



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MANUAL DE PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE
BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA**

Responsable de la elaboración: MC. Beatriz Valenzuela Sánchez, Dr. Javier Octavio de la Cruz Benítez, MVZ. Fabiola Teresa Olivas Sepúlveda y MC. Higinio Cepeda Quintero

**Elaboración: Agosto 2015
Actualización: agosto 2018; noviembre 2021**

DIRECTORIO

DR. JESÚS MADUEÑA MOLINA
RECTOR

DR. GERARDO ALAPIZCO CASTRO
SECRETARIO GENERAL

MC. JAIME ELEAZAR BORBOLLA IBARRA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DR. CARLOS BELL CASTRO TAMAYO
SUBSECRETARIO ACADÉMICO

EPAB. ISABEL QUINTERO OSUNA
SUBSECRETARIO ADMINISTRATIVO

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO
COORDINADORA DE LABORATORIOS

MC. HIGINIO CEPEDA QUINTERO
RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

ÍNDICE

1. Prologo.....	4
2. Objetivo, Visión y Misión.....	5
3. Reglamento interno del laboratorio de Bacteriología y Micología.....	6
4. Saberes prácticos adquiridos por el alumno.....	7
5. Practicas.....	8
Código BAC Y MIC-01 Bioseguridad, materiales y equipo en el laboratorio de Bacteriología y Micología.....	8
Código BAC Y MIC-02 Pruebas de esterilización y desinfección.....	14
Código BAC Y MIC-03 Elaboración de frotis fijos y tinción de Gram.....	20
Código BAC Y MIC-04 Algunas pruebas bioquímicas	27
Código BAC Y MIC-05 Elaboración de un antibiograma y su interpretación....	35
Código BAC Y MIC-06 Cultivo, observación macroscópica y microscópica de algunos hongos.....	41
Código BAC Y MIC-07 Observación de microorganismos vivos.....	44
Código BAC Y MIC-08 Tinción negativa para cápsula.....	48
Código BAC Y MIC-09 Microbiología ruminal.....	52
Código BAC Y MIC-10 Tinción para bacterias ácido – alcohol resistentes (Ziehl – Neelsen).....	57
Código BAC Y MIC-11 Diagnóstico y microbiología de mastitis en el laboratorio.....	61
6. Fuentes de información.....	67
7. Anexos.....	68
Actividades previas a las prácticas.....	69
Preparación de medios de cultivo.....	70
Preparación de soluciones y reactivos.....	73
Cuadros.....	76
Equipo (microscopio).....	77

1.- PRÓLOGO

Este manual me trae el viejo recuerdo de aquellos que nos antecedieron en el área de la investigación de ese mundo invisible del cual sin conocerlo se decían tantas cosas, y no fue hasta que un personaje de nombre Anton Van Leeuwenhoek, aquel tallador de cristales que desarrolla el primer microscopio y descubre a través de esos lentes de aumentos un mundo perdido, invisible al ojo humano, y se da cuenta que es tan real como el mundo macroscópico. Le siguieron muchos más personajes que los describe elegantemente el Dr. Paul De Kruif como los cazadores de microbios, nos habla de un Lázaro Spallanzani que a través de sus experimentos echa por tierra la teoría de la generación espontánea, un Roberto Koch que sienta las bases con sus postulados de que toda forma de vida precede de una misma forma, Louis Pasteur al aguerrido investigador que sienta las bases de las vacunas, asimismo descubre los causantes de la enfermedad de los vinos, Theobald Smith descubre el causante de la fiebre de Texas, y así puedo mencionar muchos otros más anteriores y contemporáneos como los médicos Robin Warren y Barry Marshall descubridores del *Helicobacter pilory*, el SIDA descubierto por Luc Montagnier y Robert Charles Gallo, sin embargo quiero aclarar que hasta hoy, solo menos del 1 % de los microorganismos conocidos pueden causar aquello que conocemos como “enfermedad” y eso basta para dedicarles tiempo al estudio y desarrollar investigaciones y obras completas para su identificación y control.

He aquí pues, este manual de prácticas desarrollado por la academia de Bacteriología y Micología de esta facultad de Medicina Veterinaria en el ánimo de proporcionar las herramientas básicas para despertar el interés del estudiante en el desarrollo de la investigación de ese maravilloso mundo microscópico que sin él la vida en el planeta no existiera como la conocemos en la actualidad y por lo tanto, felicito a este nutrido grupo de médicos, químicos y biólogos entusiastas del estudio de los microorganismos por la elaboración de este manual, que lo veo como el preludio de grandes acontecimientos.

Dr. Javier Octavio de la Cruz Benítez

Culiacán, Sin; Agosto de 2015.

2.- OBJETIVO

Contribuir con la práctica exitosa de las funciones de la FMVZ, además de operar bajo un enfoque de mejora continua en los procesos de servicio académico, de investigación y extensión que ofrece a la comunidad universitaria para su formación.

MISIÓN

La Unidad de Laboratorios de la FMVZ es la entidad que apoya, coordina e impulsa las actividades de docencia, investigación y extensión, con el fin de formar profesionistas que contribuyan a elevar el nivel y la calidad de vida de la sociedad y el desarrollo sustentable de la región, del Estado de Sinaloa y nuestro País.

VISIÓN

Ser una Unidad de Laboratorios con alto nivel académico donde sus profesores oferten la mejor calidad, así como la generación de conocimiento a través de la investigación y la contribución del servicio con el vínculo de la extensión, en la demanda que requiere la sociedad actual.



3.- REGLAMENTO INTERNO DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA Y MICOLOGÍA

1. Queda prohibida la entrada al laboratorio a personas ajenas a las prácticas (sobre todo niños y animales).
2. No se permite la entrada al laboratorio a todo alumno que llegue 5 minutos después de la hora señalada.
3. No se permitirá la permanencia en el laboratorio a todo aquel alumno que no tenga puesta su bata debidamente abotonada; misma que deberá quitarse antes de abandonar el laboratorio.
4. Queda estrictamente prohibido comer, fumar, beber y en general llevarse cosas a la boca dentro del laboratorio.
5. Todos los objetos personales deberán ser guardados debajo de las mesas de trabajo y/o mochilero.
6. No deben entablar conversaciones; así como comunicarse a voces con los demás compañeros.
7. Cada equipo deberá traer el material que se les solicite previamente (masking-tape, cerillos, marcadores, reglas, etc.).
8. El material que se rompa o extravié deberá ser repuesto con material nuevo, amparado con la nota de compra.
9. La mesa de trabajo debe limpiarse con un desinfectante al inicio y termino de la práctica.
10. Todo material **NO CONTAMINADO** como algodón, papel, cerillos, deberá depositarse en los recipientes destinados para este fin.
11. El material contaminado deberá depositarse en el lugar que indique el instructor (material biológico de desecho).
12. En caso de cortaduras y/o salpicaduras por material contaminado se **AVISARÁ DE INMEDIATO AL ASESOR**; lo mismo si se contamina el lugar de trabajo al romperse el contenido de cultivo bacteriano o fúngico para tomar las medidas pertinentes.
13. No deberás sacar del laboratorio ningún equipo, medios o cultivos microbianos.
14. Antes de salir del laboratorio se deberán lavar las manos perfectamente con agua y jabón.

4.- SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO

- Conoce el equipo básico utilizado para el diagnóstico de bacterias y hongos en el laboratorio.
- Emplea métodos de bioseguridad personal en el laboratorio, utilizados rutinariamente en campo.
- Prepara frotis y tinciones, utilizadas para diferentes estructuras bacterianas y fúngicas.
- Observa en el microscopio estereoscópico y óptico, bacterias/hongos teñidas.
- Utiliza medios de cultivos (bacterianos y fúngicos), utilizados para el diagnóstico en el laboratorio.
- Realiza pruebas de resistencia a antibióticos de bacterias y hongos.
- Interpreta resultados de pruebas de diagnóstico y resistencia de bacterias y hongos.
- Identifica bacterias de tipo gastrointestinal, respiratorio y/o reproductivo, recurrentes en animales domésticos.
- Identifica hongos de tipo cutáneo, subcutáneo y/o sistémica, frecuentes en animales domésticos.

5.- PRÁCTICAS



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 01. BIOSEGURIDAD, MATERIALES Y EQUIPO EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

1.0 INTRODUCCIÓN.

El personal que trabaja en un laboratorio de Bacteriología y Micología está sujeto a diversos riesgos ocupacionales. Los profesionales y estudiantes que manejan agentes infecciosos pueden infectarse y enfermar de manera más o menos grave, pudiendo quedar afectados a largo plazo.

La mayoría de las infecciones adquiridas en un laboratorio de Bacteriología y Micología pueden ser atribuidas a errores al realizar procedimientos rutinarios como por ejemplo: Procedimientos o técnicas que involucran el riesgo de inhalación de bacterias y partículas fúngicas debido a la formación de aerosoles al momento de la centrifugación, la homogenización y la manipulación de placas. Éstos deben realizarse con cubrebocas y dentro de una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

Procedimiento que involucre el riesgo de ingestión: Nunca deberá pipetarse con la boca, sino usando una perilla o pipeta automática.

Procedimientos en los que se corre el riesgo de inoculación. Los pinchazos con material contaminado pueden evitarse teniendo un gran cuidado al aplicar una sustancia o extraer una muestra. El material punzocortante debe desecharse en contenedores rígidos especiales para residuos biológico – infecciosos. Los microorganismos presentes en sangre y líquidos corporales como los virus de la hepatitis y de la inmunodeficiencia humana, constituyen un grave peligro si se tiene contacto directo con dichos líquidos. Es importante mencionar que la sangre en hemocultivo, las muestras de suero en pruebas para anticuerpos, antígenos o agentes antimicrobianos conservan su infectividad y riesgo potencial.

Hay que tener siempre presente que los errores humanos y las prácticas inadecuadas comprometen la seguridad en el laboratorio, por lo que es prioritario que se establezcan y adopten normas apropiadas básicas para el trabajo y entre el personal de laboratorio, se designen responsables de la supervisión de las diferentes secciones, además de establecer las medidas de emergencia para actuar en caso de accidentes.

El uso de bata y calzado cerrado no brinda protección suficiente, se requiere indumentaria adicional para proteger rostro, manos y piernas si hay riesgo de salpicaduras.

Medidas generales de precaución.

- Usar siempre bata.
- Colocar el material contaminado en un contenedor dispuesto para este propósito.
- Usar guantes para meter a esterilizar el material contaminado.
- Colocar por separado pipetas, portaobjetos y cubreobjetos contaminados.
- Desinfectar con fenol, benzal o cloro las mesas, los materiales o equipos que hayan estado en contacto con el material contaminado.
- Nunca comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el área del laboratorio.
- Evitar accidentes avisando inmediatamente cuando algo se descomponga, se rompa o contamine.
- Seguir estrictamente las reglas establecidas de control de calidad en el trabajo que se realiza.
- Verificar diariamente la temperatura de estufas y autoclaves; así como el estado en general de los aparatos eléctricos que se utilizan en el laboratorio.

Normas básicas para prevenir infecciones en el laboratorio.

- No pipetear con la boca.
- No comer, beber, fumar, almacenar alimentos, aplicarse cosméticos, etc., en el área de trabajo del laboratorio.
- Mantener el laboratorio limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- La superficie de trabajo individual debe descontaminarse con un papel absorbente, esponja o gasa humedecida con un desinfectante (fenol, benzal o cloro) al iniciar y finalizar cada sesión de trabajo.
- Lavarse las manos después de manipular agentes infecciosos, material contaminado, animales y cuando abandone el laboratorio.
- Efectuar cuidadosamente todo los procedimientos para reducir al mínimo la formación de aerosoles, de preferencia dentro de una campana de flujo laminar.
- Todo residuo contaminado líquido o sólido deberá someterse a esterilización o incineración antes de ser desechado.
- Utilizar guantes en aquellos procedimientos que implique contacto directo con material infeccioso.
- Debe haber una guía disponible para acciones de emergencia.

2.0 PROPÓSITOS.

Que los alumnos conozcan el área que ocupa el laboratorio de Bacteriología y Micología, su equipo, materiales y reactivos.

Concientizar a los alumnos de los riesgos de trabajo en un laboratorio de Bacteriología y Micología.

Establecer las medidas generales de precaución y normas básicas para la prevención de infecciones en el laboratorio.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Equipo, material y reactivos con los que cuenta el Laboratorio de Bacteriología y Micología.
- Medidas generales de precaución.
- Normas básicas para prevenir infecciones en el Laboratorio de Bacteriología y Micología.

4.0 PROCEDIMIENTO.

Que el laboratorista muestre los equipos, materiales y reactivos con los que cuenta el laboratorio y revise con los alumnos las medidas generales de precaución y las normas básicas para prevenir accidentes e infecciones en el laboratorio.

5.0 RESULTADOS.

6.0 CONCLUSIONES.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

Conoce el equipo básico utilizado en el laboratorio para el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias y hongos.

Emplea métodos de bioseguridad personal en el laboratorio, utilizados rutinariamente en campo.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA. No aplica.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

Es prioritario cumplir al 100% con las normas y reglas indicadas en el laboratorio de Bacteriología y Micología para no influir de manera negativa en el medio ambiente.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología Veterinaria. México. 1996.

Kaiser, G.E. Microbiology Laboratory Manual The Community Collage of Baltimore Country, Catonsville Campus, 200.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Pelczar, M. J., E.C.S. Chan. Elementos de microbiología, México, ed. Mc Graw – Hill, 1991.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 01: BIOSEGURIDAD, MATERIALES Y EQUIPO EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ **Grupo:** _____ **Grado:** _____ **Equipo:** _____

5.0 Resultados:

Menciona el equipo con el que cuenta el laboratorio:

Escribe al menos tres riesgos de trabajo en este laboratorio

¿Por qué es importante seguir las medidas de precaución en este laboratorio?

De las nueve normas escribe dos de ellas que queden absolutamente bajo tu responsabilidad y son primordiales para evitar infectarte en este laboratorio

6.0 Conclusiones y comentarios

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 02. PRUEBAS DE ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN.

1.0 INTRODUCCIÓN.

Debido a la aplicación de los métodos de esterilización y desinfección ha sido posible que los medios de cultivo y materiales utilizados en la práctica microbiológica estén totalmente libres de gérmenes; además que toda intervención quirúrgica se realice en un ambiente y con instrumentos completamente estériles.

Es imposible trabajar en forma aislada de ningún microorganismo si no se dispone de materiales y medios de cultivos estériles; lo mismo que no se pueden realizar estudios sobre su naturaleza, estructura antigénica, fisiología y acción patógena si los medios están contaminados. Tampoco es posible tener éxito en los procesos quirúrgicos si no se aplican métodos de asepsia apropiados.

Todo esto nos permite reconocer la importancia que tiene el control de la vida microbiana en la salud, alimentación y sanidad.

En esta práctica conocerá los métodos de esterilización por medio de autoclave y estufa, y conocerás algunos desinfectantes, así como la esterilización de objetos (asas bacteriológicas) a la flama directa.

Los métodos de esterilización son: esterilización por calor (horno directo, tindalización, autoclave, ebullición) filtración y radiaciones. La ebullición no se considera un método estricto de esterilización porque mediante este método no son destruidas las formas esporuladas.

Agentes desinfectantes útiles en el laboratorio.

Agentes químicos.

Hipoclorito de sodio. Es el agente químico más comúnmente empleado. Se prepara a partir de soluciones que se expenden en el comercio como blanqueadores de ropa; se diluye a una concentración final de 10% o bien, se prepara a partir de solución concentrada. Para desinfectar material de laboratorio se agrega hipoclorito de sodio en un recipiente donde se deposita portaobjetos, cubreobjetos, pipetas Pasteur, pipetas graduadas y se dejan hasta el día siguiente. Posteriormente este material se lava. La solución de hipoclorito debe permanecer limpia, libre de desechos orgánicos. Debe cambiarse diariamente y mantenerse tapada. Para las mesas de trabajo es común el uso del benzaldehído o el método de aplicar alcohol con un algodón y flamear.

Agentes físicos.

Calor seco. Para esterilizar material de vidrio se utiliza calor seco a 180° C, durante un mínimo de 30 minutos. El horno es el equipo recomendado para esto. El material puede estar envuelto en papel, pero de preferencia, se coloca en recipientes adecuados de acero inoxidable (portapiquetas o portacajas), siempre acompañados de una tira de papel testigo y con una etiqueta con la fecha y tipo de material. Debe vigilarse que los tubos y pipetas graduadas que contengan puntas y tapones de algodón no se quemen por efecto del calor ya que se producen alquitranes y otras sustancias bactericidas, muy difíciles de remover y que puedan alterar los resultados en las siguientes ocasiones en que se utilice dicho material.

Calor húmedo.

Se necesita vapor a presión generado en autoclave u olla Express a alta temperatura. Las condiciones más comúnmente empleadas son 121° C, con 15lbs/pulg² de presión (1 a 3 atmosferas) durante 15 minutos. Este procedimiento es muy útil para la esterilización de los medios de cultivo, agua, material de desecho (cultivos, hisopos, portaobjetos, cubreobjetos, etc.).

2.0 PROPÓSITOS.

El alumno determinará la eficacia de algunos métodos de esterilización por calor húmedo (autoclave) y calor seco (estufa y flama directa).

Definirá los principios básicos del funcionamiento de la esterilización para establecer que procedimiento es necesario seguir en los diferentes materiales empleados en el laboratorio de Bacteriología y Micología.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Mecheros Bunsen
- Asas microbiológicas
- Alcohol, hipoclorito de sodio
- Cloruro de amonio de bencilodimetilico al 2%.
- Pinzas
- Autoclave
- Estufa
- Campana de flujo laminar con lámpara U.V.

4.0 PROCEDIMIENTO.

La práctica se llevará a cabo con los siguientes tiempos o puntos:

1. Verifica que se traiga todo el material de trabajo y la bata.
2. Verifica que se leyó el material antes de iniciar la práctica (preguntas al azar entre los alumnos).
3. Solicita al técnico del laboratorio que muestre el funcionamiento de una autoclave y una estufa, cuidados, y forma adecuada de operación y manejo.
4. Coloca materiales y soluciones factibles de ser esterilizadas con estos dos equipos.
5. Solicita al técnico del laboratorio que muestre el funcionamiento de una campana de flujo laminar, cuidados, y forma adecuada de operación y manejo.
6. Solicita al técnico que te muestre el método de esterilización de asas bacteriológicas a la flama.
7. Solicita al técnico que te muestre el método de esterilización de pinzas a la flama.

5.0 RESULTADOS.

6.0 CONCLUSIONES.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

Será competente cuando puedas describir los diferentes procesos de esterilización de instrumentos, medios, materiales y reactivos utilizados en este laboratorio y en otras asignaturas como cirugía.

Prepara medios de cultivos (bacterianos y fúngicos), utilizados para el diagnóstico en el laboratorio.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

- Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes.

- Las cajas de Petri que contenían los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizadas por medios de autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente podrán ser depositadas en el contenedor de residuos biológicos o basura común.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-052-SEMARNAT-2005 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

Finegol, S. Baron, E. J. 1989. Bailey/ Scout Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana.

Koneman, E.W., D.A. Stephen, V.R. Dowel, W.M. Janda, M.S. Herbert and C.W. Washington. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Trad. Del inglés por N.G. Meerot y B.E. Roel. México 3^{ra} edición, editorial Panamericana, 1998.

Lynch, M.J., S.S. Rápale, L.D. Melloretal. Métodos de Laboratorio, 2^{da} edición, México Interamericana, 1989.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 02. Pruebas de Esterilización y Desinfección

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ **Grupo:** _____ **Grado:** _____ **Equipo:** _____

5.0 Resultados.

1.- ¿Qué es esterilización, desinfección, asepsia, y pasteurización?

2.- ¿Cuál es la diferencia entre una acción germicida y una bactericida, sustancia bacteriostática y bactericida?

3. ¿Qué factores influyen en la eficiencia de un agente físico o químico?

4.- Escribe una lista de materiales que deben ser esterilizados en un horno de aire caliente en lugar de autoclave y porque es el método a elegir.

5.- Qué tipo de materiales deben ser esterilizados por filtración y cuál es la medida del filtro usado.

6.0 Conclusiones.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 03. ELABORACIÓN DE FROTIS FIJOS Y TINCIÓN DE GRAM.

1.0 INTRODUCCIÓN.

La observación de la forma, tamaño y agrupación de las bacterias se hace mediante la preparación de frotis fijos teñidos (existen diversas técnicas de tinción), en esta práctica utilizaremos la tinción de Gram.

Esta técnica fue desarrollada por Christian Gram en 1884 y tiene gran valor taxonómico porque nos permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas y de manera secundaria nos muestra la forma y agrupación bacterianas.

Las paredes celulares, tanto de las bacterias Gram positivas como de las Gram negativas, tienen una capa basal de peptidoglicano responsable de la rigidez característica de la pared. Sin embargo, existen diferencias estructurales en lo que respecta a las capas más externas. En las bacterias Gram positivas, éstas están constituidas principalmente por ácidos teicoicos con diversas sustituciones químicas. En el caso de las Gram negativas, existe una membrana externa cuya constitución química es similar a la de cualquier otra membrana biológica (fosfolípidos y proteínas), pero que posee además un alto contenido de lipopolisacáridos (endotoxina).

Durante el proceso de tinción, tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas toman el colorante primario (cristal violeta). Sin embargo, al aplicar el agente decolorante (alcohol-acetona) la pared de las bacterias Gram positivas sufre una deshidratación que impide la salida del colorante. En el caso de las bacterias Gram negativas, el agente decolorante destruye la integridad de la membrana externa, incrementando así su permeabilidad, lo cual permite la salida del colorante primario.

Al aplicar el colorante de contraste, éste no puede penetrar fácilmente en las bacterias Gram positivas debido a la deshidratación de su pared; además de que estas bacterias quedaron previamente teñidas con el colorante primario. Por el contrario, las bacterias Gram negativas se tiñen fácilmente con el colorante de contraste. El resultado final es que las bacterias Gram positivas se tiñen de violeta y las Gram negativas de rojo.

La tinción de Gram es aplicada en forma universal como primer paso en la identificación de las bacterias. Desafortunadamente existen algunos grupos bacterianos en los cuales la tinción de Gram no es de utilidad taxonómica, por ejemplo: las espiroquetas, los micoplasmas, las micobacterias, las clamidias y las riquettsias.

Existen algunos factores que pueden alterar los resultados de la tinción de Gram:

Las bacterias en los cultivos viejos (más de 24 horas de incubación) liberan enzimas por autólisis. Éstas atacan la pared celular de las bacterias y modifican sus propiedades estructurales, propiciando que las bacterias Gram positivas se tiñan de rojo; lo mismo sucede al observar frotis directos de los tejidos de animales infectados.

Una decoloración excesiva puede ocasionar que las bacterias Gram positivas se tiñan de rojo. Una decoloración deficiente puede ocasionar que las bacterias Gram negativas se tiñan de violeta.

Los frotis gruesos pueden teñirse irregularmente.

2.0 PROPÓSITOS.

- 2.1 El alumno realizará frotis fijo y los teñirá con la técnica de Gram, para su observación.
- 2.2 Diferenciará las bacterias Gram positivas de las Gram negativas.
- 2.3 Distinguirá la morfología y agrupación bacterianas.
- 2.4 Verificará los resultados de la tinción de Gram mediante la prueba de KOH al 10%.
- 2.5 Observación de microorganismos vivos a partir de una preparación húmeda

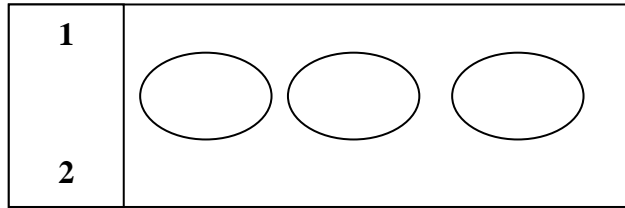
3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Microscopio (**Anexo 3.1**)
- Mechero Bunsen
- Juego de reactivos para la tinción de Gram (**Anexo4.1**)
- Portaobjetos (laminilla) 26 x 76 mm
- Papel limpiantes
- Marcador Indeleble
- Lápiz graso
- Asa microbiológica
- Agua destilada o solución salina 0.9%
- Cultivos de: *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli*, *Bacillus* spp
- Hidróxido de potasio al 3 % (**Anexo 4.2**)

4.0 PROCEDIMIENTO

- a) Preparación de un frotis.

Utilizando un lápiz graso, dibuja tres círculos sobre el portaobjeto. En cada uno de ellos harás un frotis diferente, por lo que estos deberán quedar muy bien identificados, como lo muestra la siguiente figura.



1. Cocos Gram positivos
2. Bacilos Gram negativos
3. Bacilos Gram positivos

Si la muestra es líquida o semilíquida, como por ejemplo: pus, orina o líquido cefalorraquídeo, se extiende sobre el portaobjeto, tratando de que te quede el frotis delgado. Si por el contrario, la muestra es tomada de un medio de cultivo sólido o semisólido, primero colocarás una asada de agua destilada y después con el asa estéril y fría tomarás de la colonia problema e inmediatamente la extenderás sobre la laminilla.

Se deja secar completamente y fija el frotis de la siguiente manera: con la ayuda de unas pinzas acerca el portaobjeto a la flama del mechero y por el lado opuesto del frotis, pásalo rápidamente. De esta manera ya está listo para teñirse.

b) Tinción de Gram.

Preparación:

Una vez hechos los frotis, fíjalos a la flama de un mechero Bunsen. Tiñe la extensión con la solución de cristal violeta durante 2 minutos. Retira el exceso de colorante y aplica durante 1 minuto la solución de lugol (ésta fija el colorante a la bacteria). Lava con agua destilada y decolora con alcohol - acetona. Lava con agua destilada hasta que el alcohol no elimine más colorante y aplica el colorante de contraste (safranina) durante 30 segundos. Lava con agua, seca y observa al microscopio.

Las células a observar han de ser de un cultivo joven ya que la reacción de Gram puede variar según envejece un cultivo. Las bacterias Gram-positivas aparecen de color violeta, mientras que las Gram -negativas se tiñen de rosa.

c) Prueba del hidróxido de potasio (KOH) al 3 %.

La prueba de KOH al 3% nos permite verificar los resultados de la tinción de Gram. Esta prueba consiste en colocar sobre una laminilla una gota de KOH al 3% y con el asa hacer en ella una suspensión de colonias de la bacteria problema (bacteria que se pretende identificar), mezclando con movimientos giratorios de 1 a 3 minutos. Si al separar el asa de la mezcla se forma una hebra viscosa, esto indica que se trata de bacterias Gram negativas: si la hebra no se forma, se trata entonces de bacterias Gram positivas.

5.0 RESULTADOS.

Completa el cuadro con la morfología microscópica de cada observación y su reacción al Gram.

Bacteria	Forma	Agrupamiento	Reacción al Gram
<i>Staphylococcus</i> spp			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Streptococcus</i> spp			

6.0 CONCLUSIONES

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

Prepara frotis y coloraciones, utilizadas para diferentes estructuras bacterianas y fúngicas. Observa en el microscopio óptico, bacterias/hongos teñidas.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

- Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes
- Las cajas de Petri que contenían los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizadas por medio de autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente podrán ser depositadas en el contenedor de residuos biológicos o de basura común.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-o52-SEMARNAT-2005 y NOM-o87-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

José López-Álvarez y José A. Barajas Rojas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Bacteriología. UNAM.

Koneman, E.W., D.A. Stephen, V.R. Dowel, W.M. Janda, M.S. Herbert and C.W. Washington. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Trad. Del inglés por N.G. Meerot y B.E. Roel. México 3^{ra} edición, editorial Panamericana, 1998.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o87-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o52-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 03. Elaboración de Frotis fijos y Tinción de Gram.

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ Grado: _____ Grupo: _____ Equipo: _____

5.0 Resultados

Bacteria	Forma	Agrupamiento	Reacción al Gram
<i>Staphylococcus spp</i>			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Streptococcus spp</i>			

6.0 Conclusiones y comentarios

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 04. ALGUNAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

1.0 INTRODUCCIÓN.

El proceso de identificación bacteriana está basado principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas. Estas enzimas determinan la velocidad del metabolismo de las bacterias por distintas vías que pueden detectarse con medios especiales de cultivo en el laboratorio. Los sustratos de esas enzimas se incorporan al medio de cultivo junto con un indicador capaz de detectar la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos.

La fermentación es un proceso metabólico de óxido-reducción en donde un sustrato orgánico sirve como aceptor de electrones, en lugar del oxígeno molecular. En la fermentación el ácido pirúvico resultante de la glucólisis finalmente deriva en una variedad de ácidos orgánicos como ácido acético, propiónico, succínico, fórmico y otros. Como consecuencia podemos diferenciar bacterias basándonos en sus reacciones de fermentación, es decir, los hidratos de carbono que son capaces de utilizar y los tipos y cantidades de ácidos mixtos que producen. Algunas pruebas bioquímicas muy comunes en el laboratorio de bacteriología son el citrato de Simmons, gelatina nutritiva, agar de triple azúcar y hierro (TSI), agar de hierro y lisina (LIA), prueba de la oxidasa, prueba de la catalasa, medio de SIM (sulfuro, indol, motilidad), coagulasa, etc.

2.0 PROPÓSITOS.

2.1. Realizar pruebas bioquímicas sencillas para detectar el tipo de metabolismo bacteriano.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Cultivo de *Escherichia coli*
- Cultivo de *Salmonella* spp
- Cultivo de *Staphylococcus* spp
- Cultivo de *Streptococcus* spp
- Dos tubos de agar citrato de Simmons
 - Dos tubos de agar hierro y lisina (LIA)
 - Dos tubos de agar de hierro y triple azúcar (TSI)
 - Un tubo conteniendo 4 ml de gelatina nutritiva
 - Dos tubos con 4 ml del medio SIM
 - Reactivo de Erlich
 - Reactivo de oxidasa
- Asa recta

- Hisopos estériles

4.0 PROCEDIMIENTOS.

1ra. Sesión:

Tanto *E. coli* como *Salmonella* spp las sembrarás en los siguientes medios: TSI, LIA, SIM, gelatina nutritiva y citrato de Simmons.

I. Con ayuda del asa recta pica una colonia aislada y siembra de la siguiente manera:

- a) En el tubo conteniendo TSI, punciona hasta el fondo y después haces una estría sobre la superficie del medio inclinado.
- b) En el LIA se hace una punción casi hasta la base del tubo y al retirar el asa estría la superficie inclinada.
- c) En el SIM se inocula el centro por picadura hasta las 2/3 partes del agar aproximadamente.
- d) En el citrato de Simmons se siembra por estría únicamente en la superficie.
- e) En la gelatina nutritiva se hace una punción casi hasta la base del tubo y se homogeniza el inóculo en el medio.

Nota: La boca de los tubos a sembrar se flamean antes y después de la inoculación. Solamente se toma una asada del cultivo para inocular todos los tubos. Siempre se trabaja lo más cerca posible de la flama. Las tapas de los tubos deben quedar ligeramente flojas.

2. Repite el procedimiento para *Salmonella* spp en todos los medios.

3. Incuba todos los tubos a 37° C durante 24 horas.

4. Prueba de la oxidasa: De cada cultivo bacteriano (*E. coli* y *Salmonella* spp) tomar suficiente cantidad con el hisopo estéril y frotarla sobre un disco para oxidasa. Esperar 10 segundos y observar si aparece una coloración oscura.

5. Prueba de la catalasa: En un portaobjetos coloca una gota de peróxido de hidrogeno (agua oxigenada), luego con el asa toma una colonia del cultivo de *Staphylococcus* y emulsionala en la gota de agua oxigenada.

2da. Sesión. Interpretación de las pruebas:

Prueba de la oxidasa: Del cultivo bacteriano (*E. coli* o *Salmonella* spp) tomar suficiente cantidad con el hisopo estéril y frotarla sobre un papel filtro impregnado con reactivo para oxidasa. Esperar 10 segundos y observar si aparece una coloración oscura (violeta).

Prueba de la catalasa: La prueba es positiva si el peróxido de hidrógeno se descompone por acción de la enzima catalasa presente en los estafilococos, la reacción es muy evidente pues se observan burbujas debido a la liberación de oxígeno.

Citrato de Simmons: El color original del medio es verde y si la reacción es positiva después de la incubación el medio cambia al color azul.

Indol: agrega dos gotas del reactivo de Erlich (color ámbar a café) al cultivo, observa si hay cambio de color al rojo. Si cambia el color, la reacción es positiva, si no es negativa. Registra los resultados de las otras dos reacciones como son producción de ácido sulfhídrico y motilidad. Si se dan estas reacciones se anota en el resultado como positivo (+).

Ácido sulfhídrico: Si hay producción de este ácido, el medio se torna negro, por lo tanto la reacción es positiva, en caso contrario será negativa

Motilidad: Se observa como una turbidez alrededor de la zona de picadura.

Gelatina nutritiva: el tubo se saca de la incubadora y se refrigera de 5 a 30 minutos y a continuación se hace la lectura:

Prueba positiva: El medio muestra una consistencia líquida.

Prueba negativa: El medio vuelve a su consistencia semisólida original.

6. Registra los resultados al término de la incubación y compáralos con los cuadros: 1, 2 y 3 de los anexos.

5.0 RESULTADOS.

Reacciones de las enterobacterias.

Bacteria	Oxidasa	Citrato de Simmons
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Salmonella spp</i>		

El SIM Se reporta por cada reacción: producción de ácido sulfhídrico (manchas grises a negro); producción de indol (anillo rojo) y motilidad (crecimiento fuera de la línea de inoculación) como positivo (+) o negativo.

Medio SIM	Sulfuro	Motilidad	indol
<i>E. coli</i>			
<i>Salmonella spp</i>			

Reacciones de las enterobacterias en TSI.

Bacteria	Superficie (bisel)	Picadura (fondo)	Gas	H ₂ S
<i>E. coli</i>				
<i>Salmonella spp</i>				

Reacciones de las enterobacterias en LIA.

Bacteria	Superficie (bisel)	Picadura (fondo)	Gas	H ₂ S
<i>E. coli</i>				
<i>Salmonella spp</i>				

Se reporta:

K= alcalino (rojo); A = Ácido (amarillo)

Gas = Huecos en el medio de cultivo

H₂S = Oscurecimientos del medio de cultivo

Reacciones de las enterobacterias en Gelatina Nutritiva

Bacteria	Reacción
<i>E. coli</i>	
<i>Salmonella</i> spp	

Reacción en los cocos Gram positivos:

Bacteria	Catalasa	Coagulasa
<i>Staphylococcus</i> spp		
<i>Streptococcus</i> spp		

Cuadro No. 1 REACCIONES DE LA FAMILIA *ENTEROBACTERACEAE* EN TSI

Género y/o especie	Superficie	Picadura	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	A (K)	A	+(-)	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella typha</i>	K	A	-	+
Otras salmonelas	K	A	+	+++
<i>Arizona</i>	K	A	+	+++
<i>Citrobacter freundii</i>	K(A)	A	+	+++
<i>C. diversus</i>	K(A)	A	+	-
<i>Edwardsiella</i>	K	A	+	+++
<i>Klebsiella</i>	A	A	++	-
<i>Enterobacter</i>	A	A	++	-
<i>Hafniaalves</i>	A	A	+	-
<i>Serratia</i>	A(K)	A	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	A(K)	A	+	+++
<i>P. mirabilis</i>	A(K)	A	+	+++
<i>Morganella morganii</i>	K	A	-(+)	-
<i>Providencia</i>	K	A	-o-	-
<i>P. rettgeri</i>	K	A	-	-

Cuadro No. 2 Reacciones de la familia Enterobacteriaceae en medio LIA.

Género y/o especie	Superficie	Picadura	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	K	K o N	- o +	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella</i>	K	K o N	-	+ (-)
<i>S. Typhi</i>	K	K	-	+ (-)
<i>Paratyphi-A</i>	K	A	+ o -	- o +
<i>Arizona</i>	K	K o A	-	+ (-)
<i>Citrobacter freundii</i>	K	A	- o +	+ o -
<i>C. diversus</i>	K	A	- o +	-
<i>Edwardsiella</i>	K	K	- o +	+
<i>Klebsiella</i>	K o N	K o N	+ o -	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	K o N	A	+ o -	-
<i>E. aerogenes</i>	K	K o N	+ (-)	-
<i>Hafniaalves</i>	K	K o N	- o +	-

<i>Serratia</i>	K o N	K o N	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	R	A	-	-(+)
<i>P. mirabilis</i>	R	A	-	-
<i>Morganella morganii</i>	K o R	A	-	-
<i>Providencia</i>	R	A	-	-
<i>P. rettgeri</i>	R	A	-	-

K = alcalino (rojo); **A**= Ácido (amarillo); ()= el símbolo en el paréntesis indica reacciones ocasionales

3 Reacciones de los cocos Gram positivos

	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Streptococcus spp</i>
Hemólisis	+ o -	+ o -
Catalasa	+	-

6.0 CONCLUSIONES.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

Prepara medios de cultivos (bacterianos), utilizados para el diagnóstico en el laboratorio. Interpreta resultados de pruebas de diagnóstico de bacterias.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

- Los hisopos utilizados para la prueba de oxidasa deberán incinerarse en el mechero inmediatamente después de realizado el experimento, mismos que deberán ser desechados en el contenedor de desechos biológicos junto con los discos para oxidasa-
- Los tubos de ensayo con los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizados a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión en autoclave. Posteriormente, se lavan, se secan y se vuelven a esterilizar para que estén disponibles para prácticas futuras.
- Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes.
- Las cajas de Petri que contenían los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizadas por medios de autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente podrán ser depositadas en el contenedor de residuos biológicos o basura común.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-o52-SEMARNAT-2005 y NOM-o87-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

José López-Álvarez y José A. Barajas Rojas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Bacteriología. UNAM.

Maxine M. Benjamín, B. S., D. V. M. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. College of Veterinary Medicine. Colorado State University. 1ª edición. Ed. Limusa. 1984.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o87-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o52-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 04. Algunas pruebas bioquímicas

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ Grupo: _____ Grado: _____ Equipo: _____

5.0 Resultados:

Completa los siguientes cuadros.

Bacteria	Oxidasa	Citrato de Simmons
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Salmonella</i> spp		

Medio SIM	Sulfuro	Motilidad	indol
<i>E. coli</i>			
<i>Salmonella</i> spp			

Reacciones de las enterobacterias en TSI.

Bacteria	Superficie (bisel)	Picadura (fondo)	Gas	H ₂ S
<i>E. coli</i>				
<i>Salmonella</i> spp				

Reacciones de las enterobacterias en LIA.

Bacteria	Superficie (bisel)	Picadura (fondo)	Gas	H ₂ S
<i>E. coli</i>				
<i>Salmonella</i> spp				

Reacciones de las enterobacterias en Gelatina Nutritiva

Bacteria	Reacción
<i>E. coli</i>	
<i>Salmonella</i> spp	

Dibuja los resultados con figuras y color (las tres series de tubos de las bioquímicas; sin inocular, inoculados con *E. coli* y con *Salmonella spp*):

Reacciones de los cocos Gram positivos

	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Streptococcus spp</i>
Hemólisis		
Catalasa		

6.0 Conclusiones

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 05. ELABORACIÓN DE UN ANTIBIOGRAMA Y SU INTERPRETACIÓN.

1.0 INTRODUCCIÓN.

La prueba de sensibilidad (antibiograma) se usa para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a uno o más antibióticos “in vitro”. Es muy importante para el médico veterinario el empleo de esta prueba, ya que el uso indiscriminado de los quimioterapéuticos ha originado cepas resistentes; sin embargo, la prueba por sí sola no es suficiente para la elección del antimicrobiano adecuado, por lo que el médico debe asociar el resultado del antibiograma con su experiencia clínica.

Alguna de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos que existen son: pruebas de difusión en agar, pruebas de concentración mínima inhibitoria en caldo, pruebas para producción de beta lactamasa.

En esta práctica realizarás la técnica de difusión en agar. En esta prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se estandariza el inóculo y se mide el tamaño del halo de inhibición en la zona alrededor del disco impregnado con un antibiótico para determinar la susceptibilidad de la bacteria. Por lo tanto, la lectura del diámetro de inhibición en mm debe interpretarse de acuerdo a una tabla de referencia. En Medicina Veterinaria no existen métodos similares estandarizados para cada una de las especies animales, por lo que el empleo de los estándares establecidos deberá interpretarse con cautela.

El clínico debe estar consciente de las limitaciones de las pruebas de susceptibilidad in vitro, y por lo tanto, el resultado del laboratorio deberá ser sólo uno de los muchos criterios a considerar en la elección de un quimioterapéutico clínicamente útil. Por lo que, es responsabilidad del médico el prescribir el antibiótico adecuado.

2.0 PROPÓSITO.

El alumno elaborará un antibiograma con el método de Bauer-Kirby y a partir de éste determinará la susceptibilidad in vitro de las bacterias a los antimicrobianos.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Incubadora
- Mechero Bunsen
- Reglas graduadas en milímetros y centímetros
- Hisopos estériles
- Alcohol

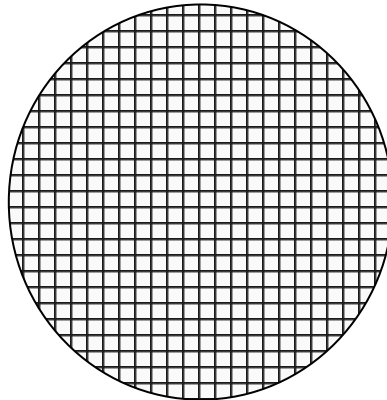
- Pinzas
- Un tubo de 16x150mm con 5ml de caldo de soya y tripticaseína con *E. coli* o *Salmonella* spp
- Una caja de Müller – Hinton
- Cultivo de *E. coli* en caldo

4.0 PROCEDIMIENTO.

Primera sesión.

1. Humedece el hisopo con el caldo bacteriano y exprime el exceso de líquido, presionándolo en las paredes del tubo.
2. Siembra en medio sólido para pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos:

La siembra se realiza en cajas de agar con ayuda de un hisopo estéril humedecido con un cultivo en caldo, el cual se usa para hacer estrías cerradas (continuas) en toda la superficie (en forma paralela y perpendicular) y por último pasa el hisopo alrededor de todo el perímetro de la caja como se muestra en la siguiente figura. Deja secar de 3 a 5 minutos la placa sembrada.



3. Coloca el multidisco conteniendo los antibióticos sobre la superficie del agar con ayuda de unas pinzas estériles: los discos no deberán quedar a menos de 15 mm de la orilla de la placa, por lo que deberás centrarla lo mejor posible, por último presiona con las pinzas y muy suavemente cada una de las almohadillas de antibiótico. Espera de 5 a 10 minutos antes de incubar.
4. Incuba las placas en posición invertida a una temperatura de 37° C durante 24 horas.

Segunda sesión.

5. Una vez transcurrido el tiempo de incubación mide la zona de inhibición. El antibiótico más activo (susceptible) “in vitro”, será aquél que produzca un halo mayor. Se considera que un microorganismo es resistente cuando alrededor del disco con antibiótico hay crecimiento bacteriano. Utiliza la regla para medir los halos, debes incluir los 6 mm del disco, consulta la siguiente tabla:

	Diámetro en mm del halo de inhibición
Sensible (S)	Mayor a 13 mm
Intermedio (I)	11 a 12 mm
Resistente (R)	Menor o igual a 10mm

5.0 RESULTADOS.

Antibiótico		Diámetro en mm del halo de inhibición
Amikacina	(AK)	
Ampicilina	(AM)	
Cefalotina	(CF)	
Ceftriaxona	(CRO)	
Cloranfenicol	(CL)	
Dicloxacilina	(DC)	
Enoxacina	(ENX)	
Eritromicina	(E)	
Gentamicina	(GE)	
Netilmicina	(NET)	
Penicilina	(PE)	
Trimetoprim – sulfametoxazol	(SXT)	

6.0 CONCLUSIONES.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

- Realiza pruebas de resistencia a antibióticos de bacterias.
- Interpreta resultados de pruebas de diagnóstico y resistencia de bacterias.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

- Los hisopos empleados para la siembra deberán ser incinerados en el mechero inmediatamente después de terminado el procedimiento y se desecharán en el contenedor de material biológico de desecho.
- Los tubos de ensayo y las placas Petri que contienen los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizados mediante autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 lbs de presión. Posteriormente las placas petri podrán ser desechadas en los contenedores de material biológico de desecho o basura común. Los tubos de ensayo de vidrio deberán lavarse, secarse y esterilizarse para que estén listos para prácticas futuras.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-o52-SEMARNAT-2005 y NOM-o87-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

Kaiser, G.E. Microbiology Laboratory Manual The Community Collage of Baltimore Country, Catonsville Campus, 2001

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o87-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o52-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC --05: Elaboración de un antibiograma y su interpretación

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ Grupo: _____ Grado: _____ Equipo: _____

5.0 Resultados

Bacteria: _____

Antibiótico		Diámetro en mm del halo de inhibición
Amikacina	(AK)	
Ampicilina	(AM)	
Cefalotina	(CF)	
Ceftriaxona	(CRO)	
Cloranfenicol	(CL)	
Dicloxacilina	(DC)	
Enoxacina	(ENX)	
Eritromicina	(E)	
Gentamicina	(GE)	
Netilmicina	(NET)	
Penicilina	(PE)	
Trimetoprim – sulfametoxazol	(SXT)	

a) Explique la importancia de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

b) Explica por qué no se puede utilizar con toda confianza el método de Bauer-Kirby, en medicina veterinaria.

6.0 Conclusiones

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 06. CULTIVO, OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE HONGOS.

1.0 INTRODUCCIÓN.

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila: La mayoría de las 100 000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta descomponiéndola. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales.

Los hongos crecen en dos formas básicas: levaduras y mohos. El crecimiento del hongo en forma de moho produce colonias filamentosas multicelulares, que constan de túbulos cilíndricos ramificados llamados hifas; cada hifa puede tener un grosor uniforme o bien, terminar en porciones más delgadas o más anchas. Además, las hifas pueden ser septadas (con divisiones o tabiques) o cenocíticas (contínuas, sin ninguna división).

El micelio puede clasificarse como reproductor (aéreo) o como nutritivo. El primero es aquél cuyas hifas se elevan por encima del sustrato donde crece, dando lugar a la formación de esporas. El segundo es el que penetra en el medio o sustrato y su función es de nutrición (vegetativo). El conjunto de micelio y diferentes estructuras de reproducción constituye la colonia del hongo, la cual presenta un crecimiento radial.

2.0 PROPÓSITOS

- 2.1 Que el alumno observe el crecimiento de los hongos en agar de Sabouraud.
- 2.2 Que el alumno observe las características macroscópicas de algunas colonias de hongos.
- 2.3 Que el alumno realice una observación microscópica del micelio.

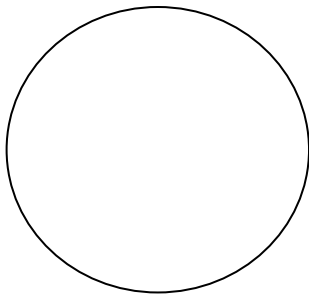
3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Microscopio
- Cultivos de hongos en placa o muestra de raspado cutáneo sospechosa para hongos
- Caja con agar de Sabouraud o Malta o PDA
- Pinzas
- Alcohol
- Mechero
- Incubadora
- Cinta Scotch
- Lupa

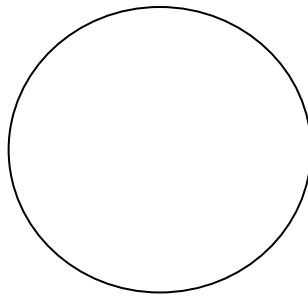
4.0 Procedimiento.

1. Siembra la muestra del hongo en el centro de la caja de agar de Sabouraud.
2. Incuba a 28°C de 1 a 30 días.
3. Observa a simple vista las colonias de hongos por el frente y reverso de la caja.
4. Coloca la caja en el microscopio estereoscópico y observa las colonias de hongos.
5. Anota tus observaciones y compáralas con las láminas que se te proporcionarán en el laboratorio.
6. Prepara una muestra del micelio aéreo en cinta scotch colocándole una gota de azul de lactofenol y observa al microscopio óptico.

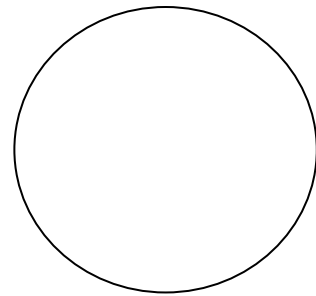
5.0 Resultados.



Morfología colonial



Microscopio estereoscópico



Microscopio óptico

6.0 CONCLUSIONES.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

- Utiliza medios de cultivos (fúngicos), empleados para el diagnóstico en el laboratorio.
- Prepara muestras y coloraciones, utilizadas para diferentes estructuras fúngicas.
- Observa en el microscopio estereoscópico y óptico muestras de hongos.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes

Las cajas de Petri que contenían los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizadas por medio de autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente podrán ser depositadas en el contenedor de desechos biológicos o basura común.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-o52-SEMARNAT-2005 y NOM-o87-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

Agrios, G. N. Fitopatología. México. Ed. Limusa. 1998.

Instituto Geográfico de Agostini. Ciencias de la naturaleza. Botánica I, Vol. 4. España. Ed. Planeta. 1997.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o87-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o52-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Pelczar, M. J., E.C.S. Chan. Elementos de microbiología, México, ed. Mc Graw – Hill, 1991.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

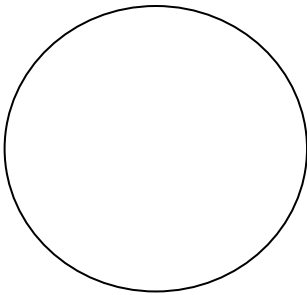
REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 06. Cultivo, observación macroscópica y microscópica de hongos

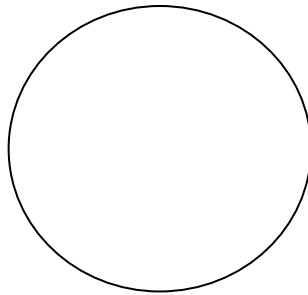
Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ **Grupo:** _____ **Grado:** _____ **Equipo:** _____

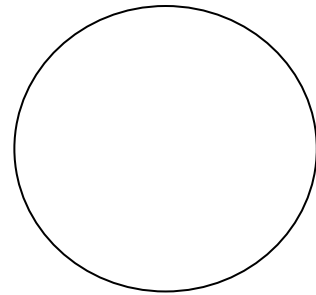
5.0 Resultados



Morfología colonial



Microscopio estereoscópico



Microscopio óptico

6.0 Conclusiones y comentarios

¿Alcanzaron los objetivos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 07. OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS VIVOS.

1.0 INTRODUCCIÓN.

El ojo humano solamente puede percibir objetos tan pequeños como 0.1 mm, ya que las células vivientes son más pequeñas que esto (existen excepciones), es necesario aumentar varias veces su tamaño para que puedan ser visibles al microscopio. Es por eso que es muy importante el conocimiento del microscopio; lo mismo que el familiarizarnos con las unidades de medición comúnmente utilizadas para describir objetos microscópicos.

Unidades de medición.

1 milímetro (mm) = $1 \text{ m} \times 10^{-3}$

1 Micrómetro o micra (μ) = $1 \text{ m} \times 10^{-6}$

1 Nanómetro (nm) o milimicra (m μ) = $1 \text{ micra} \times 10^{-3}$

Límites del poder de resolución.

Ojo humano sin ayuda de ningún instrumento: 0.2 mm

Microscopio óptico compuesto: 0.2 micras

Microscopio electrónico: 2 nm a 0.2 nm

En esta práctica observarás microorganismos de una muestra de contenido ruminal; así como de suspensiones de levaduras y bacterias. Podrás apreciar principalmente la movilidad de muchos microorganismos y también algunas estructuras internas en los microorganismos más grandes que las bacterias, para lo cual tendrás que hacer uso del objetivo de inmersión (100X).

Para el desarrollo de esta práctica el laboratorista te dará un repaso sobre las partes del microscopio y su uso, por lo que tendrás que estudiar previamente el anexo 3.1.

2.0 PROPÓSITOS.

2.1 Elaborará preparaciones húmedas a partir de contenido ruminal y suspensiones de bacterias y levaduras.

2.2 Distinguirá por medio del microscopio el movimiento microbiano real, de los movimientos Browniano y de corrientes en una preparación húmeda.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Microscopio óptico compuesto (**Anexo 3.1**)
- Mechero Bunsen
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asa microbiológica

- Papel para limpiar lentes
- Aceite de inmersión
- Muestra de contenido ruminal
- Suspensión de bacterias
- Suspensión de levaduras

4.0 PROCEDIMIENTO.

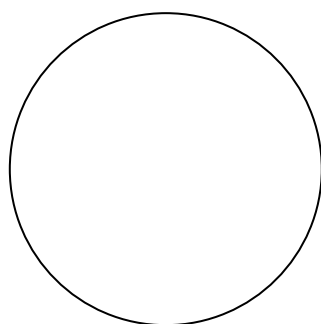
Elaboración de una preparación húmeda.

1. Coloca una pequeña cantidad de vaselina sólida sobre la palma de la mano izquierda. Raspa una pequeña cantidad de la vaselina sobre los cuatro bordes de un cubreobjeto. No debes tocar las caras del cubreobjeto con los dedos.
2. Coloca el cubreobjeto sobre la mesa con la cara que tiene la vaselina hacia arriba.
3. Con el asa microbiológica (de ahora en adelante nos referiremos al asa microbiológica como el “asa”) toma una muestra del contenido ruminal, tocando suavemente la superficie de ésta. Coloca la muestra en el centro del cubreobjeto.
4. Utilizando una laminilla (portaobjeto) haz ligera presión sobre el cubreobjeto para que éste quede adherido a la misma.
5. Inmediatamente coloca la preparación sobre la platina del microscopio para ser observada con el objetivo seco débil (10X), seco fuerte (40X) y de inmersión (100X).

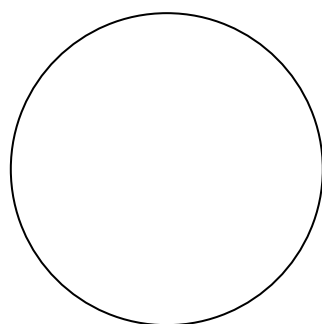
Observarás cuidadosamente la gran variedad de microorganismos, fíjate en el tamaño, forma, si tienen o no movimiento, órganos de locomoción, estructuras intracelulares, etc. Haz dos preparaciones húmedas con las suspensiones de bacterias y de hongos y obsérvalas de la misma manera que hiciste con el contenido ruminal.

5.0 RESULTADOS.

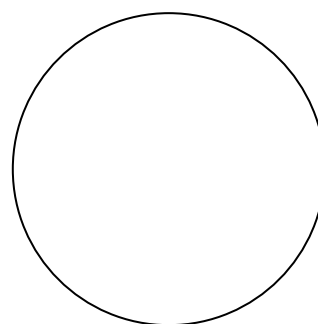
Dibuja tus observaciones:



Contenido ruminal
10X y 40X



Suspensión de hongos
10X y 40X



Suspensión de levaduras
10X y 40X

6.0 CONCLUSIONES.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

- Prepara frotis y coloraciones, utilizadas para diferentes estructuras bacterianas y de protozoarios.
- Observa en el microscopio óptico, bacterias y protozoarios.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-o52-SEMARNAT-2005 y NOM-o87-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o87-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o52-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Pelczar, M. J., E.C.S. Chan. Elementos de microbiología, México, ed. Mc Graw – Hill, 1991.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

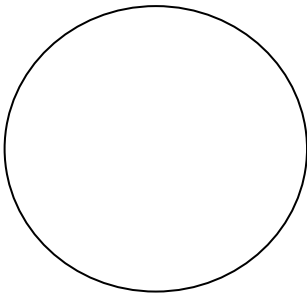
REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 07. Observación de microorganismos vivos.

Nombre del alumno: _____

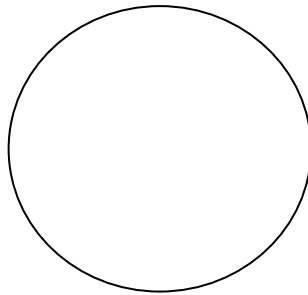
Fecha: _____ **Grupo:** _____ **Grado:** _____ **Equipo:** _____

5.0 Resultados



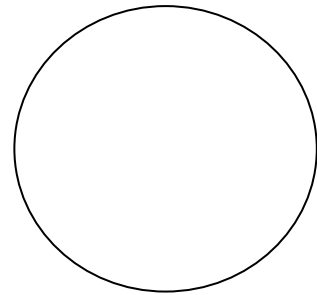
Contenido ruminal

10X y 40X



Suspensión de hongos

10X y 40X



Suspensión de levaduras

10X y 40X

6.0 Conclusiones y Comentarios.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 08. TINCIÓN NEGATIVA PARA CÁPSULA.

1.0 INTRODUCCIÓN.

Muchas bacterias poseen cápsula, la cual se mantiene adherida a la misma como una envoltura, sin interferir en su permeabilidad. La mayoría de las cápsulas están constituidas por polisacáridos.

La cápsula tiene gran importancia porque: son antigénicas y virulentas. No se tiñe bien con las técnicas usuales porque son incapaces de retener el colorante y porque los procesos de fijación al calor y lavado las disuelven, por esta razón, utilizaremos la técnica de tinción negativa (Maneval modificado).

A nivel de laboratorio, la búsqueda de la presencia de la cápsula es un aporte más en la identificación bacteriana.

2.0 PROPÓSITOS.

- 2.1 Teñir un frotis hecho a partir de bacterias que posean cápsula, la cual se podrá observar al aplicarle la tinción de Maneval.
- 2.2 Distinguir la cápsula en un frotis teñido con la técnica de Maneval.
- 2.3 Relacionar la presencia de la cápsula con la morfología de las colonias.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Microscopio (**Anexo 3.1**)
- Mechero
- Laminillas
- Juego de reactivos para la tinción de Maneval (**Anexo 5.1**)
- Cultivos de bacterias encapsuladas
- Asa microbiológica
- Lápiz graso
- Toallas de papel

Tinción negativa con el método de Maneval modificado.

4.0 PROCEDIMIENTO.

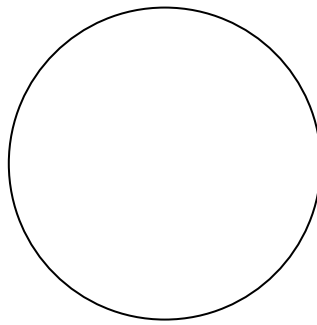
1. Dibuja dos círculos sobre una laminilla y deposita en cada círculo una gota de Maneval A (rojo congo).
2. Con ayuda de un asa toma un poco del cultivo que se te proporcione y mézclalo con una de las gotas de Maneval A, haciendo movimientos giratorios con el asa. Extiende la suspensión de manera que quede una película delgada. Repite la operación con otro

de los cultivos sobre la otra gota de Maneval A y deja que se sequen a la temperatura ambiente. **NO FIJES EL FROTIS AL CALOR.**

3. Cubre los frotis con Maneval B (fucsina ácida) y deja que actúe durante un minuto. Lava suavemente con agua de la llave y seca el frotis mediante un ligero contacto con una toalla de papel.
4. Observa al microscopio con el objetivo de inmersión. Las cápsulas se observan como halos incoloros. El espacio intercelular se ve de un color oscuro y las células bacterianas de rojo.

5.0 RESULTADOS

Dibuja tus observaciones



Campo observado al microscopio

6.0 CONCLUSIONES.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

- Utiliza medios de cultivos empleados para el diagnóstico en el laboratorio.
- Prepara muestras y coloraciones, utilizadas para diferentes estructuras bacterianas.
- Observa en el microscopio óptico muestras de bacterias esporuladas.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes.

Las cajas de Petri que contenían los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizadas por medio de autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente podrán ser depositadas en el contenedor de desechos biológicos o basura común.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-052-SEMARNAT-2005 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Pelczar, M. J., E.C.S. Chan. Elementos de microbiología, México, ed. Mc Graw – Hill, 1991.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

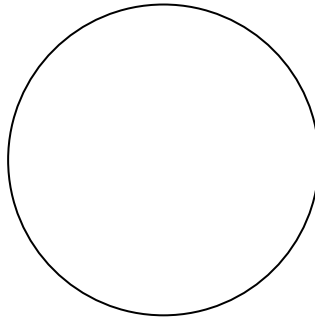
BAC Y MIC – 08. Tinción negativa para cápsula.

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ **Grupo:** _____ **Grado:** _____ **Equipo:** _____

5.0 Resultados

Dibuja tus observaciones:



6.0 Conclusiones y comentarios

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 09. MICROBIOLOGÍA RUMINAL.

1.0 INTRODUCCIÓN.

La microbiología ruminal tiene un papel importante en la utilización de alimentos por rumiantes. Por un lado, permite utilizar alimentos de uso limitado en otras especies animales, tales como subproductos lignocelulósicos y nitrógeno no-proteínico. Por otro lado, algunos alimentos de alta, mediana y baja calidad, pueden perder parte de la misma por los efectos de la degradación ruminal, tales como las proteínas de alta y mediana degradabilidad (Yokoyama y Johnson, 1988). Esta degradación permite generar la mayor parte de la energía, aminoácidos y algunas vitaminas para la nutrición de los rumiantes. Sin embargo, también se pueden generar problemas como acidosis y timpanismo. Los principales conocimientos y habilidades a desarrollar incluyen los principios básicos de microbiología, las características de la microbiología ruminal, fermentación de nutrientes y generación de ácidos grasos volátiles, seguido por opciones para modificar la fermentación ruminal y prevención de las alteraciones de la fermentación (Bannink *et al.* 2008).

2.0 PROPÓSITOS.

2.1 Que el alumno observe e identifique la microbiota ruminal considerados habitantes naturales en los compartimentos pre-gástricos de los rumiantes y responsables de la degradación y transformación de los nutrientes contenidos en los alimentos.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Microscopio
- Juego de reactivos para la tinción de Gram
- Portaobjetos (laminilla) 26 x 76 mm y cubreobjetos
- Marcador Indeleble
- Lápiz graso
- Asa
- Contenido ruminal de bovino
- Rumiante canulado de rumen
- Vasos de precipitado 200 ml
- Recipiente para colección de contenido ruminal
- Gasas
- Bata, guantes de palpación
- Cubrebocas
- Pipeta Pasteur
- Vidrio de reloj
- Matraz Erlenmeyer
- Lápiz y cuaderno

4.0 PROCEDIMIENTO.

El alumno acudirá a la Unidad de bovinos de la FMVZ-UAS para tomar una muestra de contenido ruminal directamente a través de cánula en rumen de un bovino disponible. Para ello utilizará guante de palpación y tomará 400 ml de contenido ruminal y lo meterá a un recipiente cerrándolo de inmediato para ser trasladado al laboratorio. En el laboratorio al contenido ruminal obtenido se le hará una filtración a través de cuatro capas de gasas colocadas sobre la boca de un vaso precipitado de 200 ml para obtener una cantidad de 150 ml de líquido ruminal y se tapara con vidrio de reloj. Se tomaran unas gotas de líquido ruminal con una pipeta o asa y se colocará en portaobjeto y se cubrirá la gota con un cubreobjetos y se procederá a observar en microscopio para identificar los protozoarios, mismos a los que se le dibujarán sus características morfológicas para la diferenciación y clasificación de otros microorganismos presentes en el contenido ruminal del bovino, los cuales para su diferenciación a otra muestra (gotas de líquido ruminal) se les aplicara la técnica de tinción gran para la localización y observación de las colonias bacterianas.

5.0 RESULTADOS.

- a) Dibujos de microorganismos ruminales
- b) Discusión de la importancia del ecosistema ruminal (microorganismos, alimento, temperatura, pH)
- c) Manipulación del ecosistema ruminal para mejorar la alimentación pecuaria.

6.0 Conclusiones y comentarios.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

- Prepara frotis y coloraciones, utilizadas para diferentes estructuras bacterianas y de protozoarios.
- Observa en el microscopio óptico, bacterias y protozoarios.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-o52-SEMARNAT-2005 y NOM-o87-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o87-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o52-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Pelczar, M. J., E.C.S. Chan. Elementos de microbiología, México, ed. Mc Graw – Hill, 1991.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 09. Microbiología ruminal.

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ **Grupo:** _____ **Grado:** _____ **Equipo:** _____

5.0 Resultados

6.0 Conclusiones y comentarios

¿Se alcanzaron los propósitos? Sí No

Si contesto sí, responda el siguiente cuestionario.

1. Mencione los tipos de microorganismos del rumen

2. Explique la importancia de las bacterias y protozoarios ruminales

3. Discuta la interacción del alimento-microorganismos ruminales-animal

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 10. TINCIÓN PARA BACTERIAS ÁCIDO – ALCOHOL RESISTENTES (ZIEHL – NEELSEN).

1.0 INTRODUCCIÓN.

Las bacterias ácido-alcohol resistentes forman un grupo de microorganismos que se definen con base en sus propiedades tintoriales. Son relativamente impermeables a los colorantes básicos, pero una vez teñidos retienen el colorante con tenacidad, resistiendo la decoloración con solventes orgánicos acidificados.

La ácido-alcohol resistencia está determinada por la composición de la pared celular, la cual además de contener peptidoglicanos está constituida por un alto porcentaje de glicolípidos hidrofóbicos. Un componente importante de estos, son los ácidos micólicos. La presencia de estas capas hidrofóbicas previenen la penetración de soluciones acuosas, siendo ésta la causa por la cual estos microorganismos no pueden teñirse con los métodos convencionales (tinción de Gram).

Uno de los métodos de tinción más comúnmente empleados para demostrar la ácido-alcohol resistencia, es el método de Ziehl-Neelsen. En este método, la penetración del colorante primario se facilita debido a que éste se encuentra disuelto en fenol y a que es aplicado en presencia de calor.

Con la tinción de Ziehl-Neelsen, tanto las bacterias ácido-alcohol resistentes como las que no lo son se tiñen con el colorante primario. Sin embargo, al aplicar el agente decolorante, compuesto por una mezcla de alcohol-ácido, éste no solubiliza los lípidos de la pared de las bacterias ácido-alcohol resistentes, y por lo tanto no se decoloran fácilmente, por lo que se vuelven a teñir al aplicar el colorante de contraste.

El grupo de bacterias ácido-alcohol resistentes está representado principalmente por el género *Mycobacterium*. Algunas especies de este género juegan un papel muy importante como agentes etiológicos de la tuberculosis y otras enfermedades granulomatosas, tanto en el hombre como en los animales.

En el análisis de un frotis de material clínico sospechoso de contener bacilos tuberculosos, el hallazgo de un solo bacilo ácido alcohol resistente puede tener valor diagnóstico, ya que en la mayoría de los casos no son abundantes. Sin embargo, la interpretación del hallazgo de bacilos ácido-alcohol resistentes debe hacerse con cautela y con base en la historia clínica y otras pruebas de laboratorios, ya que la presencia de especies saprófitas de *Mycobacterium* y *Nocardia* ocasionalmente pueden comportarse como bacterias ácido-alcohol resistentes.

2.0 PROPÓSITOS.

- 1.1 Que el alumno realice la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen para la observación de bacterias ácido-alcohol resistentes.
- 1.2 Distinguir las bacterias ácido-alcohol resistentes de las que no lo son.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

- Microscopio (**Anexo BAC Y MIC-3.1**)
- Mechero
- Platina caliente
- Portaobjetos
- Papel filtro
- Lápiz graso
- Juego de reactivos para la tinción de Ziehl-Neelsen (**Anexo BAC Y MIC-6.1**)
- Agua destilada
- Cultivo de bacterias ácido-alcohol resistentes
- Aceite de inmersión

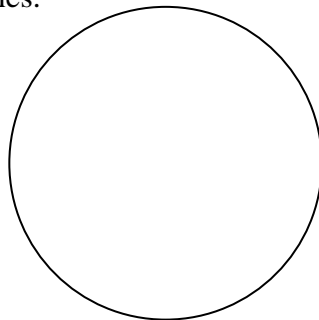
4.0 PROCEDIMIENTO.

1. Una vez preparado un frotis con el cultivo que se te proporcione en el laboratorio, coloca un trozo de papel absorbente sobre el frotis. El papel debe ser más pequeño que la superficie de la laminilla.
2. Humedece el papel con la fucsina fenicada (colorante primario) y coloca el frotis sobre la platina caliente (70° C). Continúa agregando colorante conforme sea necesario para evitar que el frotis se seque. Permite la emisión de vapores durante 5 minutos. Retira el frotis de la platina, quítale el papel, déjalo enfriar y lava con agua corriente de la llave.
3. Decolora con el alcohol-ácido, permitiéndole actuar durante 2 minutos. Es importante realizar la decoloración perfectamente, ya que de no ser así se corre el riesgo de observar reacciones falsas positivas. Lava con agua corriente de la llave.
4. Contrasta con azul de metileno de Loeffler durante un minuto. Lava con agua corriente, seca y observa al microscopio con objetivo de inmersión.

Los microorganismos ácido-alcohol resistentes se tiñen de color rojo y los microorganismos no ácido-alcohol resistentes de color azul.

5.0 RESULTADOS.

Dibuja tus observaciones:



Campo observado al microscopio

6.0 Conclusiones.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

- Utiliza medios de cultivos, empleados para el diagnóstico en el laboratorio.
- Prepara muestras y coloraciones, utilizadas para diferentes estructuras fúngicas.
- Observa en el microscopio óptico muestras de bacterias ácido-alcohol resistentes.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

Los portaobjetos al finalizar la práctica deberán ser depositados en el contenedor de punzocortantes.

Las cajas de Petri que contenían los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizadas por medio de autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente podrán ser depositadas en el contenedor de desechos biológicos o basura común.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-052-SEMARNAT-2005 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Pelczar, M. J., E.C.S. Chan. Elementos de microbiología, México, ed. Mc Graw – Hill, 1991.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

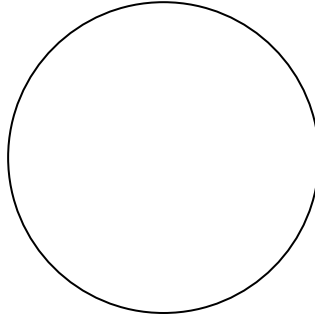
BAC Y MIC – 10. Tinción para bacterias ácido – alcohol resistentes (Ziehl – Neelsen)

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ **Grupo:** _____ **Grado:** _____ **Equipo:** _____

5.0 Resultados

Dibuja tus observaciones:



Mencione cinco especies bacterianas ácido-alcohol resistente de importancia veterinaria.

6.0 Conclusiones.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

BAC Y MIC – 11. DIAGNÓSTICO Y MICROBIOLOGÍA DE MASTITIS EN EL LABORATORIO.

1.0 INTRODUCCIÓN.

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, asociada a diversos factores tales como: etiología (traumatismos, agentes químicos o agentes infecciosos), condición del animal (estado y etapa de lactación), factores ambientales (higiene y tipo de ordeño). Puede tener una manifestación clínica o subclínica. La manifestación clínica es fácil de diagnosticar ya que presenta cambios patológicos tales como: calor, dolor, rubor, aumento de tamaño y disminución o pérdida de la producción láctea. Dependiendo de su curso la mastitis puede ser sobreaguda, aguda o crónica; en casos severos puede conducir a una septicemia.

La mastitis subclínica carece de manifestaciones externas, aunque internamente suceden cambios en el tejido glandular que afectan la calidad y cantidad de la leche. Este tipo de mastitis es importante ya que al no ser detectada fácilmente puede representar un foco de infección para animales sanos o conducir a una mastitis clínica. Existen pruebas de campo que permiten la detección de la mastitis subclínica y que deben aplicarse rutinariamente en las explotaciones. Una de las pruebas más utilizadas es la de California.

El diagnóstico de la mastitis incluye el análisis, por parte del clínico, de los cambios patológicos y funcionales de la glándula afectada y del análisis del bacteriólogo para determinar el agente infeccioso involucrado y la susceptibilidad del mismo con el fin de controlar adecuadamente la incidencia del problema en un hato, esto es necesario debido a la gran pérdida económica.

Para establecer un buen control es necesario conocer los microorganismos asociados como son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Corynebacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., *Mycoplasma* spp. y *Candida* spp. Dado que son muchos los agentes etiológicos asociados a cuadros de mastitis, es preciso contar con un diagnóstico clínico presuntivo que sirva como base para la elección de técnicas y medios de cultivo a utilizar.

2.0 PROPÓSITOS.

Que el alumno aplique los procedimientos generales para el diagnóstico bacteriológico de muestras de leche mastítica.

Que el alumno conozca los aspectos clínicos relacionados con la mastitis.

Que el alumno conozca la importancia del diagnóstico bacteriológico y micológico de la mastitis.

Que el alumno enliste las principales bacterias y hongos asociados a problemas de mastitis.

Que el alumno realice un frotis directo a partir de muestras de leche.

Que el alumno realice el aislamiento de bacterias a partir de muestras de leche.

Que el alumno identifique el género y especie del microorganismo aislado mediante pruebas bioquímicas.

Que el alumno determine el antibiótico de elección para tratar al paciente.

3.0 MATERIAL Y EQUIPO.

Historia clínica

Muestras de leche mastítica (100 ml)

Caja de agar sangre

Caja de agar MacConkey

Juego de tinción de Gram

Juego de tinción de Ziehl-Neelsen

Pruebas bioquímicas necesarias para identificación de microorganismos aislados.

4.0 PROCEDIMIENTO.

La siguiente metodología es la sugerida por el "Consejo Nacional de la Mastitis" de los EUA en su publicación "Procedimientos de diagnóstico de la mastitis bovina" 1. Las muestras refrigeradas deben ser calentadas a 25 °C durante 15 minutos con el fin de liberar los microorganismos atrapados en la grasa de la leche.

2. La muestra debe agitarse vigorosamente para homogenizarla.

3. Inmediatamente procede a realizar dos frotis fijos, tíñelos con Gram y Ziehl-Neelsen respectivamente, obsérvalos y anota los resultados.

4. Inocula 3 asadas de la muestra (son necesarias por lo menos 0.025 ml) en la caja de agar sangre y agar MacConkey y a partir de este inóculo realiza la primera estría y completa la técnica para aislamiento en cultivo puro. Incuba 24 h a 37 °C, en algunos casos será necesario incubar hasta 48 h.

5. De las colonias aisladas describe números relativos y morfología macroscópica.

6. Realiza un frotis fijo a partir de las colonias representativas del aislamiento y describe forma, agrupación y reacción al Gram.

7. Realiza las pruebas de identificación necesarias para determinar género y especie ("Pruebas bioquímicas", ver práctica #4 de éste manual).

8. Realiza las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos para los microorganismos identificados ("Elaboración de un antibiograma y su interpretación", ver práctica #5 de éste manual).

9. Emite un resultado definitivo y de acuerdo a éste señala los comentarios y/o recomendaciones útiles para el clínico.

5.0 RESULTADOS.

Reacciones de los cocos Gram positivos

	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Streptococcus</i> spp
Hemólisis		
Catalasa		

Bacteria: _____

Antibiótico		Diámetro en mm del halo de inhibición
Amikacina	(AK)	
Ampicilina	(AM)	
Cefalotina	(CF)	
Ceftriaxona	(CRO)	
Cloranfenicol	(CL)	
Dicloxacilina	(DC)	
Enoxacina	(ENX)	
Eritromicina	(E)	
Gentamicina	(GE)	
Netilmicina	(NET)	
Penicilina	(PE)	
Trimetoprim – sulfametoxazol	(SXT)	

6.0 Conclusiones y comentarios.

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

7.0 SABERES PRÁCTICOS ADQUIRIDOS POR EL ALUMNO AL TÉRMINO DE LA PRÁCTICA.

- Realiza pruebas de resistencia a antibióticos de bacterias.
- Interpreta resultados de pruebas de diagnóstico y resistencia de bacterias.

8.0 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN LA PRÁCTICA.

- Los hisopos empleados para la siembra deberán ser incinerados en el mechero inmediatamente después de terminado el procedimiento y se desecharán en el contenedor de material biológico de desecho.
- Los tubos de ensayo y las placas Petri que contienen los diferentes medios de cultivo deberán ser esterilizados mediante autoclave a 121°C por 15 minutos y a 15 lbs de presión. Posteriormente las placas petri podrán ser desechadas en los contenedores de material biológico de desecho o basura común. Los tubos de ensayo de vidrio deberán lavarse, secarse y esterilizarse para que estén listos para prácticas futuras.

9.0 IMPACTO EN BIENESTAR ANIMAL Y/O MEDIO AMBIENTE.

De acuerdo a las NOM-o52-SEMARNAT-2005 y NOM-o87-ECOL-SSA1-2002 deberá hacerse un manejo adecuado de los residuos generados para evitar contaminación del aire, suelo, agua y daños en salud pública. Así mismo se estaría evitando ser acreedores de una sanción por parte de una dependencia gubernamental.

10.0 FUENTES DE INFORMACIÓN.

Kaiser, G.E. Microbiology Laboratory Manual The Community Collage of Baltimore Country, Catonsville Campus, 2001

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o87-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-o52-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

REPORTE DE PRÁCTICA

BAC Y MIC – 11. Diagnóstico y microbiología de mastitis en el laboratorio.

Nombre del alumno: _____

Fecha: _____ Grupo: _____ Grado: _____ Equipo: _____

Reacciones de los cocos Gram positivos

	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Streptococcus</i> spp
Hemólisis		
Catalasa		

5.0 Resultados

Bacteria: _____

Antibiótico		Diámetro en mm del halo de inhibición
Amikacina	(AK)	
Ampicilina	(AM)	
Cefalotina	(CF)	
Ceftriaxona	(CRO)	
Cloranfenicol	(CL)	
Dicloxacilina	(DC)	
Enoxacina	(ENX)	
Eritromicina	(E)	
Gentamicina	(GE)	
Netilmicina	(NET)	
Penicilina	(PE)	
Trimetoprim – sulfametoxazol	(SXT)	

Antibiótico (s) sugerido (s):

6.0 Conclusiones

¿Alcanzaron los propósitos?

Sí

No

Nombre del Instructor:

Firma

Sello

6. FUENTES DE INFORMACIÓN

- Agrios**, G. N. Fitopatología. México. Ed. Limusa. 1998.
- Coffin** David L., V.M.D. Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. 3ª edición. Ed. La prensa Médica Mexicana. México. 1997.
- Divo** Alejandro. Microbiología médica. México. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México. 4ª edición. 1990.
- Finegol**, S. Baron, E. J. 1989. Bailey/ Scout Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana.
- Giono**, C.S., A. Escobar, J. L. Valdés. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales, México, 1994
- Instituto Geográfico de Agostini**. Ciencias de la naturaleza. Botánica I, Vol. 4. España. Ed. Planeta. 1997.
- Instituto Politécnico Nacional**. Escuela Nacional de Ciencias biológicas. Departamento de Microbiología Veterinaria. México. 1996.
- Jawetz**, Melnik and Adelberg. Microbiología médica. El manual moderno. 2001.
- Kaiser**, G.E. Microbiology Laboratory Manual The Community Collage of Baltimore Country, Catonsville Campus, 2001
- Koneman**, E.W., D.A. Stephen, V.R. Dowel, W.M. Janda, M.S. Herbert and C.W. Washington. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Trad. Del inglés por N.G. Meerot y B.E. Roel. México 3ª edición, editorial Panamericana, 1998.
- López-Álvarez** José y A. Barajas RojasJosé. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Bacteriología. UNAM.
- Lynch**, M.J., S.S. Rápale, L.D. Melloretal. Métodos de Laboratorio, 2^{da} edición, México Interamericana, 1989.
- Maxine M.** Benjamín, B. S., D. V. M. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Collage of Veterinary Medicine. Colorado State University. 1ª edición. Ed. Limusa. 1984.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005**, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002**, protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

Pelczar, M. J., E.C.S. Chan. Elementos de microbiología, México, ed. McGraw – Hill, 1991.

7. ANEXOS

7.1 Actividades previas a la práctica.

BAC Y MIC – 01

- Explica la importancia de los medios de bioseguridad en el laboratorio de Bacteriología y Micología.
- Menciona cinco medidas básicas de seguridad que se debe implementar en el laboratorio de Bacteriología y Micología.
- Menciona las medidas de seguridad que se deben tener para trabajar con muestras que contienen microorganismos de alta peligrosidad.

BAC Y MIC – 02

- Explica la importancia y los tipos de métodos de esterilización y desinfección en el laboratorio de Bacteriología y Micología.
- Explica los principios básicos del funcionamiento de la esterilización para establecer que procedimiento es necesario seguir en los diferentes materiales empleados en el laboratorio de Bacteriología y Micología.

BAC Y MIC – 03

- Explica el fundamento de la tinción de Gram.
- Menciona la utilidad de frotis fijo en el laboratorio de microorganismos.
- Menciona la utilidad taxonómica de la tinción de Gram.
- En lista tres factores que pueden afectar los resultados de la tinción de Gram.
- En lista cinco géneros Gram positivos y cinco géneros Gram negativos de interés veterinario.

BAC Y MIC – 04

- Explica en qué se basan las pruebas bioquímicas.
- Explica los procesos de fermentación por bacterias.
- ¿Cuál es la utilidad de los indicadores de pH en un medio para investigar la fermentación?

BAC Y MIC – 05

- Explica la importancia de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.
- Explica por qué no se puede utilizar con toda confianza el método de Bauer *et al*, en medicina veterinaria.

BAC Y MIC – 06

- Importancia de conocer las características morfológicas coloniales de los hongos.
- Diferencia entre la morfología colonial bacteriana y la morfología colonial de hongos.
- ¿Cuál es la importancia de la observación macroscópica y microscópica de hongos?
- Enlista los géneros de interés en medicina veterinaria.

- Explica las diferencias que existen en la morfología microscópica de los hongos filamentosos (mohos) y los levaduriformes (levaduras).

7.2 Preparación de medios de cultivo.

BAC Y MIC – 5. Caldo de soya tripticasa.

Suspenda 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezcle bien. Caliente ligeramente. Distribuya en tubos y esterilice en autoclave de 118° C a 121° C durante 15 minutos.

BAC Y MIC – 2 y 6 Medio PDA.

Suspenda 39g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121° C durante 15 minutos. Una vez esterilizado enfriar a unos 40 – 45° C y vaciar en caja de Petri.

BAC Y MIC – 5 Caldo nutritivo.

Suspender 8 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
Mezclar bien y calentar a ebullición
Distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100
Esterilizar en autoclaves a 121° C durante 10 minutos
Guardar en refrigeración.

BAC Y MIC – 5 Agar de soya tripticaseína (TSA).

Suspenda 40g del medio deshidratado en un litro de agua destilada
Calentar agitando frecuentemente durante un minuto hasta disolver
Esterilizar en autoclave entre 118 y 121°C
Enfriar y vaciar en cajas de Petri

BAC Y MIC – 2, 3 y 4 Agar nutritivo.

Suspender 23 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente durante un minuto hasta disolver. Esterilizar en autoclave entre 118 y 121° C.

BAC Y MIC – 4 Medio SIM.

Suspender 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta disolver. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave entre 118 y 121° C. Dejar enfriar en posición vertical.

BAC Y MIC – 3 a la 11 Agar sangre.

Suspender 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar remojar durante 10 minutos, después se hierve durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Dejar enfriar (45 a 50° C) y añadir un 5% de sangre desfibrinada estéril. Homogenizar y vaciar en cajas de Petri estériles.

BAC Y MIC – 2 a la 5 y 11 Agar de sal y manitol.

Suspender 111 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
Calentar hasta disolver.
Esterilizar en autoclave a 121° C.
Dejar enfriar
Vaciar en cajas de Petri.

BAC Y MIC – 2 a la 5 y 11 Agar E.M.B.

Suspender 36 g del medio en un litro de agua destilada
Calentar hasta ebullición para disolver completamente
Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos
Dejar enfriar entre 45 y 50° C
Vaciar en cajas de Petri.

BAC Y MIC – 4 Agar verde brillante.

Suspender 58 g en un litro de agua destilada y dejar reposar 15 minutos.
Calentar con agitación frecuente.
Hervir durante un minuto.
Esterilizar a 121° C durante 15 minutos.
Dejar enfriar hasta 50° C aproximadamente.
Vaciar en cajas de Petri estériles.

BAC Y MIC 4.0 Citrato de Simmons.

Suspender 24.2 g del medio en un litro de agua destilada
Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución.
Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm.
Esterilizar a 121° C durante 15 minutos.
Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

BAC Y MIC – 4 Agar hierro y lisina (LIA).

Suspender 33 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada
Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución.
Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml., en tubos con tapón de rosa de 13 x 100 mm.
Esterilizar a 121° C durante 12 minutos.
Dejar solidificar en posición inclinada.

BAC Y MIC – 4 Agar hierro y triple azúcar

Suspender 59.4 g del medio en un litro de agua destilada
Dejar reposar de 10 a 15 minutos.
Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución
Distribuir volúmenes de 4 ml en tubos de 13 x 100 mm.
Esterilizar a 118° C durante 15 minutos.
Enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.

BAC Y MIC – 4 Base de caldo rojo de fenol con sacarosa.

Suspender y disolver completamente 15 g del polvo en un litro de agua destilada.

Se le agrega de 5 a 10 % de sacarosa.
Se distribuyen volúmenes de 2 a 3 ml del medio en tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
Esterilizar en autoclave a 116° C durante 15 minutos.

BAC Y MIC – 4 Gelatina nutritiva.

Suspender 128 g del medio en un litro de agua destilada-
Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución
Distribuir volúmenes de 3 ml del medio en tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
Esterilizar en autoclave a 121° C. durante 15 minutos.
Dejar enfriar en posición vertical.

BAC Y MIC – 5 Caldo de Mueller-Hinton.

Suspender 22 g del polvo en un litro de agua destilada.
Calentar con agitación frecuente hasta disolver completamente.
Esterilizar en autoclave de 116 a 121° C durante 10 minutos. No sobrecalentar.
Distribuir en tubos de 16 x 150 mm.

BAC Y MIC – 5 Agar de Müller-Hinton.

Suspender 38 g del polvo en un litro de agua destilada.
Mezclar bien agitando frecuentemente.
Hervir durante un minuto y esterilizar a 121° C durante 15 minutos.
Enfriar de 45 a 50° C y vaciar en cajas de Petri.

BAC Y MIC – 2, 3, 6 y 11 Agar dextrosa Sabouraud.

Suspender 65 g del medio en un litro de agua destilada.
Mezclar bien, agitando frecuentemente.
Hervir durante un minuto y esterilizar a 118° C durante 15 minutos.
Enfriar de 45 a 50° C y vaciar en cajas de Petri.

7.3 Preparación de soluciones y reactivos.

BAC Y MIC – 3, 4, 5, 7, 9 y 11 Reactivos para la tinción de Gram

Se obtienen comercialmente

BAC Y MIC – 3, 4, 5, 7, 9 y 11 Alcohol-acetona

Alcohol etílico al 95%

Acetona

Mezclar el alcohol etílico al 95 % y acetona en partes iguales

BAC Y MIC – 6 Hidróxido de potasio al 3%.

Pesar 3g de hidróxido de potasio y disolver en 100ml de agua destilada

BAC Y MIC – 8 Tinción para cápsula (tinción de Maneval)

Colorante primario (Maneval A) solución acuosa de rojo congo al 1%

Colorante de contraste (Maneval B)

Solución acuosa de fenol al 5% 30ml

Solución acuosa de ácido acético glacial al 20% 10 ml
Solución acuosa de cloruro férrico al 30% 4 ml
Solución acuosa de fucsina ácida al 1%.....2ml

BAC Y MIC – 10 Reactivos para la tinción de Ziehl - Neelsen

Colorantes primarios

SOLUCIÓN A:

Fucsina básica.....3.0g
Alcohol etílico.....10 ml

SOLUCIÓN B:

Fenol 5 g
Agua destilada 95 ml

Mezclar las soluciones A y B y filtrar.

2. Decolorante

Ácido clorhídrico concentrado 3.2 ml
Alcohol etílico al 95%..... 9.7 ml

3. Colorante de contraste

SOLUCIÓN A:

Azul de metileno 0.3 g
Alcohol etílico al 95% 30 ml

SOLUCIÓN B:

Hidróxido de potasio 0.01 g
Agua destilada 100 ml

Mezclar las soluciones A y B

BAC Y MIC – 6 y 11 Tinción para esporas (Schaeffer y Fulton)

Colorante primario (Fulton A), solución acuosa de verde malaquita al 5%

Colorante de contraste (Fulton B) solución acuosa de safranina al 5%

BAC Y MIC – 4 Reactivo de Erlich/Kovac.

p- dimetil amino benzaldehído5.0 g
Alcohol amílico o isoamílico.....75 ml
Ácido clorhídrico concentrado..... 25 ml

Pesar el reactivo y agregar el alcohol isoamílico. Agitar hasta disolución completa y adicionar el ácido clorhídrico. El reactivo tiene un color ligeramente amarillo.

BAC Y MIC – 4 Reactivo para la oxidasa. (4 N' tetrametilparafeniléndiamina).

Clorhidrato de N, N, N', N' – tetrametil-p-fenilendiamina.....0.1 g
Agua
destilada.....10 ml

Pesar el reactivo y agregar el agua recién destilada, agitando hasta completa disolución. Guardar la solución en frasco ámbar a una temperatura de 2 a 8° C, máximo dos días. Impregnar discos de papel filtro y dejarlos secar para realizar la prueba o bien, utilizarlo para colocarlos sobre el crecimiento bacteriano directamente.

BAC Y MIC – 5 y 11 Preparación de la escala de McFarland.

Preparar los tubos mezclando ácido sulfúrico al 1% con cloruro de bario al 1% de acuerdo a la siguiente tabla:

“Tubo McFarland”	H ₂ SO ₄ 1% ml	BaCl ₂ 1%	Densidad correspondiente x 10 ⁶	Bacteriana
0.5	9.95	0.05	150	
1	9.9	0.1	300	
2	9.8	0.2	600	
3	9.7	0.3	900	
4	9.6	0.4	1200	
5	9.5	0.5	1500	
6	9.4	0.6	1800	
7	9.3	0.7	2100	
8	9.2	0.8	2400	
9	9.1	0.9	2700	
10	9.0	1.0	3000	

Tape los tubos con tapones de caucho y selle con parafina. Guárdelos en posición vertical y protegidos de la luz.

Nota: Los estándares de arriba se usan para determinar la densidad bacteriana en solución salina. Si se va estimar la densidad bacteriana en caldo, debe disolverse el ácido sulfúrico y cloruro de bario en caldo estéril.

BAC Y MIC – 3, 4, 5 y 11 Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio 0.85g

Disolver el cloruro de sodio en 100ml de agua destilada

BAC Y MIC – 6 y 11 preparación de lactofenol azul de algodón.

Fenol cristales 20 g

Ácido láctico 20 g

Glicerina 40 g

Agua destilada 20 ml

Disolver estos componentes calentando suavemente en un baño de vapor. Agregar 0.05 g de colorante azul de algodón.

BAC Y MIC – 1 y 2 Formol al 10%.

Se miden 285 ml de formol al 35 % y se aforan a un litro de agua destilada.

7.4 Cuadros.

Cuadro No. 1 REACCIONES DE LA FAMILIA ENTEROBACTERACEAE EN TSI

Género y/o especie	Superficie	Picadura	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	A (K)	A	+(-)	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella Typha</i>	K	A	-	+
Otras salmonelas	K	A	+	+++
<i>Arizona</i>	K	A	+	+++
<i>Citrobacter freundii</i>	K(A)	A	+	+++
<i>C. diversus</i>	K(A)	A	+	-
<i>Edwardsiella</i>	K	A	+	+++
<i>Klebsiella</i>	A	A	++	-
<i>Enterobacter</i>	A	A	++	-
<i>Hafnia alves</i>	A	A	+	-
<i>Serratia</i>	A(K)	A	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	A(K)	A	+	+++
<i>P. mirabilis</i>	A(K)	A	+	+++
<i>Morganella morganii</i>	K	A	-(+)	-
<i>Providencia</i>	K	A	-o-	-
<i>P. rettgeri</i>	K	A	-	-

Cuadro No. 2 Reacciones de la familia Enterobacteriaceae en medio LIA.

Género y/o especie	Superficie	Picadura	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	K	K o N	- o +	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella</i>	K	K o N	-	+ (-)
<i>S. Typhi</i>	K	K	-	+ (-)
<i>Paratyphi-A</i>	K	A	+ o -	- o +
<i>Arizona</i>	K	K o A	-	+ (-)
<i>Citrobacter freundii</i>	K	A	- o +	+ o -
<i>C. diversus</i>	K	A	- o +	-
<i>Edwardsiella</i>	K	K	- o +	+
<i>Klebsiella</i>	K o N	K o N	+ o -	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	K o N	A	+ o -	-
<i>E. aerogenes</i>	K	K o N	+ (-)	-
<i>Hafnia alves</i>	K	K o N	- o +	-
<i>Serratia</i>	K o N	K o N	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	R	A	-	-(+)
<i>P. mirabilis</i>	R	A	-	-
<i>Morganella morganii</i>	K o R	A	-	-

<i>Providencia</i>	R	A	-	-
<i>P. rettgeri</i>	R	A	-	-

K = alcalino (rojo); **A**= Ácido (amarillo); ()= el símbolo en el paréntesis indica reacciones ocasionales

Cuadro No. 3 Reacciones de los *Staphylococcus*.

	S. Aureus	S. epidermidis	S. hyicus
Hemólisis	α o β	α	-
Coagulasa	+	-	V
Gelatinasa	+	-	+

+ = positivo

- = negativo

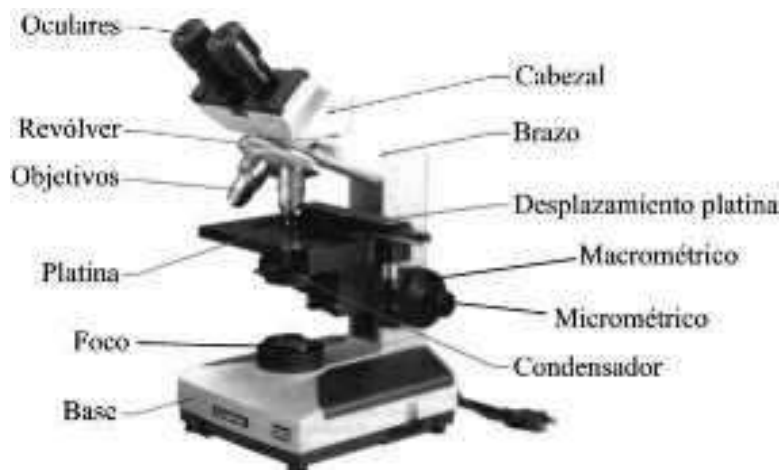
V= variable

7.5 Equipo.

BAC Y MIC - 3 Microscopio.

El microscopio compuesto es un instrumento óptico que se emplea para aumentar o ampliar las imágenes de objetos y organismos no visibles a simple vista. El microscopio óptico común está conformado por tres sistemas:

El sistema mecánico está constituido por una serie de piezas en las que van instaladas las lentes que permiten el movimiento para el enfoque. El sistema óptico comprende un conjunto de lentes dispuestas de tal manera que produce el aumento de las imágenes que se observan a través de ellas El sistema de iluminación comprende las partes del microscopio que reflejan, transmiten y regulan la cantidad de luz necesaria para efectuar la observación a través del microscopio. En los siguientes puntos describiremos cada uno de los sistemas nombrados, a fin de tener un conocimiento completo del microscopio.



Sistema óptico

OCULAR: Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.

OBJETIVO: Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.

CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.

DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

SOPORTE: Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.

PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.

CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular,

REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.

TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO COMPUESTO (ÓPTICO)

Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.

Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.

Comenzar la observación con el objetivo de 4x (ya está en posición) 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. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.

Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, 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. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

Empleo del objetivo de inmersión:

Bajar totalmente la platina.

Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.

Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x.

Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.

Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.

Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.

Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.

Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.

Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación. 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.

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.

No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).

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. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular. 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.

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.