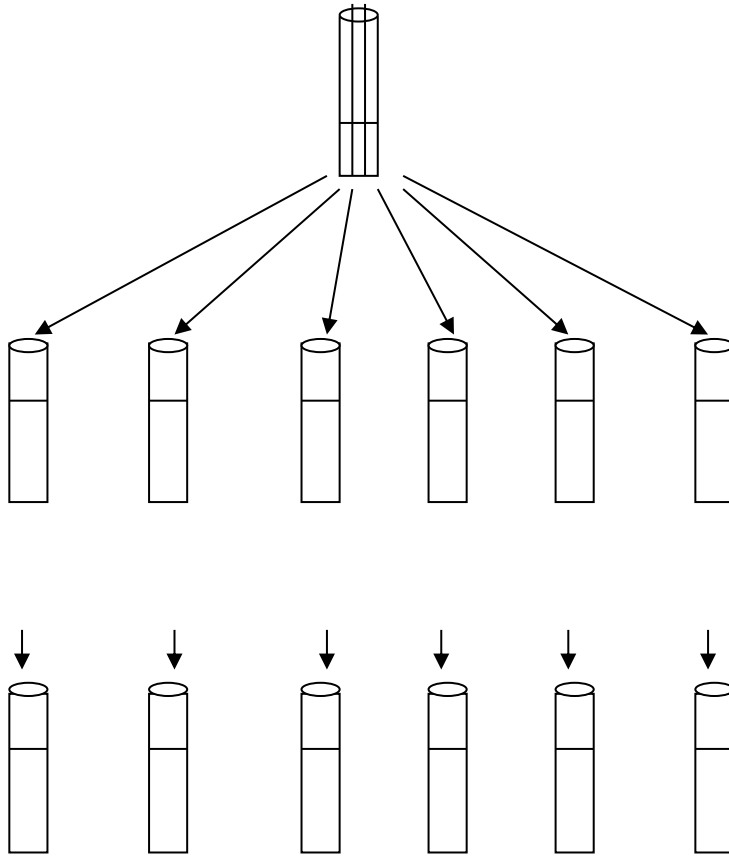
aplicadores de madera

## **PARTE I. DIA JUEVES**

### **EFFECTO DE LAS SUSTANCIAS QUIMICAS EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO**

#### **PROCEDIMIENTO**

1. Introducir un aplicador estéril en la suspensión de bacterias con el fin de contaminarlo
2. Retirarlo e introducirlo en el tubo que contienen 1 ml de agua destilada
3. Repetir el procedimiento anterior utilizando un aplicador diferente y colocarlo en cada uno de los demás tubos restantes que contienen desinfectantes y antisépticos dejando adentro el aplicador
4. Dejar por 30 minutos el aplicador contaminado con bacterias en los tubos que contienen cada uno de los agentes químicos
5. Cuando transcurran los 30 minutos, retirar el aplicador y sumergirlo en un tubo que contiene caldo de tripticasa soya. Descarte el aplicador en el recipiente adecuado.
6. Deberá tenerse cuidado de rotular cada tubo para evitar confundirlos.
7. Repita el paso anterior con los demás tubos restantes.
8. Incube a 37° C por 24 horas.



Suspensión de bacterias

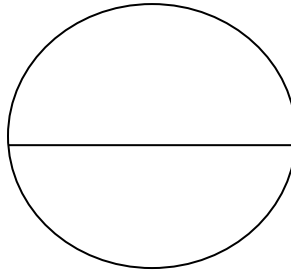
Soluciones desinfectantes

Caldos TSC

### EFFECTO DE LOS ANTISEPTICOS

1. Divida a la mitad por la parte posterior con lápiz graso una placa de agar tripticasa soya
2. En una mitad coloque dos dedos antes de aplicar el antiséptico
3. Aplíquese alcohol gel , jabón líquido o una torunda impregnada en alcohol en los mismos dedos , secar al aire
4. Coloque nuevamente los dedos sobre el agar en la otra mitad de la placa
5. Rotule la placa e incube a 37 ° C por 24 horas.
6. Compare los resultados obtenidos al día siguiente

### DEDO IZQUIERDO Y DERECHO



### PARTE II. DIA MIERCOLES.

#### PROCEDIMIENTO

1. Retire los medios de cultivo de la incubadora. Observe y anote los resultados del crecimiento en los caldos ,si hay o no turbidez.
2. Observe y explique los resultados obtenidos correspondientes al efecto de los agentes químicos en el crecimiento bacteriano
3. Anote en la tabla el nombre de la bacteria y los resultados obtenidos en el crecimiento
4. Discuta las variables que intervienen en los resultados obtenidos
5. Revise la placa de agar tripticasa soya y discuta los resultados obtenidos con los antisépticos ensayados

6. Observar la placa de demostración del antibiograma y consultar a su instructor para la interpretación del mismo, después de hacer la lectura con regla milimetrada ( ver figura ).

**Efecto de los agentes químicos. Crecimiento en TSC.**

**Nombre de las bacterias**

<b>DESINFECTANTE O ANTISEPTICO</b>	<b>1 crecimiento</b>	<b>2 crecimiento</b>	<b>3 crecimiento</b>	<b>4 crecimiento</b>
<b>1- Agua destilada estéril</b>				
<b>2- Solución multipropósito</b>				
<b>3- peróxido de hidrógeno 3 %</b>				
<b>4- Cloruro de benzalconio 0.1 %</b>				
<b>5- Tintura de Yodo al 3%</b>				
<b>6- Hipoclorito de sodio al 3%.</b>				
<b>7. SOLUCION OCULAR</b>				

+ CRECIMIENTO BAJO

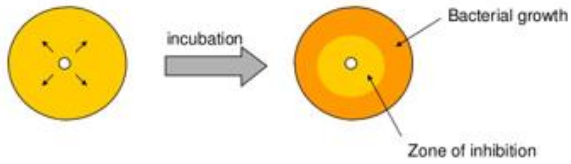
+++ CRECIMIENTO MEDIANO

++++ CRECIMIENTO ALTO.

**Placa de demostración del antibiograma**

Hoja con lecturas para la medición de los diámetros de la zona de inhibición  
EL ESTUDIANTE DEBERÀ TRAER REGLA MILIMETRADA

## Método de difusión de discos de Kirby-Bauer



## CUESTIONARIO

1. Escriba el mecanismo de acción de las siguientes sustancias químicas

a) Alcoholes: \_\_\_\_\_

b) Fenol \_\_\_\_\_

c) Tintura de Yodo \_\_\_\_\_

2. Escriba el nombre de dos bacterias que estudiò en la pràctica

\_\_\_\_\_  
Gènero

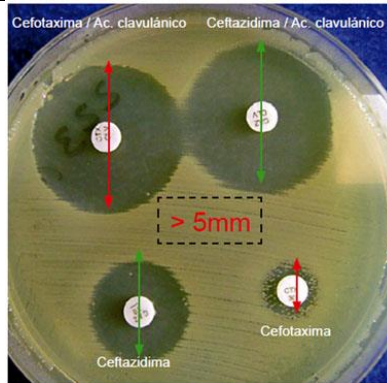
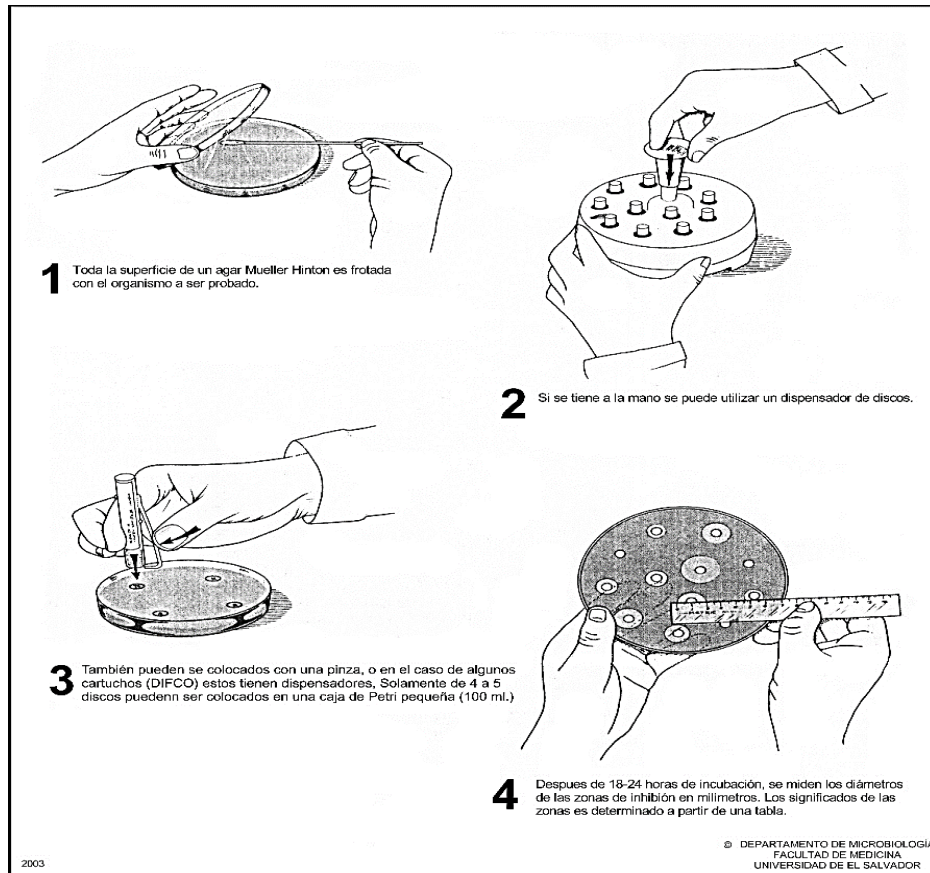
\_\_\_\_\_  
especie

\_\_\_\_\_  
Gènero

\_\_\_\_\_  
especie

3. ¿Cuáles son las tres lecturas posibles de un antimicrobiano en las pruebas de susceptibilidad?  
1. \_\_\_\_\_ 2. \_\_\_\_\_  
3. \_\_\_\_\_
4. Que es un desinfectante?
5. Que es un antiséptico?
6. Interprete el antibiograma:
7. Cual es la diferencia entre bactericida y bacteriostático?

**Figura N° 17**  
**DEMOSTRACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS**



## REFERENCIAS

Saona Santos, Carlos Luis, Manual de Contactología Clínica, Editorial Mason , 2002, España



## PRACTICA No. 7

### BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIONES OCULARES

---

#### INTRODUCCIÓN

Las infecciones oculares se pueden clasificar en aquellas que afectan las estructuras externas como párpados, conjuntiva, esclerótica, córnea y las que comprometen estructuras internas del globo ocular. Los principales mecanismos de defensa son las lágrimas y la conjuntiva; el lavado mecánico con el abrir y cerrar de los párpados, las lágrimas contiene Ig A secretora y lisozima en tanto que la conjuntiva cuenta con numerosos linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, células cebadas que responden con rapidez a la infección con inflamación y producción de anticuerpos y citocinas. La porción interna del ojo se protege de la invasión externa por la barrera física constituida por esclerótica y córnea, si ésta se daña con una lesión penetrante o ulceración hay posibilidad de infección.

La infección del ojo puede ser secundaria al uso de lentes de contacto ya que puede provocar una reducción en la eficacia de los mecanismos de defensa oculares, permitiendo que los patógenos puedan llegar a establecerse. El uso de colirios o de soluciones de limpieza contaminados, estuches y lentillas contaminadas son causa importante de infección.

Los agentes etiológicos más comunes son:

*Staphylococcus aureus* agente causal de infecciones en párpados y córnea.

*Streptococcus pneumoniae* ocasiona conjuntivitis bacteriana aguda.

En recién nacidos *Neisseria gonorrhoeae* causa oftalmía neonatal que se adquiere durante el nacimiento al pasar por el conducto del parto de una madre con gonorrea.

*Pseudomonas aeruginosa* causa infección grave de las estructuras internas del ojo como la endoftalmitis que se produce después de traumatismos, cuerpos extraños en el ojo, cirugía ocular, contaminación de los colirios y equipo de exploración oftalmológica contaminados.

#### OBJETIVOS.

Que el estudiante sea capaz de:

1. Conocer algunas características macroscópicas de las colonias de bacterias causantes de infecciones oculares.

2. Conocer la morfología microscópica con la tinción de Gram
3. Realizar la prueba de identificación para género *Staphylococcus*

### MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.

Cultivos en agar tripticasa soya de:

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus epidermidis*

*Streptococcus pneumoniae*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Serratia marscescens*

Frotis coloreado de *Neisseria gonorrhoeae*

Solución salina 0.85 %

Peróxido de hidrógeno 3%

Láminas portaobjetos 3x1 plg

Láminas portaobjetos 3x11/2 plg

Aplicadores de madera

Pruebas de coagulasa positivas y negativas

Asas bacteriológicas

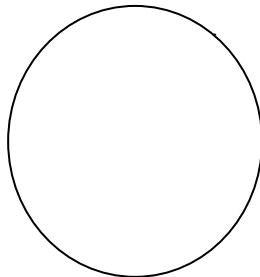
Colorantes para Gram

Microscopios



### DESARROLLO.

1. Observar los cultivos proporcionados y hacer descripción macroscópica de las colonias
2. Realizar frotis y colorearlos con la tinción de Gram
3. Describir la morfología microscópica observada
4. Realizar la prueba de la catalasa tomando una colonia con aplicados de madera y depositándola en una lámina portaobjeto, agregar una gota de reactivo peróxido de hidrógeno. Reporte lo que observe.



Descripción macroscópica

---

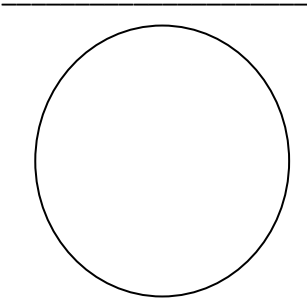


---



---

Descripción macroscópica

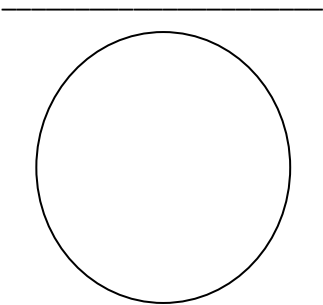


---

---

---

Descripción macroscópica

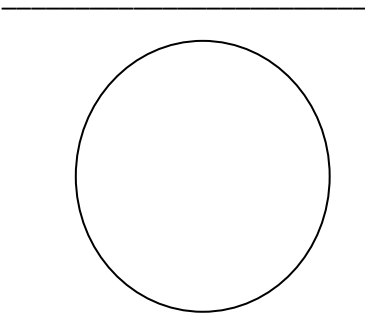


---

---

---

Descripción macroscópica

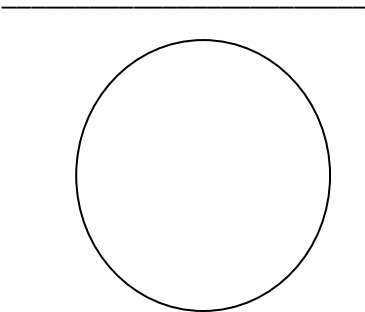


---

---

---

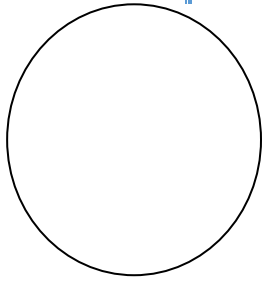
Descripción macroscópica



---

---

---



Descripción macroscópica

---



---



---



---

### CUESTIONARIO

1. La utilidad de la prueba de la catalasa \_\_\_\_\_
2. La característica macroscópica de *Serratia marcescens* \_\_\_\_\_
3. El nombre de la bacteria que dio positiva la prueba de la coagulasa  
\_\_\_\_\_
4. ¿Cuál es el nombre de la bacteria que causa conjuntivitis neonatal ?  
\_\_\_\_\_
5. Describa lo observado en el frotis del agente causal de la gonorrea  
\_\_\_\_\_
6. Escriba el nombre de la bacteria que produce pigmento verde en el TSA  
\_\_\_\_\_ ¿Cuál  
patología ocular ocasiona ? \_\_\_\_\_

### REFERENCIAS

Murray, Patrick; Rosenthal, Ken; Kobayashi, George; et al; MICROBIOLOGÍA MÉDICA 5ª. edición.  
ELSEVIER, España 2006





**PRACTICA No.8**  
**FLORA HUMANA NORMAL Y AMBIENTAL**

---

**INTRODUCCION.**

Los microorganismos se encuentran presentes en todos los ambientes: en el aire, en el agua, en la superficie de los objetos e incluso sobre nuestra piel. Esta práctica, ha sido diseñada para demostrar la presencia de los microorganismos en el ambiente; así como también en el humano, utilizando para ello técnicas convencionales de laboratorio. Para ello, analizarán muestras tomadas de diferentes sitios del medio ambiente, como son: aire, agua de charco, tierra de jardín. Así mismo constatarán la presencia de microorganismos provenientes de diferentes áreas anatómicas del cuerpo humano.

**La flora humana normal**, comprende a una población permanente de microorganismos, que varía tanto en número como en clase de un sitio a otro en el organismo. El término de flora microbiana normal o microbiota se refiere a una población de microorganismos que habita algunos tejidos, (piel y mucosas) de personas sanas.

Durante la gestación y bajo condiciones normales, el feto se encuentra libre de gérmenes, excepción que se hace cuando algunos agentes atraviesan la barrera placentaria. Durante el parto y después de éste, el recién nacido se expone a la flora de las vías genitales de la madre, sean estos o no miembros de la flora normal; a la flora cutánea, oral y respiratoria de quienes lo cuidan y los microorganismos del ambiente. Varias semanas después, ha adquirido una flora selectiva con la cual es capaz de convivir. El ambiente ocasionalmente le suministra gérmenes a algunos de sus miembros, los cuales no lo colonizan debido a que no les proporciona un hábitat favorable; aunque algunos, ocasionalmente puedan ser aislados y cultivados en el laboratorio.

Normalmente, muchos sitios del organismo son estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo, riñones, etc.); por el contrario, las áreas, mucosas o tejidos que tienen comunicación con la piel, se encuentran pobladas por gérmenes.

**Flora ambiental.**

Tres son los elementos del ambiente a ser tomados en cuenta para fines de esta práctica; éstos son: el suelo, el agua y el aire.

**El suelo** representa el principal reservorio de los microorganismos del ambiente. En él se encuentran las concentraciones más grandes y más variadas, los más sencillos y los más complejos y además, alberga a un número significativo de microorganismos de interés en la patología de las enfermedades del hombre y de los animales.

**El agua** también contiene un número grande de bacterias provenientes del suelo y de los animales. De ella, se obtienen microorganismos de las nieves, aguas termales, fuentes naturales de agua dulce

y en especial, de ríos y quebradas contaminadas por el hombre; lugares en los cuales, éste deposita sus desechos.

**El aire** actúa como vehículo. En éste, los microorganismos no se multiplican y constituye una de las principales fuentes de infección. El aire libre está sobrecargado. En este encontramos un ambiente saturado desde unos pocos centímetros por sobre el nivel del suelo, hasta una altura próxima a los 7,000 metros, en donde todavía se encuentra a algunos de ellos; a mayor altura, el aire enrarecido, la desecación y los rayos ultravioleta, se encargan de destruirlos. El aire confinado es más dañino; de él se obtienen frecuentemente microorganismos que se han adherido a partículas de polvo, moco o saliva provenientes de personas enfermas o portadores de algunos microorganismos.

El aire, además de partículas en suspensión, es portador de bacterias o sus esporas. Por ello, puede ser causa tanto de contaminación de alimentos y superficies como de infecciones en el hombre (patologías respiratorias y otras.). En esta práctica vamos a explicar el método de sedimentación en placa es uno de los más sencillos para la determinación de microorganismos del aire, los resultados obtenidos orientan de la cantidad de microorganismos presentes en el aire, ya que estos niveles varían en función de las corrientes de aire y del tamaño de las partículas en suspensión.

### **OBJETIVOS**

Que al finalizar la práctica los estudiantes:

- a) Verifiquen la presencia de los microorganismos en el ambiente.
- b) Comprueben la existencia de los microorganismos de algunas áreas del cuerpo humano.
- c) Describir la morfología de las colonias bacterianas y su morfología con la coloración de Gram del ambiente y de la flora normal.

### **MATERIAL Y EQUIPO.**

Un frasco con agua estancada (la traerá el estudiante).

Un frasco de boca ancha tipo Gerber con tierra de jardín (la traerá el estudiante).

6 Placas de Petri con agar tripticosa soya (TSA).

Un tubo de 13 x 100 con solución salina 0.85% estéril.

Una bolsa con hisopos estériles.

Una bolsa con pipetas Pasteur estériles.

Bulbos de hule

Láminas portaobjetos y cubre-objeto

Microscopio

Colorantes para Gram

### **PARTE I. DIA MARTES**

Un lado de mesa trabajará con las muestras ambientales y el otro lado con flora humana normal.

#### **MUESTRAS AMBIENTALES**

##### **AIRE**

- 1- Quite la tapadera a una de las placas de Petri que contiene TSA estéril y deje expuesta la superficie del medio de cultivo al ambiente (aire), durante 30 minutos. Tape, rotule la placa.

#### **AGUA ESTANCADA**

- 2- Agite suavemente el frasco que contiene el agua estancada. Con el asa estéril, obtenga una muestra (inóculo) y deposítela sobre la superficie del medio de cultivo y realice el método de siembra en estrías. Rotule e identifique la placa .  
Coloque una gota del sedimento del agua de charco entre lámina y laminilla y obsérvela al microscopio con objetivo 10 y 40X, en busca de microorganismos de vida libre.

#### **TIERRA DE JARDIN**

- 3- Obtenga una pequeña muestra de tierra de jardín. Destape una de las cajas con TSA y coloque la muestra sobre el medio de cultivo, siembre por el método de estrías. Rotule

#### **FLORA HUMANA NORMAL**

- 1- Introduzca suavemente un hisopo en el conducto auditivo externo, rótelas a manera de tener cerumen. Inocular con el hisopo una placa de TSA y luego con el asa realice el sembrado por el método de estrías.
- 2- Introduzca suavemente un hisopo en las fosas nasales, rótelas a manera de obtener secreción nasal. Inocule con el hisopo una placa de TSA y luego con el asa realice el método de estrías.
- 3- Humedezca un hisopo en la solución salina 0.85% estéril, luego frote por su piel (manos, brazos). Inocule con el hisopo una placa de TSA y con el asa realice el método de estrías.
- 4- Lleve las placas a la incubadora en donde permanecerán entre 18 a 24 horas bajo condiciones de aerobiosis y a  $36 \pm 1^\circ \text{C}$ . Observe que las placas que contienen las muestras, queden en posición invertida.

### **PARTE II. DIA MIERCOLES**

#### **MATERIAL Y EQUIPO**

Tubos de vidrio con tapón con rosca 13 x 100 mm. con 1 ml. de solución salina estéril al 0.85 %  
Set de reactivos y colorantes para Gram  
Porta objetos 3 x 1 pulgadas para los frotis.  
Microscopios

#### **PROCEDIMIENTO**

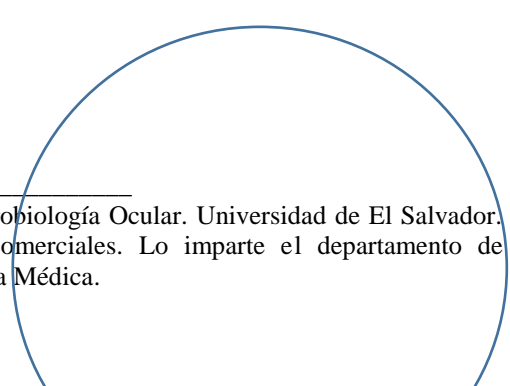
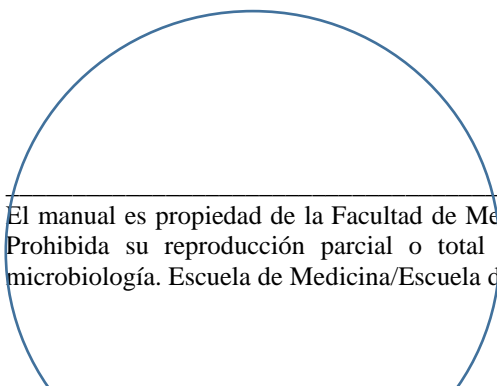
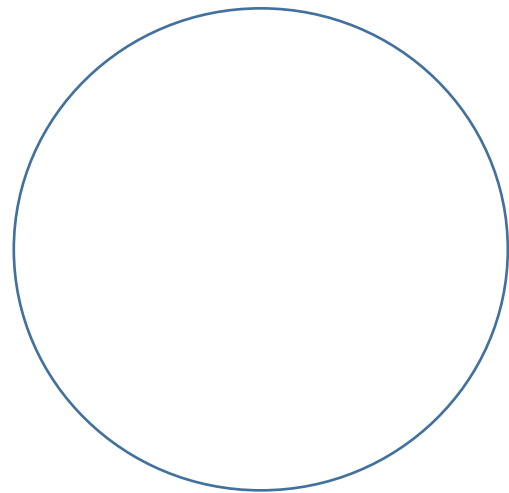
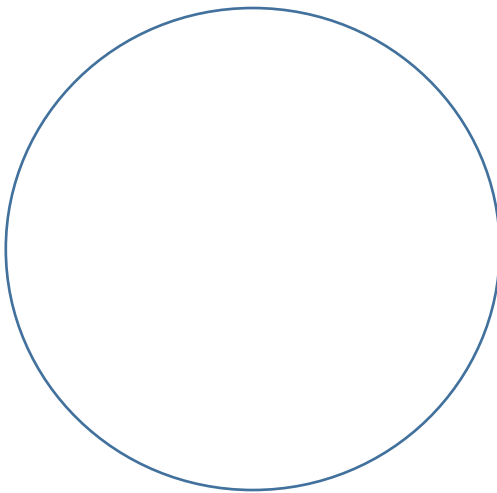
Retire las placas de la incubadora y observe si hay crecimiento. Describa las colonias de cada una de las placas inoculadas con muestras ambientales y de la flora normal.  
Realice coloración de Gram de dos colonias de cada placa. Observar la cantidad de colonias en cada una de ellas. Reporte los resultados obtenidos.

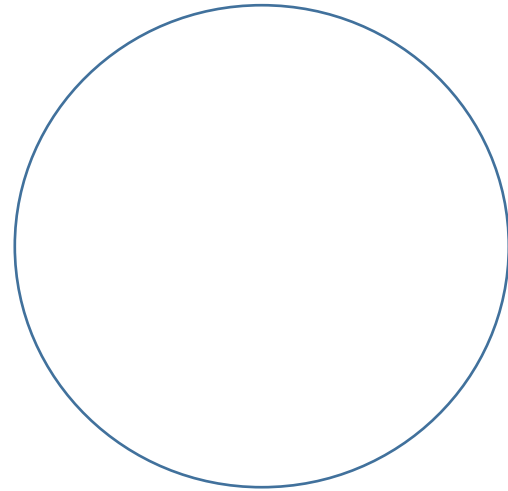
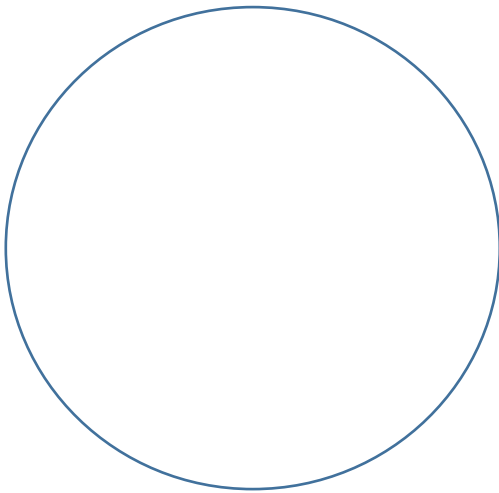
**MEDIO AMBIENTE.**

<b>Ambiente</b>	<b>Cantidad de crecimiento</b>	<b>Coloración de Gram</b>	<b>Descripción macroscópica de las colonias</b>
<b>Aire</b>			
<b>Agua estancada</b>			
<b>Tierra de jardín</b>			

**FLORA HUMANA NORMAL.**

<b>Sitio anatómico</b>	<b>Cantidad de crecimiento</b>	<b>Coloración de Gram</b>	<b>Descripción macroscópica de las colonias</b>
<b>Oídos</b>			
<b>Fosas nasales</b>			
<b>Piel</b>			





### CUESTIONARIO

1. ¿ Pueden los microorganismos vivir en el aire ? ¿ Por qué ? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
2. Escriba el concepto de infección \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
3. ¿Cuál es la diferencia entre infección y enfermedad ? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
4. ¿ A qué se le conoce como microorganismo oportunista ? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
5. ¿ Qué es un microorganismo facultativo ? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

6. ¿ Qué son microorganismos patógenos ? \_\_\_\_\_
7. ¿ De acuerdo a los resultados de la práctica qué tipo de microorganismo predomina en la flora normal ? \_\_\_\_\_
8. ¿ Qué tipo de bacterias predominan en la muestra de agua estancada ? \_\_\_\_\_
- 9 ¿Cuál ambiente está más contaminado ? \_\_\_\_\_  
¿Cuál es la razón ? \_\_\_\_\_

#### REFERENCIAS

Murray, Patrick; Rosenthal, Ken; Kobayashi, George; et al; MICROBIOLOGÍA MÉDICA 5ª. edición. ELSEVIER, España 2006

Pelczar, et al , Microbiología, 4ª. Edición, Editorial Mc Graw Hill, México , 1977

#### BACTERIAS EN PIEL.





## PRACTICA No 9. DEMOSTRATIVA HONGOS CAUSANTES DE INFECCIONES OCULARES

---

### INTRODUCCION

Los hongos son organismos eucarióticos que pertenecen al Reino Fungi. Se reproducen por esporas o conidias, tienen estructura propia y, a diferencia de las plantas, carecen de clorofila. Los hongos incluyen mohos y levaduras, que son microscópicos y las setas (por ejemplo: champiñones). El ambiente está cargado de esporas de diversos hongos y, por lo general, éstas flotan en el aire. Entre la amplia variedad de esporas que caen sobre la piel o son inhaladas hacia los pulmones sólo algunas producen infecciones menores, y sólo rara vez se extienden hacia otras partes del organismo. Algunos tipos de hongos, como *Cándida*, pueden vivir normalmente sobre la superficie del cuerpo o dentro del intestino. Estos habitantes habituales del organismo sólo ocasionalmente pueden causar infecciones locales de la piel, la vagina o la boca, pero muy rara vez producen más daño. En ciertos casos, determinadas variedades de hongos, pueden producir infecciones graves en el resto del cuerpo. A lo largo de las dos últimas décadas, los hongos se han convertido en una causa importante de enfermedad en el ser humano.

Los hongos tienen una tendencia especial a causar infecciones en individuos con un sistema inmunológico deficiente. Por ejemplo, los enfermos de SIDA o quienes reciben tratamiento contra el cáncer tienen más probabilidades de desarrollar infecciones micóticas graves. En algunos casos, las personas con inmunidad deficiente desarrollan infecciones causadas por tipos de hongos que, muy rara vez, por no decir nunca, causan daño a los individuos cuyos sistemas de inmunidad funcionan normalmente. Entre estas infecciones se encuentra la mucormicosis y la aspergilosis.

Si se deposita una spora en un medio de cultivo adecuado para su desarrollo, ella dará origen a la formación de una o más prolongaciones de aspecto tubular llamado tubo germinal. Por crecimiento del tubo germinal, se forma una estructura larga filamentosa la cual constituye la hifa. Si la hifa resultante está formada por una cadena regular de células que se comunican unas con otras a través de un orificio denominado poro septal, a la hifa se le conocerá como tabicada. Si no presenta tabiques o septos se le conocerá como cenocítica.

En el medio de cultivo al conjunto de hifas se le conoce como micelio. De acuerdo a la función, el micelio puede ser:

**Sumergido:** asegura la nutrición del hongo por medio de absorción; **vegetativo:** se haya adyacente al sustrato y sirve para fijación y desarrollo del micelio reproductor; **reproductor (o aéreo)** sobresale del medio de cultivo, su función es el de reproducción. En los hongos, el tamaño y el color del micelio aéreo contribuye al estudio del aspecto macroscópico característico.

Hay hongos unicelulares llamados levaduras, las cuales son células redondas ovoides o alargadas de pared delgada que se reproducen por gemación. La gemación es un proceso por medio del cual de una célula madre original, se desprenden las células hijas.. La forma de la colonia que producen estos hongos también varía, pues es de aspecto blanquecino grisáceo , similares a las colonias que producen las bacterias, y se les conoce como colonias levaduriformes. Hay hongos que desarrollan la fase micelial, otros la levaduriforme y otros que desarrollan las dos. A estos últimos se les conoce como dimórficos; desarrollan la fase levaduriforme en lesiones en tejidos y medios de cultivo adecuados a 37 ° C y la fase micelial a temperatura ambiente (28° C).

Es importante conocer algunas especies de hongos saprófitos, debido a que contaminan el ambiente, los medios de cultivo de laboratorio y pueden dar lugar a un diagnóstico erróneo; o bien, producir enfermedad en individuos con enfermedades crónicas debilitantes con niveles de defensa disminuidos.

En esta práctica el estudiante se familiarizará con algunas estructuras de los hongos. Para esto se utilizarán cepas de hongos que en una persona normal (inmunocompetente) no son capaces de producir una infección. Estos hongos se encuentran en el ambiente: tierra, suelo, plantas,. A partir del estudio de ellos se tendrá el conocimiento básico necesario acerca del origen, forma, estructura y función de los hongos. El estudiante deberá identificar las estructuras de los hongos con las ilustraciones del manual. Observará el aspecto macroscópico y microscópico de los hongos proporcionados, identificando las colonias filamentosas y levaduriformes, las hitas tabicadas y cenocíticas y otras estructuras que le ayuden a reconocer los hongos.

Las **queratomicosis** son infecciones de la córnea del ojo causadas por hongos, que por lo general son NO patógenos. Son generalmente confundidos por infecciones bacterianas por lo que es común que el paciente con la infección llegue donde el oftalmólogo en mal estado, poniendo en muy alto el riesgo de perder el ojo.

Son personas en riesgo de adquirir las micosis oculares: agricultores, trabajadores de la construcción, mal manejo en el uso de lentes de contacto , personas que han sufrido un trauma accidental del ojo, o posterior a cirugía en el mismo, presencia de humedad, polvo, altas temperaturas y viento.

### **Síntomas**

Dependiendo de la gravedad de la infección, se pueden referir fotofobia, dolor, sensación de cuerpo extraño en el ojo, con pus y enrojecimiento de la córnea. Luego aparece una úlcera en las que se pueden observar líneas concéntricas que corresponden con los filamentos fúngicos. La progresión no tratada de una úlcera corneal puede ser fulminante para el ojo.

### **Especies**

Las infecciones oculares por hongo ocurren con más frecuencia por los siguientes géneros de hongos , los cuales son por lo general saprófitos del suelo:

- Género Aspergillus
- Género Fusarium

- Género *Penicillium*

La identificación de los hongos requiere un conocimiento básico de sus distintas características morfológicas, macroscópicas y microscópicas. El diagnóstico rápido y seguro es crucial en las infecciones micóticas para asegurar al paciente un tratamiento apropiado.

El tratamiento correcto depende del diagnóstico etiológico, el cual se basa en una combinación de la historia clínica apoyado en el examen microscópico directo y el cultivo de material corneal tomado de la zona afectada o de la úlcera. Debido a la escasa cantidad de material disponible es imprescindible que la muestra sea valorada en el traslado y manipulación previo al examen de laboratorio. Estos hongos se aislan fácilmente en casi todos los medios micológicos comunes, en particular el agar dextrosa de Sabouraud.

### OBJETIVOS

Que al finalizar la práctica los estudiantes tengan la capacidad de :

- 1.Describir el crecimiento de los hongos proporcionados
- 2.Diferenciar las características de una colonia micelial y una levaduriforme
- 3.Reconocer los tipos de hifas :tabicadas y cenocíticas
4. Conocer las estructuras microscópicas características de algunos hongos

### MATERIALES Y EQUIPO.

Tubos de agar glucosado de Sabouraud con:

*Candida sp*  
*Fusarium sp*  
*Aspergillus sp*  
*Rhizopus sp.*

Asas en L.

Frascos con lactofenol azul algodón.

Microscopios.

Portaobjetos 3 x 1"

Cubreobjetos 22 x 22 mm

Microcultivos de los mismos hongos

### PROCEDIMIENTO. DEMOSTRATIVO

#### 1. Estudio de las características macroscópicas de las colonias.

Observe el tipo de colonia, si es levaduriforme o micelial.

Describe las características macroscópicas de los cultivos de los hongos miceliales proporcionados

Tipo de colonia

Altura del micelio

Color del micelio

### Aspecto del micelio

En la colonia levaduriforme describir el tipo de colonia , color ,y aspecto. Aquí no se produce micelio.

## 2. Estudio de las características microscópicas .Preparación del disociado

Coloque una gota de lactofenol azul algodón en el centro de la lámina.

Con el asa en L obtenga un fragmento pequeño del hongo y deposítelo sobre la gota de lactofenol azul algodón.

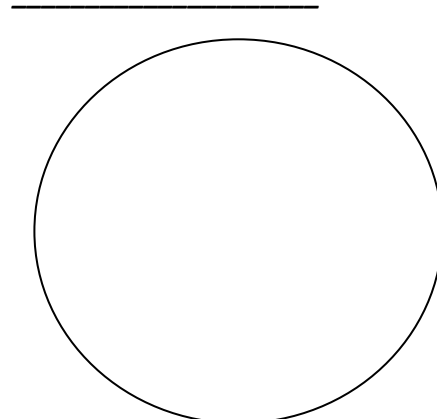
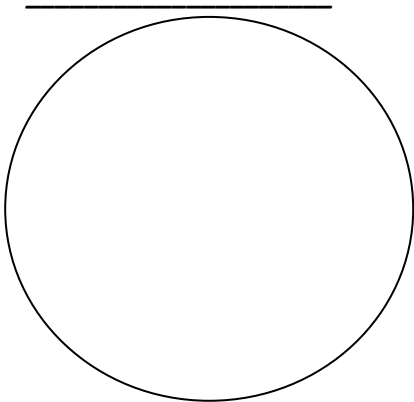
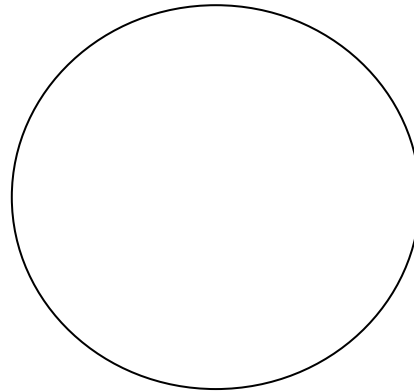
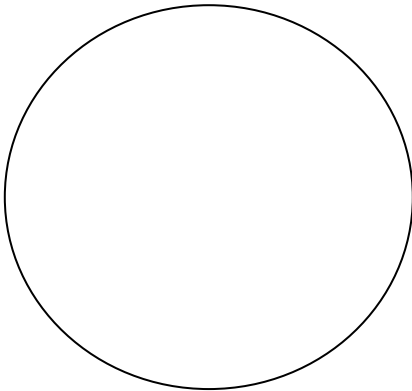
Con la aguja de disección estéril y con el asa en L, separe suavemente el fragmento del hongo . cubrir con una laminilla

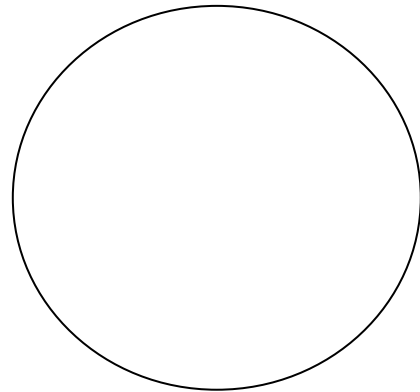
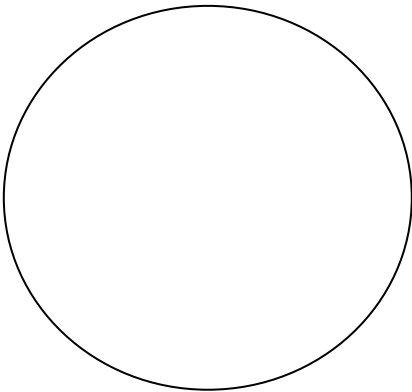
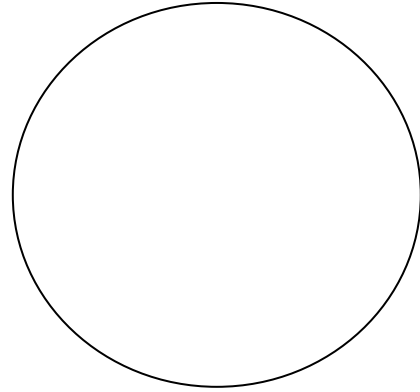
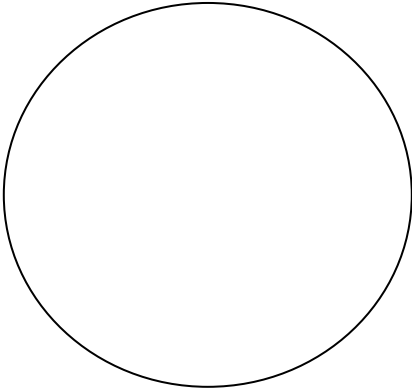
Enfoque con el objetivo de 10x y luego con el de 40x .

Esquematice las estructuras observadas y compare con algún texto de referencia.

MACRO

MICRO

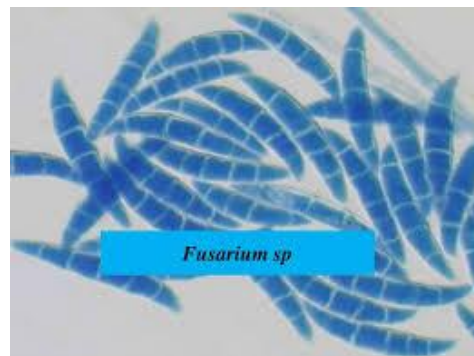


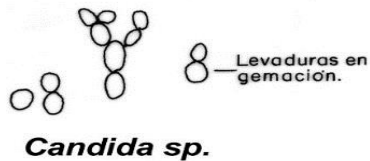
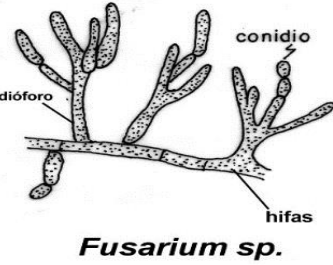
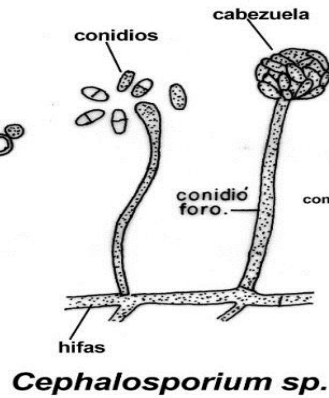
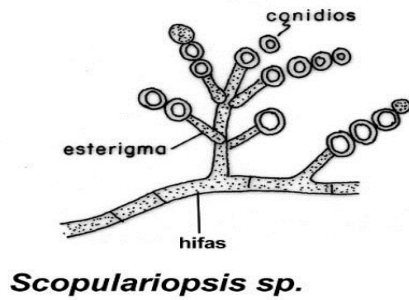
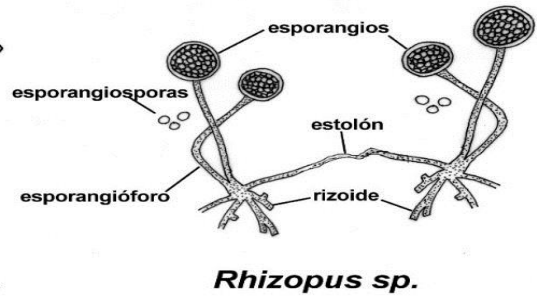
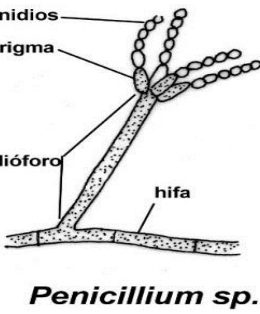
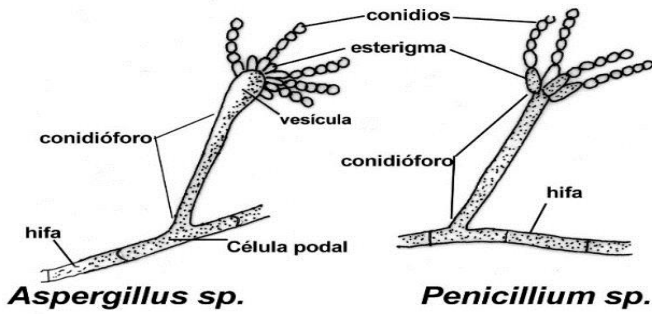
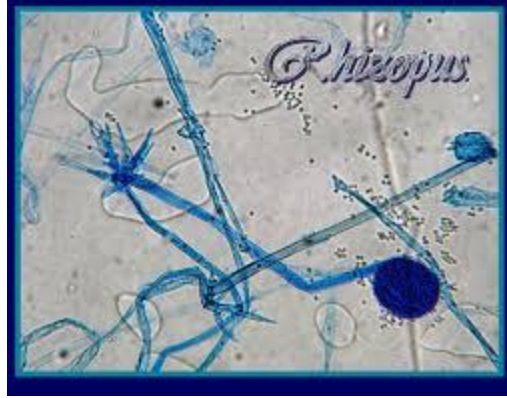


### ESTRUCTURAS MICROSCOPICAS DE LOS HONGOS



*Candida albicans*





## Cuestionario

1. Escriba el género del hongo que presentó hifas cenocíticas \_\_\_\_\_ y uno en el que observó hifas tabicadas \_\_\_\_\_
2. ¿Cuál es el nombre de las estructuras de reproducción del *Aspergillus sp* ? \_\_\_\_\_
3. Escriba \_\_\_\_\_ la \_\_\_\_\_ definición \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ queratomicosis \_\_\_\_\_ y una causa que predispone a padecerla \_\_\_\_\_
4. El hábitat de los hongos miceliales que estudió en la práctica es : \_\_\_\_\_
5. Describa el crecimiento de *Candida sp* \_\_\_\_\_ ¿ Es este un hongo unicelular o pluricelular ? \_\_\_\_\_
6. Escriba el nombre del medio de cultivo para hongos que estudió en la práctica \_\_\_\_\_ y cuáles son sus componentes \_\_\_\_\_
5. Escriba los cuidados que se deben de tener con los LC para evitar una queratomicosis \_\_\_\_\_
6. Escriba el género del hongo que presentó estructuras de reproducción asexual interna \_\_\_\_\_
7. Por su nutrición, los hongos se clasifican como : \_\_\_\_\_
8. Escriba los tres tipos de micelio y su función
  - a. \_\_\_\_\_
  - b. \_\_\_\_\_
  - c. \_\_\_\_\_
9. ¿Cuál es el hongo que se encuentra como habitante de la flora humana normal ? \_\_\_\_\_

## REFERENCIAS

Pelczar et al, Microbiología , 4ª. Edición , Editorial Mc Graw Hill, México , 1977

Prescott, et al, Microbiología, 5ª. Edición, editorial Mc Graw Hill, Madrod, 2002

# 10

## PRACTICA No 10. DEMOSTRATIVA PARASITOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES OCULARES

### INTRODUCCION.

Son muchos los parásitos que causan afecciones del globo ocular. Algunos de ellos predominan en ciertas regiones geográficas, por ejemplo, la toxoplasmosis y la oncocercosis son reconocidas como octava causa de debilidad visual en algunos países como México. En Africa existen muchos casos de oncocercosis ocular en personas mayores, debido a que habitan cerca de los ríos donde se localiza el vector, por ésta razón, se le ha dado el nombre a la enfermedad de “ceguera de los ríos”. Los parásitos que habitan en el interior del hospedero se llaman endoparásitos y si lo hacen en la parte externa se llaman ectoparásitos. En ésta práctica se van a estudiar algunos parásitos que afectan el ojo y sus anexos y que dependiendo de la zona geográfica así será la frecuencia de casos que se presentan, ya que en algunas de ellas los vectores, en el caso son artrópodos o animales invertebrados que participan en la transmisión, ya sea como vectores mecánicos o biológicos.

### ONCOCERCOSIS

El parásito se presenta como adultos machos y hembras, por lo general entrelazados dentro de nódulos, subcutáneos principalmente. Los parásitos adultos son de color blanco opalescente y transparente, con estrías transversales en su cutícula. Los adultos habitan en el tejido conjuntivo y subcutáneo de la piel llamados oncocercomas. Cuando los machos y hembras copulan, las hembras paren, microfilarias que son filiformes ( forma de hilo ) las cuales invaden los ojos y ocasionalmente la sangre, ganglios linfáticos o vísceras. Las microfilarias son succionadas de la piel por el vector ( *Simulium* ). La enfermedad predomina en zonas rurales de clima cálido o templado, húmedas y con arroyos o quebradas en donde se multiplica el vector.

En América Latina se han conformado grupos de control en México, Guatemala, Ecuador, Colombia, Venezuela, Brasil. La enfermedad se produce cuando el vector infectado llamado “ jején ”, pica e introduce en el huésped humano sano las microfilarias.

### Localización

Los parásitos adultos quedan atrapados en los tejidos del huésped, formando generalmente nódulos subcutáneos cuyo tamaño, depende de los meses o años de evolución del padecimiento. Así, algunos tienen el tamaño de una lenteja, mientras que otros pueden alcanzar el de un huevo de gallina. Se localizan principalmente en la cabeza, cuello, hombros, a lo largo de la columna vertebral, y parte superior de los glúteos; pero a veces tienen localizaciones raras como en el lóbulo de la oreja o viscerales. Los nódulos deben ser extirpados quirúrgicamente para eliminar los parásitos adultos.

y disminuir la producción de microfilarias. Las cuales tienen tendencia para invadir el globo ocular produciendo diversas patologías que conducen a la ceguera siendo mayormente afectado el tracto uveal y la cámara anterior por acción directa de los parásitos o a los productos tóxicos liberados al morir la microfilaria o por mecanismos de hipersensibilidad (alergia).

### **TOXOPLAMOSIS**

El hombre se infecta por la ingestión de ooquistes diseminados en el ambiente. Los ojos constituyen una localización importante y frecuente del parásito de la retina. La retina y la coroides muestran necrosis, en la retina es el lugar donde se establecen los parásitos produciendo inflamación.

La toxoplasmosis es una infección de las capas internas del ojo producida por un parásito *Toxoplasma gondii*. La enfermedad puede ser congénita (la madre infecta al feto a través de la placenta) o adquirida cuando se manifiesta en la edad adulta. El síntoma más importante es el de visión borrosa, aunque la visión también puede estar limitada si la lesión afecta a las áreas vitales de la retina (mácula o nervio óptico). La toxoplasmosis ocular aparece a cualquier edad, la retinocoroiditis es unilateral, de preferencia en la región macular. Durante el tercer trimestre de embarazo, la transmisión al feto ocurre casi en 60% de los casos, probablemente debido a una mayor vascularización de la placenta, el parásito contamina al feto y se desarrolla la enfermedad en la vida intrauterina. La retinocoroiditis es la manifestación más común. Es bilateral en 85% de los pacientes y afecta la mácula en 58% de ellos.

### **Prevención**

Debe reforzarse el lavado de alimentos naturales que puedan contaminarse con tierra que contenga ooquistes que se encuentran en las heces de gato. Sólo debe usarse agua potable y no ingerir carne cruda. No se deben manipular deposiciones de gato y estas deben eliminarse cada 24 h dado que el ooquiste es infectante sólo 48 h después de eliminado en la deposición. Debe evitarse la infección del gato doméstico impidiendo que cace ratones y que coma carne cruda. Debe alimentarse solamente con comida especial de gato. Para prevenir la toxoplasmosis congénita debe identificarse a las mujeres embarazadas susceptibles y reforzar las medidas de prevención.

### **TOXOCARIOSIS OCULAR**

Es una patología producida como consecuencia de la migración a la localización ocular, de las larvas de *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, el ascárido habitual del perro y del gato respectivamente.

La transmisión de este parásito al hombre se produce tras la ingestión de los huevos embrionados, liberados con las heces de los cachorros que contaminan los suelos. Los huevos del parásito contaminan al hombre, ya sea a través de las manos, por el consumo de vegetales crudos insuficientemente cocinados, por contacto con perros parasitados. Después de ingerir los huevecillos se liberan larvas en el intestino las que llegan a la vía sanguínea y se localizan en el hígado, ojo, sistema nervioso central. Estas larvas no se desarrollan a parásitos adultos por ser el hombre un hospedero inadecuado.

Se diagnostica principalmente en niños de edades comprendidas entre 2 y 7 años, a menudo con historia de geofagia y contacto con cachorros. Se manifiesta con signos y síntomas localizados en el

ojo. Se considera tradicionalmente como el resultado de la migración de muy pocas, a veces una sola larva, presentándose como una lesión típicamente unilateral, aunque se han descrito casos bilaterales. Son capaces de invadir casi todas las estructuras del ojo. La mayoría de la patología asociada a esta infección se produce como consecuencia del daño tisular causado por dos fenómenos: la propia respuesta inflamatoria y por los productos metabólicos, liberados por las larvas vivas.

### ***Phthirus pubis***

Los piojos del pubis se conocen con el nombre científico de *Phthirus pubis*. La infestación con estos piojos es ampliamente difundida especialmente cuando disminuye la higiene y aumenta la promiscuidad. La transmisión ocurre principalmente durante la actividad sexual, pero también se presenta por contacto físico con objetos contaminados como las tazas de baño, sábanas y frazadas. ropa interior.

Son criaturas pequeñas, de 1 a 2 mm, comúnmente se llaman ladillas, las patas son cortas y fuertes y terminan en garras muy desarrolladas que le permiten fijarse a los pelos gruesos del cuerpo como los del pubis, cejas, pestañas, vello axilar, barba, bigote, cuero cabelludo y ponen sus huevos allí.. Existen casos de mujeres que se han contagiado en una tienda al probarse un traje de baño. Además existe la posibilidad de otros mecanismos de transmisión.

Es de hábitos sedentarios, no cambia de lugar con frecuencia. Se instala en un punto, sujetándose a un pelo con sus patas, y con sus estructuras bucales insertadas en la piel, ingiere sangre de un modo casi continuo, al parecer sin aumentar de volumen, debido posiblemente a que deyecta con mucha frecuencia, hecho que conduce al acúmulo de material excrementicio en torno a su ubicación.

La parasitosis se propaga principalmente por contacto sexual y por lo general se presenta en individuos de bajo nivel educacional, precarias condiciones socio-económicas y deficientes prácticas de higiene personal. También se puede adquirir por contacto personal íntimo al compartir adultos infestados y niños pequeños una misma cama y más improbablemente por otros medios tales como asientos de inodoros.

Requiere temperaturas entre 25 y 37°C y no sobrevive fuera de huésped más de 14 horas. Los síntomas más frecuentes suelen ser prurito y presencia de máculas ceruleas. Cuando la infección es en pestañas, sólo un examen detallado puede descubrir los adultos y los huevos.

### **Caso de blefarconjuntivitis por *Phthirus pubis***

Al examen a lámpara de hendidura de 16 aumentos el OI presentaba unas partículas marrón-rojizas en el nacimiento de varias pestañas (figs. 1 y 2) y en otras unas concreciones blanco-nacaradas, tanto en las del párpado superior como inferior. La conjuntiva del fondo de saco inferior presentaba hiperemia de grado moderado. Cuando la infección es en pestañas, sólo un examen detallado puede descubrir los adultos y los huevos.

## **TENIASIS Y CISTICERCOSIS**

Parasitosis ocasionadas por *Taenia solium* son problemas de salud pública que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza. La cisticercosis se encuentra en África, Asia y Latinoamérica; en particular, México y Brasil son los países que informan las frecuencias más altas. La contribución que tiene la cisticercosis humana en las tasas de morbilidad y mortalidad es resultado del desarrollo del cisticerco en el sistema nervioso central (SNC), lo que frecuentemente causa discapacidad física y en ocasiones la muerte.

#### Ciclo biológico

El hombre desarrolla teniosis intestinal por la ingestión de cisticercos vivos inadecuadamente cocidos en la carne del hospedero intermediario natural, el cerdo. El portador puede permanecer infectado por varios años. Aproximadamente cuatro meses después de la infección, la tenia adulta libera diariamente con las heces del portador alrededor de 300 000 huevos con capacidad de infectar a seres humanos y a cerdos causando cisticercosis. Los cisticercos se desarrollan en el músculo y el cerebro (neurocisticercosis). En las personas, la infección ocurre por la ingestión de alimentos o agua contaminados con excremento humano que contiene huevos; esto se facilita por la convivencia con un portador de *T. solium*.

#### Teniosis

La teniosis es una infección producida por los helmintos de la familia *Taenidae* en su fase adulta. Existen dos especies que afectan a los humanos: *Taenia solium* y *Taenia saginata*, mismas que requieren dos hospederos intermediarios (cerdo y res, respectivamente) para completar sus ciclos de vida. El hombre es el hospedero definitivo obligatorio para ambas tenias.

#### Cisticercosis

Es una infección parasitaria producida por la ingestión de alimentos o agua contaminados con excremento que contiene huevos de *Taenia solium*. Una vez localizados en el intestino delgado, lo atraviesan hasta llegar por circulación sanguínea, coroidea, hasta la retina.

La ubicación más frecuente de la larva es en tejido celular subcutáneo y en músculos, seguidos del ojo y SNC. Histológicamente, produce una reacción granulomatosa, rodeada de una cápsula fibrosa. Con el tiempo la larva muere y se calcifica. Tanto en el ojo, como en SNC el quiste puede estar libre, sin encapsulación fibrosa.

El cisticerco puede desarrollarse en cualquier parte del globo ocular y de sus anexos, siendo más frecuentes las localizaciones en retina, espacio subhialoideo, vítreo, y cámara anterior. Los síntomas dependen de su localización y pueden ser muy variados, como pérdida súbita de la visión, vitreitis, uveitis, desprendimiento de retina, etc.

La lesión inicial mide aprox. 20 mm y es de color grisáceo, y en raras ocasiones se aprecian, el escólex y el movimiento de la larva en el interior del ojo. Ecográficamente se puede encontrar y demostrar el movimiento de la larva.

El tratamiento siempre debe ser quirúrgico, antes que médico, ya que la eliminación y necrosis de la larva dentro de cavidad intraocular producen una respuesta inflamatoria extremadamente intensa, por lo que siempre debe procederse con una vitrectomía y / o láser para eliminar el parásito.

Posteriormente a la vitrectomía, se realiza un tratamiento en forma convencional con praziquantel o albendazol, siempre acompañado de corticosteroides, a fin de disminuir la respuesta inflamatoria intraocular.

Se evalúa el caso clínico de una paciente de 54 años de edad con diagnóstico de neurocisticercosis y cisticercosis ocular. Su motivo de consulta fue la disminución de agudeza visual del ojo derecho, de aproximadamente tres meses de evolución, que progresó hasta un escotoma central grande.

En el fondo del ojo se observaba la larva asomándose a cavidad vítrea a través de la mácula y se apreciaban también los movimientos de la larva con la estimulación de la luz y en la punta de la larva, el escólex. Acompañaban al cuadro ocular crisis convulsiva

## OBJETIVOS

1. Observar la morfología de los parásitos proporcionados
2. Describir las características de los parásitos proporcionados
3. Conocer los tipos de parásitos que afectan al ojo y sus anexos
4. Describir los ciclos biológicos de los parásitos estudiados

## MATERIAL Y EQUIPO

Cisticerco de *Taenia solium*

Adultos de *Taenia solium* en formalina

Huevo de *Taenia sp*

*E scolex de Taenia solium y Taenia saginata.*

*Filarias sp*

frasco con hígado con cisticercos

fraco con corazón de perro con *Dirofilarias inmmitis.*

Nódulos de *Onchocerca volvulus*

Adultos de *Toxocara sp*

Vector de la oncocercosis *Simulium sp*

*Phthirus pubis* adulto

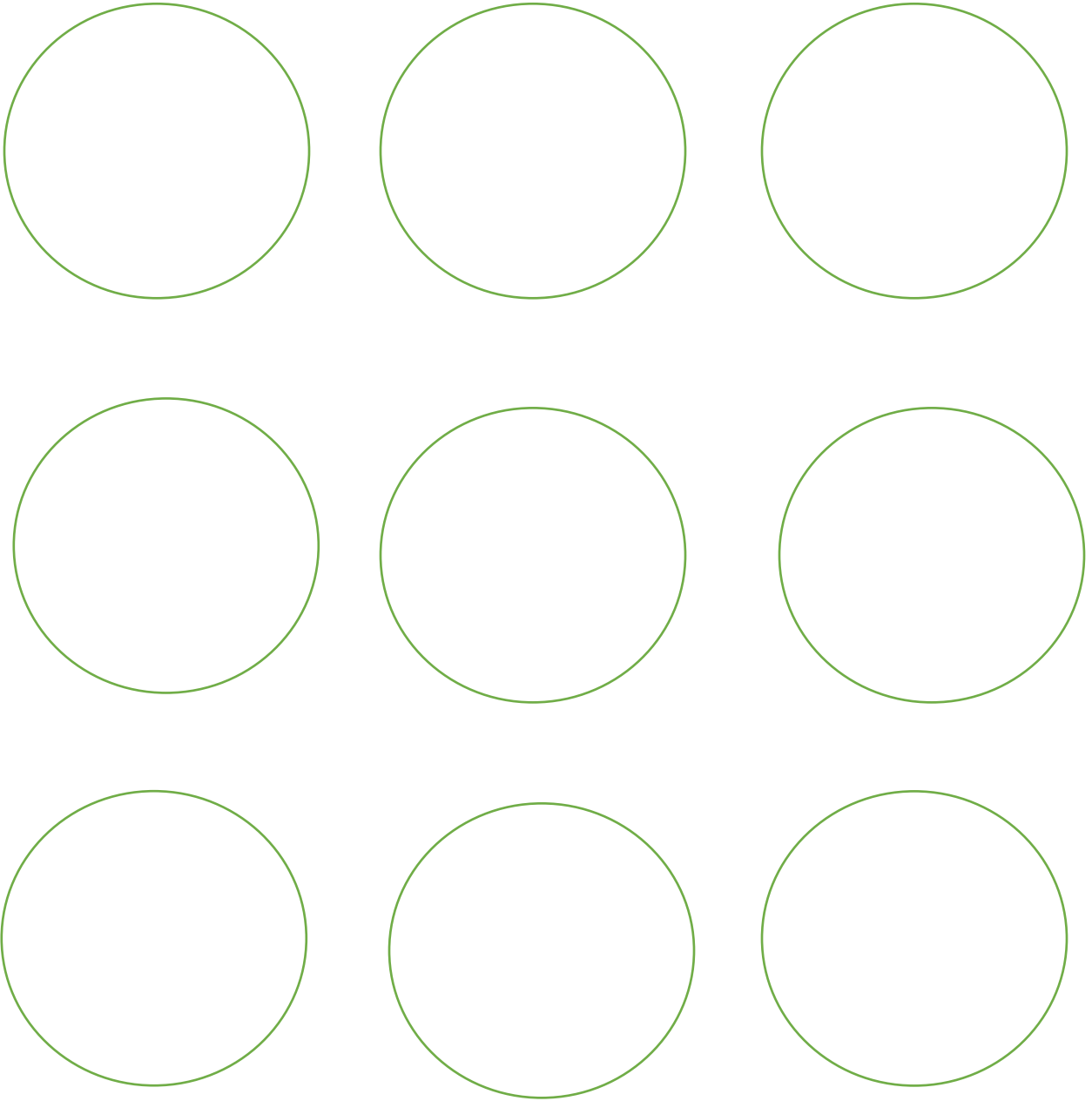
Làminas portaobjetos 3x1 ½ plg.

Laminillas

Microscopios

## PROCEDIMIENTO. DEMOSTRATIVO

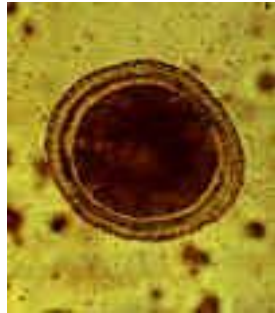
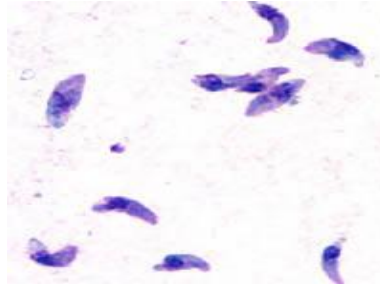
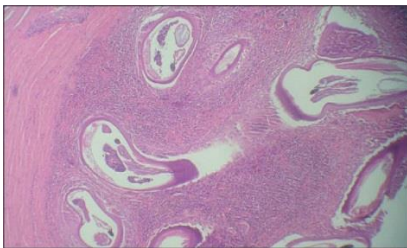
El docente hará el enfoque de las preparaciones al microscopio y los estudiantes identificarán las estructuras comparando con láminas a color de los textos o atlas de parasitología, luego se discutirán los resultados.

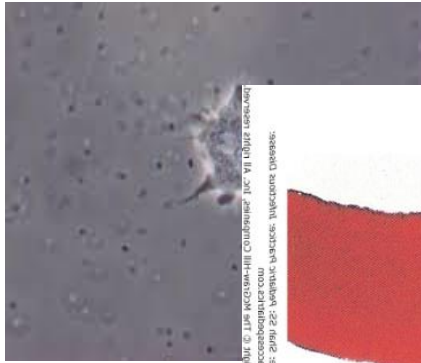


## **BIBLIOGRAFIA**

Botero, David, PARASITOSIS HUMANAS, 4°. Edición, Editorial Corporación para investigaciones biológicas, , Medellín , Colombia, 2005.

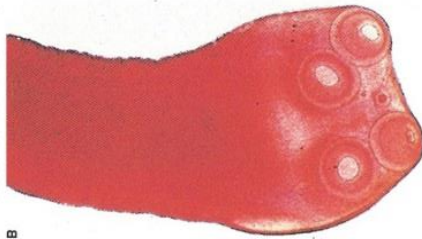
Oncocercosis en ojo

taquizoítos de *Toxoplasma gondii**Huevo Taenia sp**Huevo Toxocara sp**Macrophilaria**Nodulo oncocercosis*



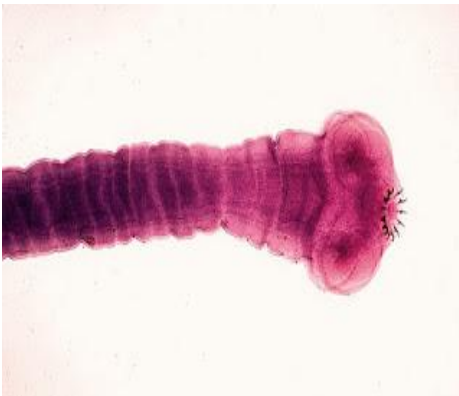
Trofozoíto de

*Taenia saginata*  
Escólex



*Acanthamoeba* spp.

*Taenia solium*  
Escólex



adulto



Huevo de *Taenia* sp

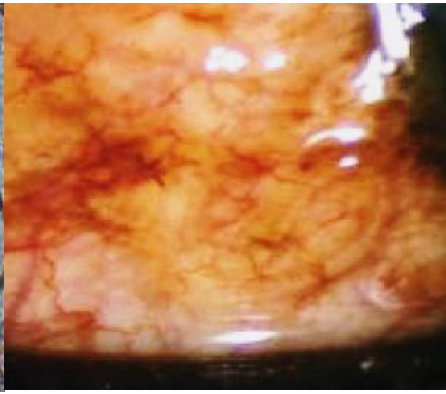
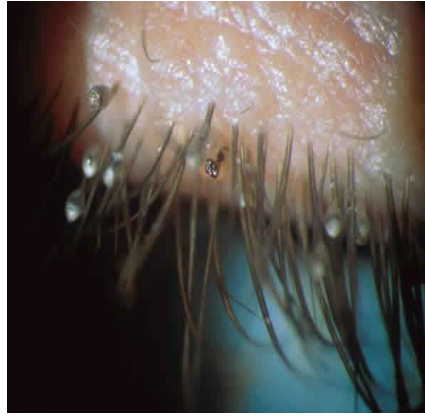


cisticerco



*Phthirus pubis*

*Phthirus pubis* en pestañas



*Filarias sp*

*microfilarias ocular*

#### REFERENCIAS

Botero, David , Parasitosis humanas, 4ª.edición , Corporación para investigaciones biológicas, Colombia, 2005

#### ANEXO.

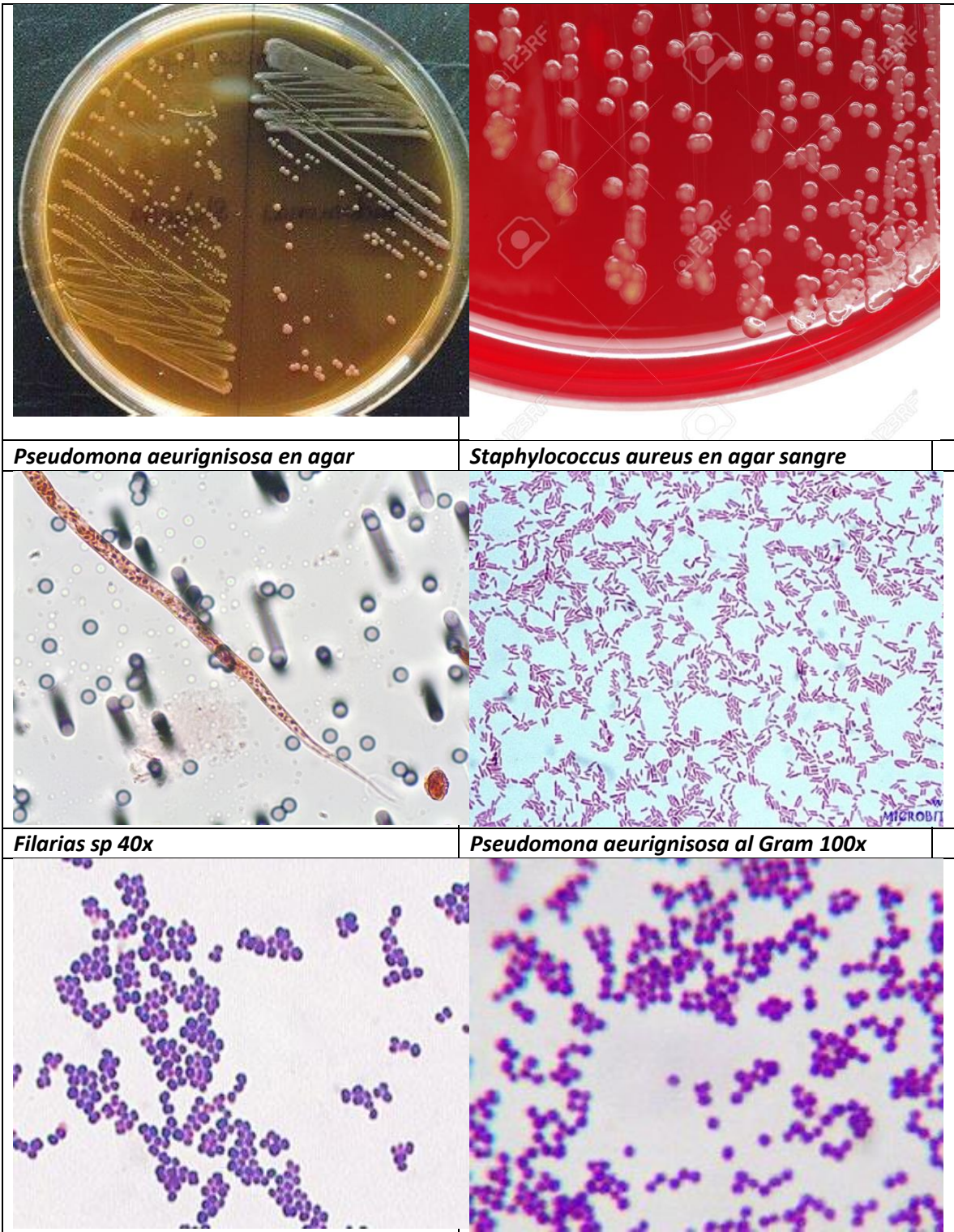
#### ATLAS MICROBIOLOGIA OCULAR





#### 22 GUIAS TUTORIALES

#### 10 ARTICULOS CIENTIFICOS SOBRE MICROBIOLOGIA OCULAR

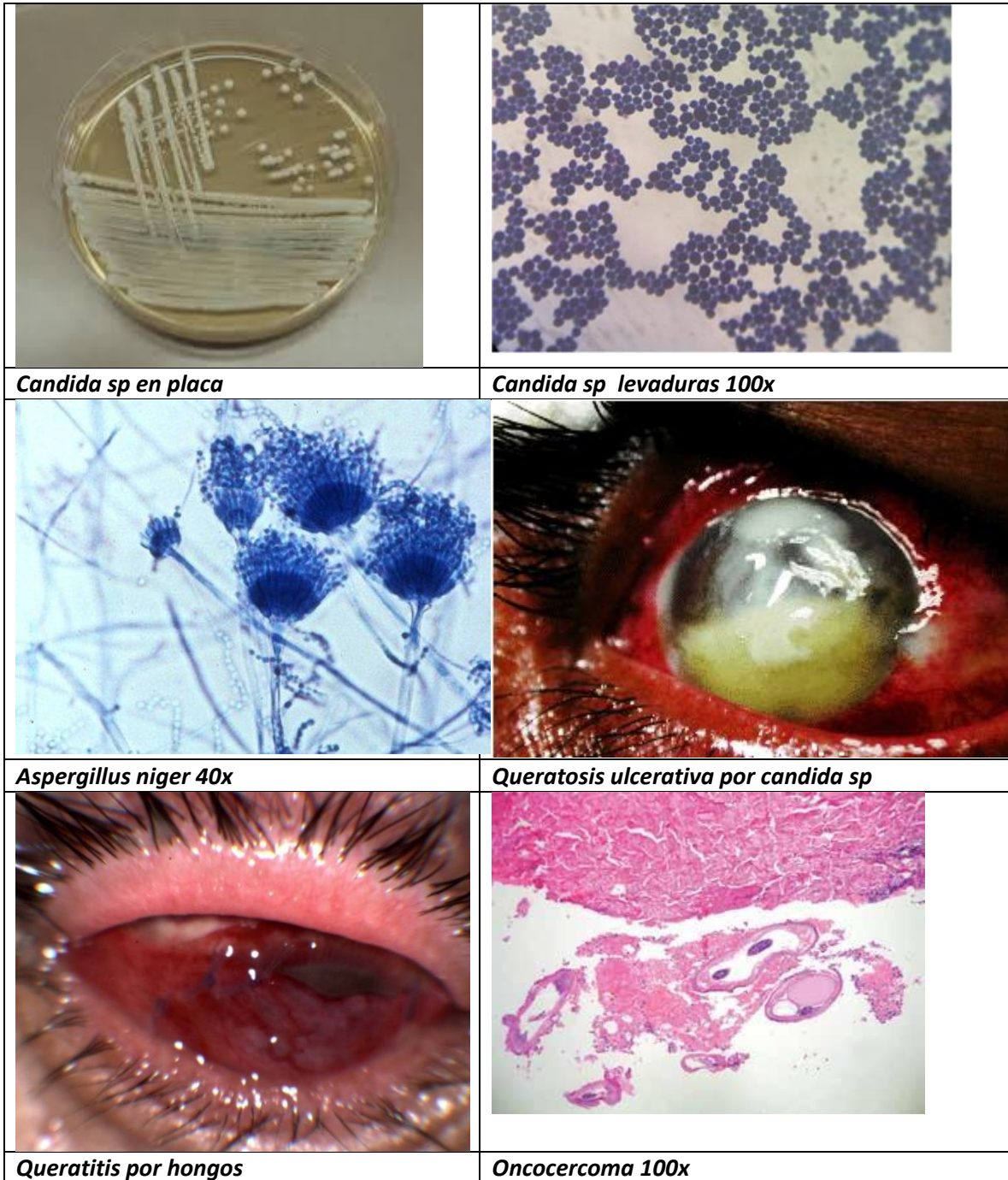
#### CRONOGRAMA ACTIVIDADES

## ATLAS MICROBIOLOGIA OCULAR.



<b><i>Staphylococcus aureus al Gram 100 x</i></b>	<b><i>Staphylococcus epidermidis al Gram 100x</i></b>
	
<b><i>Virus del Herpes a nivel ocular</i></b>	<b><i>Virus de la Hepatitis a nivel ocular</i></b>
	
<b><i>Virus del papiloma en parpados</i></b>	<b><i>Virus del ebola a nivel ocular</i></b>

**ATLAS**



**EVALUACION MICROBIOLOGIA OCULAR. CICLO I 2019**Estudiante \_\_\_\_\_  
Apellidos \_\_\_\_\_ Nombres \_\_\_\_\_

TEL. para contactarlo: \_\_\_\_\_

Instructor: \_\_\_\_\_ Grupo \_\_\_\_\_

FOTO

No lista: \_\_\_\_\_

**EXÁMENES PARCIALES**

Parcial	1	2	3	Promedio	40 %
Notas					

**NOTAS DE EXAMENES CORTOS DE LABORATORIO**

Lab.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	30%
Nota												

**CLASES TUTORIADAS**

1/2	TRABAJO ESCRITO 2.5 %	EXPOSICION 2.5 %	Promedio	5%
Nota				

**NOTAS DE SEMINARIO Y ARTICULOS**

REPORT ESCRITO		EXPOSICIÓN ORAL		DEFENSA		EXAMEN ESCRITO		TOTAL	20%
	10 %		5 %		2.5 %		2.5 %		

NOTA FORMATIVA	5 %	NOTA FINAL	100 %

Nota de Suficiencia	Nota final anterior	Nota Final Definitiva

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

## DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA/LICENCIATURA EN OPTOMETRIA.

## SOLICITUD DE REVISIÓN DE EXAMEN PARCIAL Y DIFERIDO

San Salvador, \_\_\_ de \_\_\_ de \_\_\_\_\_

Coordinador: \_\_\_\_\_

Microbiología Ocular. Grupo de laboratorio \_\_\_\_\_

Yo, \_\_\_\_\_ con carné No. \_\_\_\_\_, del grupo de laboratorio \_\_\_\_\_ SOLICITO A UD ATENTAMENTE LA REVISION ( ) O DIFERIDO ( ) DE \_\_\_\_\_ que fue realizado el día \_\_\_\_\_, por no estar de acuerdo con la nota asignada de \_\_\_\_\_.

ATENTAMENTE.

Nombre alumno(a): \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

*Espacio reservado para la coordinación:*

Resolución: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del coordinador: \_\_\_\_\_

**NOTA: ESTA SOLICITUD DEBE SER PRESENTADA EN ORIGINAL Y DUPLICADO A LOS 3 DIAS HABILES DESPUES DE PUBLICADAS LAS NOTAS. SEGÚN ARTIC 20 DEL REGLAMENTO ACADEMICO.**