



Universidad  
Continental

# **MIROBIOLOGÍA GENERAL**

---

**Guías de Laboratorio**

---



## **Visión**

Ser una de las 10 mejores universidades privadas del Perú al año 2020, reconocidos por nuestra excelencia académica y vocación de servicio, líderes en formación integral, con perspectiva global; promoviendo la competitividad del país.

## **Misión**

Somos una universidad privada, innovadora y comprometida con el desarrollo del Perú, que se dedica a formar personas competentes, íntegras y emprendedoras, con visión internacional; para que se conviertan en ciudadanos responsables e impulsen el desarrollo de sus comunidades, impartiendo experiencias de aprendizaje vivificantes e inspiradoras; y generando una alta valoración mutua entre todos los grupos de interés.

**Universidad Continental**

Material publicado con fines de estudio

Cód. ASUC 00989



## **BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

### **Concepto**

Conjunto de normas y procedimientos destinados a controlar los factores de riesgo biológico generados durante el proceso de atención al paciente y/o manipulación de fluidos biológicos en el laboratorio.

### **Factores ambientales**

1. Riesgos físicos
2. Riesgos químicos
3. Riesgos ergonómicos
4. Riesgos biológicos

### **Prevención de las infecciones**

Medidas asociadas principalmente a la colocación de barreras de contención entre el huésped y los microorganismos.

### **Variables de los riesgos de la salud**

1. Concentración del agente
2. Vía de ingreso
3. Tiempo de exposición
4. Variaciones individuales
5. Frecuencia de exposición
6. Exposición previa

### **Estrategias de prevención de las infecciones transmitidas por sangre, fluidos corporales y/o manipulación de microorganismos aislados**

1. Código de buenas practicas
2. Barreras naturales
3. Barreras químicas
4. Barreras físicas
5. Barreras biológicas

### **Precauciones universales de Bioseguridad**

1. Universidad: precauciones universales.
2. Colocación de barreras protectoras: clases de equipos de protección personal como guantes, mascarillas, anteojos, gorros, vestimenta espacial, botas y mandilones.



### Niveles de bioseguridad para agentes infecciosos

1. Nivel 1: agentes no patógenos para el hombre
2. Nivel 2: riesgo moderado y procedimientos de riesgo moderado
3. Nivel 3: agentes que pueden causar la muerte, o donde los procedimientos de Trabajo incluyen alto riesgo de infección (aerosoles)
4. Nivel 4: microorganismos exóticos y/o altamente peligrosos cuyo manipuleo, involucra alto riesgo para la vida. Trabajo con animales de experimentación.

### Evaluación de Seguridad y Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología

1. Aspectos administrativos
2. Actitudes personales
3. Equipos de Laboratorio e instalaciones
4. Desinfección y esterilización
5. Control de riesgos
6. Almacenamiento y manejo de químicos y gases
7. Precauciones de emergencia
8. Saneamiento del medio
9. Evaluación interna y externa con extinguidores.

### Estrategias:

- Establecer por escrito las normas de bioseguridad.
- Capacitar al personal a fin de que comprendan las reglas.
- Contar con un sistema de reporte de accidentes.
- Investigar cada accidente y realizar medidas correctivas.

### Del ambiente:

- Todo laboratorio debe estar adecuadamente ventilado e iluminado.
- Los servicios de agua, luz y gas deben funcionar correctamente.
- El área de trabajo debe estar ubicada lejos de la puerta y zonas con corriente de aire.
- Las mesas de trabajo deben de ser de material liso, impermeable y resistente a sustancias corrosivas.
- Limpiar mesas, pisos y paredes de trabajo sin levantar polvo.
- Al sistema de desagüe solo se eliminará material descontaminado o neutralizado.
- Realizar fumigación periódica.
- Contar con extinguidores.
- Las puertas de todo laboratorio debe contar con la señal de alto riesgo

### Del personal:

- Deben estar entrenados en los procedimientos y precauciones.
- Deben someterse periódicamente a un examen médico completo.
- Contar inmunizaciones contra Tétanos , Difteria, Hepatitis B y otras como Antirrábica y fiebre amarilla.



- Evitar el ingreso de personal no autorizado.

**Del vestido:**

- Usar mandil de manga larga.
- No usar el mandil fuera del ambiente de laboratorio.
- Usar gorro, anteojos, mascarillas y guantes
- Usar zapatos con planta de goma y que cubra de la exposición de ácidos

**De las muestras y su procesamiento:**

- Todas las muestras deben ser tratadas como altamente infecciosas.
- No tomar muestras de sangre usando solo agujas.
- No re encapsular las agujas manualmente.
- No ingerir ningún tipo de alimentos en las instalaciones.
- Secarse las manos con toallas descartables.
- Chequear correctamente las muestras antes de ser procesadas.
- Desinfectar el área de trabajo antes y después de trabajar.



## Índice

VISIÓN	2
MISIÓN	2
NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO	3
ÍNDICE	6
<b>Primera unidad</b>	
Manejo de equipos	7
Limpieza, desinfección y preparación del material para su desinfección.	16
Preparación de colorantes y reactivos	18
Manejo del Microscopio	23
<b>Segunda unidad</b>	
Coloraciones diferenciales	26
Preparación de medios de cultivo	30
Medios selectivos y diferenciales	34
Estudio de Staphylococcus	50
<b>Tercera unidad</b>	
Morfología, estructura vegetativa y reproducción de los hongos	54
Preparación de aclarantes , colorantes y desinfectantes	
Preparación de medios de cultivo	
Hongos ambientales Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Rhodotorula.	56
Estudio de Levaduras oportunistas: Candida y Cryptococcus.	
<b>Cuarta unidad</b>	
Recolección y preservación de las muestras fecales, reconocimiento de elementos normales y anormales en las muestras de heces	60
Métodos de diagnóstico de enteroparásitos; método directo	63
Métodos de diagnóstico de enteroparásitos; métodos de concentración	64
Métodos especiales para el diagnóstico de enteroparásitos: Test de Graham	66



# PRÁCTICA 1

## **INSTRUMENTACIÓN: Manejo de equipos**

En esta práctica se da a conocer al estudiante el manejo y principios de algunos equipos que se utilizan en el laboratorio de microbiología.

### **I. MICROSCOPIO DE LUZ (ver esquema)**

El microscopio es uno de los instrumentos más frecuentemente usados en el laboratorio. Está compuesto básicamente por:

- El sistema óptico
- El sistema de iluminación
- El sistema de ajuste

#### **El sistema óptico:**

**1.- Los objetivos:** Se encuentran entornillados al revólver. Son las lentes principales y están compuestos a su vez de una serie de lentes. Se distinguen según sus equivalentes de distancia focal. Los microscopios están provistos de 3-4 objetivos de bajo poder o secos 5x, 10x y 40x y el objetivo de inmersión 90x o 100x. La apertura numérica (AN) se encuentra grabada en el tubo del objetivo, a mayor AN mayor es el poder de resolución (capacidad de hacer perceptibles detalles adyacentes muy cercanos, separándolos y acercándolos).

**2.- El ocular:** Lente que amplifica la imagen formada por el objetivo. El microscopio debe estar provisto de dos oculares de preferencia de 10x y 5x.

**3.- El condensador:** Su misión es concentrar la luz sobre el objeto colocado sobre la platina, consiguiendo así una iluminación adecuad. Se construyen generalmente con un sistema de dos lentes y tienen un diafragma, el cual permite reducir o ampliar al ángulo y por lo tanto la cantidad de luz que entra en el condensador.

Son comúnmente el tipo no acromático según la designación de Abbe; en los microscopios modernos se usan condensadores aplanáticos y acromáticos.

#### **El sistema de iluminación**

Se consigue mediante el espejo, el cual refleja la luz hacia el condensador. La fuente ideal de iluminación es la luz natural del día, empleándose en este caso el espejo plano, sin embargo se obtiene también una buena iluminación con una lámpara apropiada usando el espejo convexo.

Los microscopios binoculares y modernos cuentan con el sistema de iluminación incorporada.



## El sistema de ajuste

Este sistema comprende:

1. El tornillo macrométrico: Se utiliza para lograr la aproximación del enfoque.
2. El tornillo micrométrico: Permite que el objetivo se deslice lentamente. Se emplea para conseguir un enfoque perfecto del objeto.
3. El tornillo del condensador: Se utiliza para elevar el condensador y aumentar la iluminación o descenderlo y reducir la misma.
4. Los tornillos de centrado del condensador: Puede haber tres tornillos situados alrededor del condensador exactamente en relación con el objeto.
5. Reguladores de la platina: Se usan para mover la lámina portaobjeto hacia a derecha o izquierda, hacia delante o atrás.
6. El elevador del diafragma: Se encuentra fijo al condensador. Se puede cerrar o abrir el diafragma reduciendo el ángulo y la intensidad de la luz.

## II. HORNO (ver figura)

En cualquier proceso de esterilización por el calor es absolutamente esencial que el objeto sea calentado por todas partes por igual y que la temperatura de su “centro” sea sostenida a un grado bastante elevado para matar y destruir las bacterias tanto la forma vegetativa como esporulada.

El horno es un aparato de forma rectangular que posee paredes dobles revestidas de amianto o fibras de vidrio para mantener el calor generado. En el interior y en la parte exterior tiene orificios para la ventilación y un dispositivo donde se encuentra fijo el termómetro graduado hasta 200°C.

Se utiliza para la esterilización de material de vidrio como: placas Petri: tubos, pipetas e instrumentos metálicos.

### Funcionamiento

1. El material que se esteriliza en el horno debe estar completamente seco.
2. Se coloca en canastillas o recipientes y se deja durante 1 hora a 170 – 180°C
3. Transcurrido dicho tiempo, se deja enfriar el horno por sí solo, ya que la apertura del aparato caliente produce rotura o daño del material por el cambio brusco de temperatura.

## III. AUTOCLAVE (ver esquema)

El autoclave provee un medio eficaz y práctico de esterilización, por cuanto destruye tanto las formas vegetativas como esporuladas, en un tiempo comprendido entre 15 a 30 minutos. Como se sabe el agua hierve a 100°C según la presión atmosférica, pero si se aumenta esta, la temperatura será más alta, lo que se logra con el autoclave.

### Componentes del autoclave

1. Caldera: Consiste en un cilindro amplio y profundo de paredes muy gruesas.
2. Canasta: Es un cilindro de paredes delgadas donde se coloca el material a esterilizar





3. Soporte de la canasta: Se encuentra en el fondo del autoclave y sostiene la canasta por encima del nivel del agua.
4. Drenaje: Llave de paso colocada en la base de la caldera, por donde sale el exceso de agua.
5. Tapa: Esta cubre y cierra herméticamente la caldera, se ajusta mediante una arandela de jebe.
6. Sujetadores de la tapa: Se encuentran fijos a la caldera y conjuntamente con la arandela de jebe cierran herméticamente la tapa e impiden el escape del vapor.
7. Válvula de salida del aire: Se encuentra en la parte superior de la tapa, se emplea para dejar que salga el aire cuando empieza el agua a calentarse.
8. Válvula de seguridad: Esta válvula deja escapar el vapor cuando la presión se eleva demasiado, evitando que ocurra una explosión.
9. Manómetro: Se ubica en la parte superior de la tapa, indica las libras de presión de vapor de agua.
10. Termómetro: Indica la temperatura en grados centígrados, se encuentra en la parte superior de la tapa.

### Funcionamiento

1. Llenar con agua el fondo del autoclave hasta el soporte de la canasta. Estar seguro que el agua no sobrepase ese nivel, si hay exceso eliminar a través del drenaje.
2. Introducir el material a esterilizar al autoclave, colocándolo sobre la canasta.
3. Cerrar la tapa del autoclave, atornillar los sujetadores a niveles iguales, con firmeza pero sin apretar demasiado.
4. Abrir la válvula de salida del aire.
5. Encender el mechero de gas o conectar la llave de corriente, para alentar el autoclave.
6. Vigilar la válvula de salida del aire hasta que aparezca un chorro de vapor. Dejar salir por 3 – 4 minutos hasta que este sea uniforme y continuo. Esto indicara que todo el aire ha sido reemplazado por vapor.
7. Cerrar la válvula de salida del aire, ajustar los sujetadores de la tapa y reducir la temperatura ligeramente.
8. Observar el manómetro (libras de presión) y el termómetro hasta ajustar a la temperatura deseada regulando el calor.
9. Una vez alcanzada la temperatura y presión necesaria, empezar a medir el tiempo.
10. Apagar la fuente de calor cumplido el tiempo.
11. Cuando la temperatura descienda a menos de 100°C abrir la salida del aire para igualar las presiones dentro y fuera del autoclave.
12. Cuando cese el silbido, aflojar los sujetadores de la tapa. Abrir la tapa y a continuación retirar el material estéril cuidadosamente.
13. Si se han formado gotas de agua sobre o dentro del material esterilizado, secarlos en una estufa a 37°C.



EQUIVALENCIA DE LIBRAS DE PRESION Y GRADOS CENTIGRADOS

Presión manométrica	Termómetro
Libra/pulg	
5	108°C
10	116°C
15	121°C
20	127°C

IV. FILTROS (ver esquema)

El pase a través de filtros constituye el único proceso de esterilización para diversos productos o medios de cultivo, que sufrirían alteraciones en sus características por la acción del calor húmedo (autoclave), principalmente suero sanguíneo, líquido ascítico, enzimas, toxinas y otros.

Existen varios tipos de filtros bacteriológicos:

- Chamberland – Pasteur, fabricados de porcelana (caolín - cuarzo)
- Berkefeld, preparado con tierra de diatomeas.
- Seitz, elaboradas de asbesto prensado en discos de reducido espesor con dos porosidades: clarificante y esterilizante.
- De vidrio poroso, preparado aglutinado vidrio finamente pulverizado.
- Ultra filtros: fabricados a base de colodión.
- De ester celulosa hay dos tipos: Milipore, en discos de 150 u de espesor y con 11 diferentes porosidades y el pilipore, con poros desde 4 mu hasta 100 mu.

El frasco de vidrio utilizado para filtrar se denomina Kitasato, el cual tiene una tubuladura lateral para ser conectada a la manguera de la bomba de vacío.

En la boca de Kitasato se coloca el conjunto tapón – soporte dentro del cual se encuentra la membrana de filtro.

Todo este conjunto debe esterilizarse al autoclave (121°C por 15 minutos) antes de su uso.

**Procedimiento de filtración**

1. Verter la sustancia a filtrar en el cilindro metálico que tiene en su base la membrana del filtro.
2. La tubuladura lateral del kitasato provista de un tapón de algodón, es conectada a la manguera de la bomba de vacío.



El vacío utilizado no debe ser muy fuerte para que la filtración no sea tan rápida.

3. El líquido filtra a través del filtro de Kitasato, por acción de la presión de aire originada por efecto del vacío.
4. Terminada la filtración, apagar primero la bomba, luego retirar con mucho cuidado la manguera conectada a la tubuladura del Kitasato, evitando de quitar el tapón de algodón.
5. Retirar el conjunto tapón-soporte-filtro dentro del cubículo, y realizar la transferencia del material esterilizado dentro del mismo.

#### V. LUZ O RAYO ULTRAVIOLETA

La luz ultravioleta es un agente bactericida, siendo su longitud de onda más efectiva entre 2500 y 3200 Å. Las radiaciones determinan cambios fotoquímicos al ser absorbidos por las proteínas y los ácidos nucleicos, interfiriendo en la replicación del DNA de los microorganismos.

La luz ultravioleta tiene escasa capacidad de penetración por lo que se aplica sobre superficies. Su acción sobre los microorganismos depende de la longitud de onda, de la intensidad y de la duración de su aplicación.

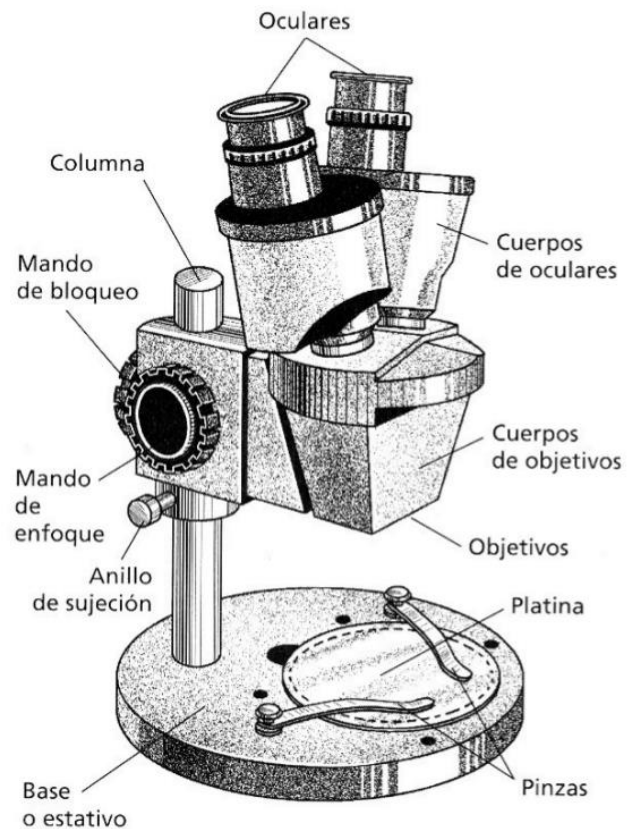
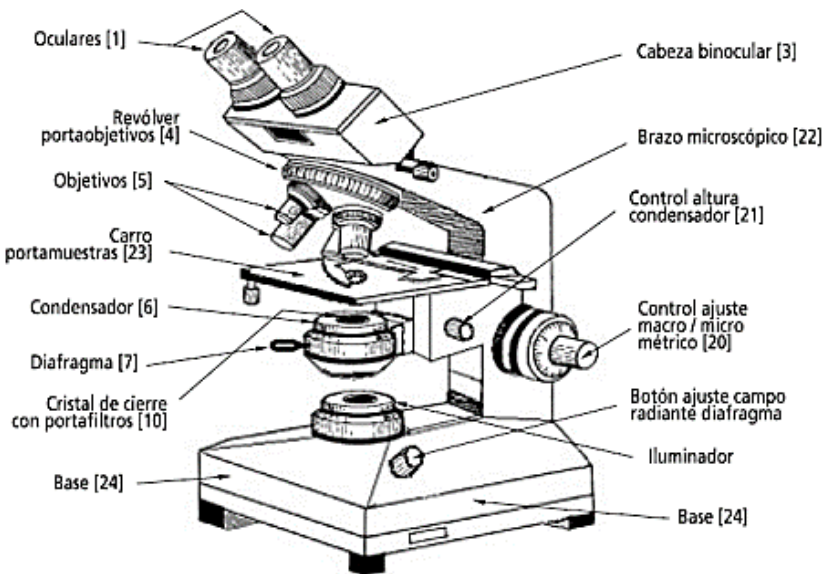
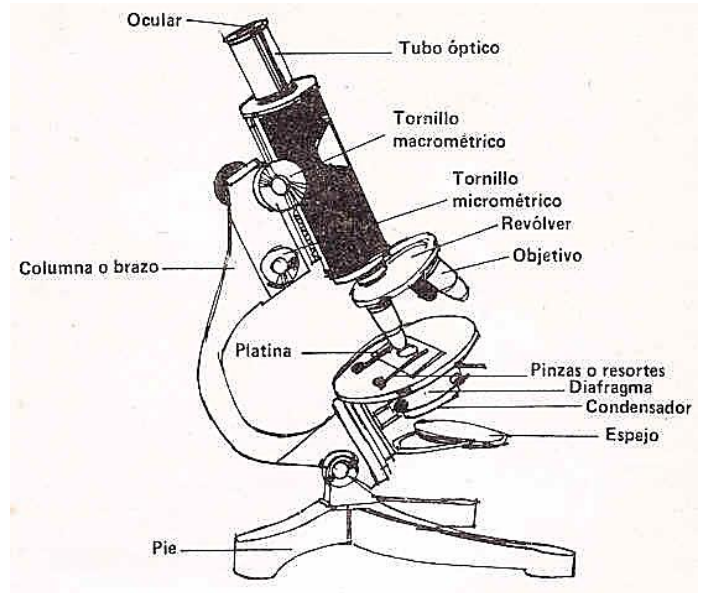
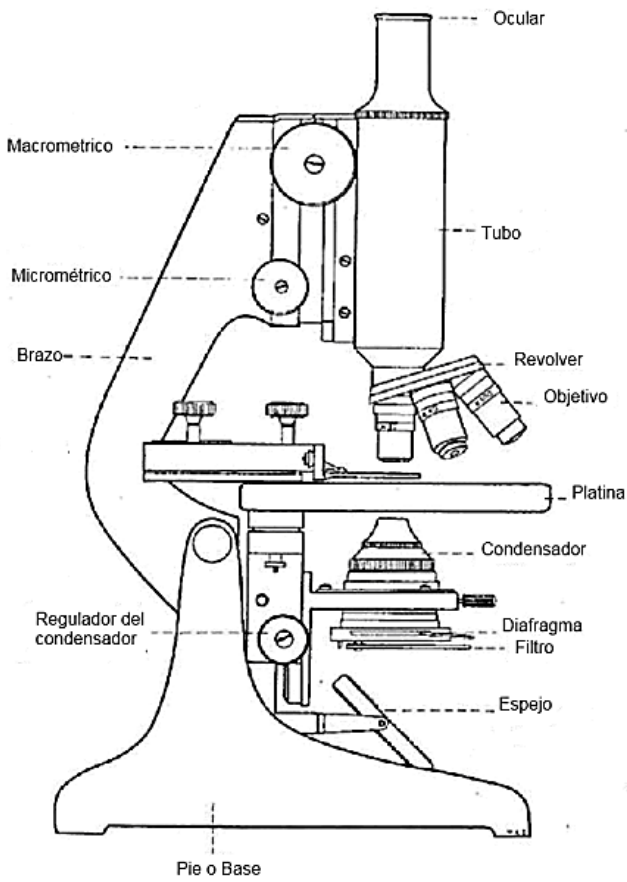
$$\text{Dosis de radiación} = \frac{\text{Energía UV}}{\text{Área irradiada}} \times \frac{\text{Tiempo UV Sec}}{\text{cm}}$$

Su aplicación está limitada para la inactivación de microorganismos en la preparación de vacunas en la esterilización de ambientes (quirófanos, salas de hospitales) y en aire suministrado a los laboratorios.

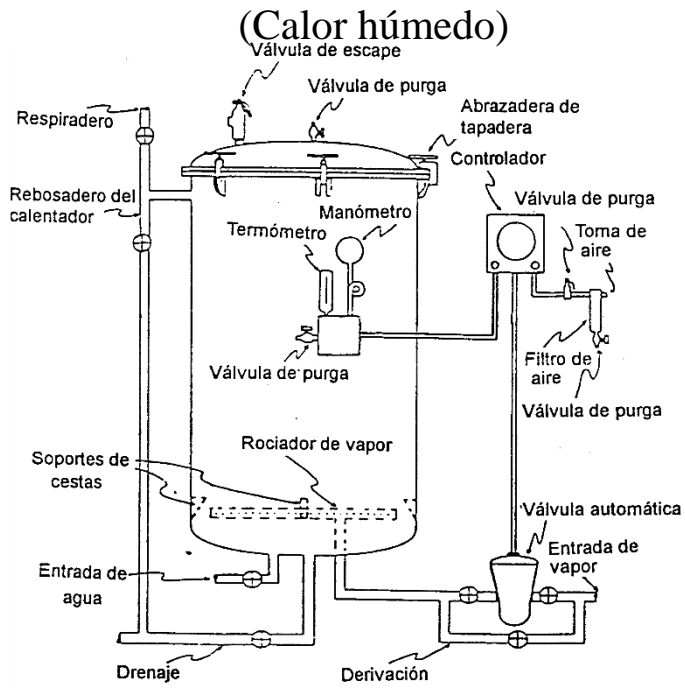
Se emplean comúnmente lámparas de arco de vapor mercurial que emiten luz de una longitud de onda de 2537 Å.



# MICROSCOPIO COMPUESTO



## Autoclave Vertical



## Estufa (Calor seco)



## CRISTALERIA Y OTRO MATERIALES

<p>Mechero de Bunsen (llama fuerte)</p>	<p>Mechero de Bunsen</p>	<p>Mechero de Meker</p>	<p>Trípode con tapa de amianto</p>
<p>Lámpara de alcohol</p>	<p>Porta tubos de madera</p>	<p>Pinzas para portaobjetos</p>	<p>Mortero de mano</p>
<p>Cronómetro</p>	<p>Frascos goteros</p>	<p>Frasco de lavado</p>	<p>Termómetro</p>

## CRISTALERÍA Y OTROS APARATOS PEQUEÑOS

			
<p>Vaso de precipitación</p>	<p>Matraz de Erlenmeyer</p>	<p>Matraz de fondo plano (matraz de Florencia)</p>	<p>Matraz de fondo redondo</p>
			
<p>Vaso cónico para análisis</p>	<p>Embudo para filtro de papel</p>	<p>Plato para evaporaciones</p>	<p>Plato cóncavo de cristal</p>
			
<p>Tubo de ensayo</p>	<p>Tubo de precipitación o de Kahn</p>	<p>Tubo redondo para centrifuga</p>	<p>Tubo cónico para centrifuga</p>
			
<p>Placa de Petri</p>	<p>Cristalizador</p>	<p>Secador</p>	<p>Cubeta para tinciones</p>



## PRÁCTICA N° 2

### LIMPIEZA, DESINFECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA SU ESTERILIZACIÓN

#### INTRODUCCION

El material de laboratorio (cristalería) ya sean limpios o usados, deben de limpiarse de tal forma se elimine toda huella de suciedad, para evitar la precipitación o depósito de los agentes limpiadores.

Las muestras utilizadas en el laboratorio (heces, esputo, orina, pus, etc.) frecuentemente son infectados por lo que se recomienda utilizar recipientes desechables o en todo caso los recipientes deben descontaminarse adecuadamente antes de su limpieza.

Todo material limpio antes de ser utilizado debe esterilizarse para conservar la pureza de la muestra y de los cultivos.

#### I. PROCEDIMIENTOS PARA LA LIMPIEZA, DESCONTAMINACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL.

##### A. RECIPIENTES DE VIDRIO NUEVOS (MATRACES, TUBOS, PLACAS, FRASCOS, ETC.)

Los utensilios de vidrio que nunca se utilizaron son ligeramente alcalinos, para neutralizarlos se debe seguir el siguiente procedimiento:

1. Colocar en una cubeta grande una solución de HC1 al 2%
2. Sumergir el material y dejar por 24 horas.
3. Enjuagar 2 veces con agua corriente y luego con agua desmineralizada.
4. Dejar secar.

Para la esterilización del material:

1. Si se trata de tubos o frascos de boca angosta preparar tapones de algodón, cubrir con papel Kraft o periódico y asegurar con una pita.
2. Si se trata de placas Petri cubrirlas completamente con papel Kraft para protegerlas del Medio Ambiente.

##### B. RECIPIENTES SUCIOS DE VIDRIO

Como los frascos, matraces, placas, tubos, etc. contienen materias infecciosas (heces, esputo, LCR, orina, etc.) para la descontaminación existen varios procedimientos.

#### 1. Uso del autoclave

1. Colocar el material en el autoclave durante 15 minutos a 121°C.
2. Una vez que se haya enfriado el material, vaciar el contenido de este en el fregadero.
3. Lavar con agua y detergente, previo remojo de 2 – 3 horas.
4. Enjuagar con agua corriente a chorro continuo, luego dejar en remojo con agua limpia durante 30 minutos, volver a enjuagar con agua limpia y finalmente con agua desmineralizada.





5. Secar los utensilios si es posible en un horno a 50°C.
2. Recipientes con orina
  1. Vaciar el contenido de los recipientes al fregadero
  2. Llenar los recipientes de lejía al 10% o fenol al 2%, dejar en reposo durante 24 horas.
  3. Para la limpieza seguir los procedimientos indicados.
4. Tubos con sangre:
  1. Los tubos con sangre, añadir una solución de lejía al 10% durante 12 horas, enjuagarlos y limpiar.

### C. LAMINAS PORTAOBJETOS

#### Portaobjetos nuevos

1. En un recipiente con agua añadir detergente, colocar las láminas y dejar toda la noche.
2. Enjuagar cada portaobjeto con agua corriente a chorro continuo hasta eliminar completamente el detergente.
3. Secar las láminas una por una con un trapo suave que no desprenda pelusa. Posteriormente examinarlos, si se observa trazos de grasa, limpiar con alcohol 70°.

#### Portaobjetos cubiertos con laminillas

1. Con ayuda de una pinza separar la laminilla o cubre objeto y depositarlo en un recipiente que contenga agua con detergente y un desinfectante (lejía, fenol u otros), dejar reposar 2 a 3 horas.
2. Enjuagar por lo menos 4 veces el recipiente con agua corriente agitando suavemente.
3. Dar un último enjuague con agua desmineralizada
4. Escurrir cada uno de los cubreobjetos y colocarlos sobre un pedazo de gasa doblada.
5. Conservar e una placa pequeña o en sus respectivas cajitas.



## PRÁCTICA N° 3

### PREPARACION DE COLORANTES Y REACTIVOS

En la preparación de colorantes se debe verificar si estos se disuelven en soluciones acuosas o alcohólicas, o si el pH del agua alterará el resultado de la coloración, también es necesario conocer si el recipiente en el cual se conserve debe ser oscuro.

Además se requiere tener información sobre el tiempo de preparación antes de su uso, ya que ciertos colorantes no pueden usarse inmediatamente después de su preparación.

Todos los reactivos para tinción deberán conservarse en frascos de cristal perfectamente tapados y protegidos de la luz solar directa.

No deberán colocarse cerca de ácidos concentrados o amoníaco. El agua destilada para los reactivos deberá ser de reciente preparación y tener reacción neutra.

#### 1. COLORACION AZUL DE METILENO DE LOEFFLER

##### SOLUCION A:

Azul de metileno..... 0.3 g

Etanol..... 30 ml

##### SOLUCION B:

Hidróxido de potasio..... 0.01 g

Agua destilada..... 100 ml

Mezclar ambas soluciones y filtrar antes de su uso.

#### 2. COLORACION CON CRISTAL VIOLETA

Cristal Violeta..... 1 g

Agua destilada..... 100 ml

Mesclar y disolver

#### 3. COLORACION CON VERDE DE MALAQUITA

Verde de malaquita..... 5 g

Agua destilada..... 100 ml

Mezclar y disolver



#### 4. COLORACION CON FUCSINA BASICA

Fucsina básica..... 5 g

Agua destilada..... 100 ml

Mezclar y disolver

#### 5. COLORACION GRAM (Modificación de Kopeloff)

##### a. Cristal violeta o violeta de genciana:

- Cristal violeta..... 1 g
- Agua destilada..... 100 ml

Mezclar y disolver

##### b. Bicarbonato de sodio:

- Bicarbonato de sodio..... 5g
- Agua destilada..... 100 ml

Mezclar y disolver

##### c. Alcohol – acetona:

Mezclar el alcohol con la acetona V/V

##### d. Lugol:

- Yodo de cristales..... 1 g
- Yoduro de potasio..... 3 g
- Agua destilada..... 100 ml

Pulverizar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio seco, añade agua poco a poco hasta disolver. Mezclar esta solución en un frasco de vidrio oscuro con el resto del agua destilada.

##### e. Fucsina básica:

- Fucsina básica..... 0.1 g
- Agua destilada..... 100 ml

Mezclar y disolver

#### 6. COLORACION ZIEHL NEELSEN

##### 1. Fucsina fenicada

###### SOLUCION A:

- Fucsina básica..... 1 g
- Etanol 95%..... 10 ml

Disolver y dejar reposar a 37°C por 24 horas

###### SOLUCION B

- Fenol en cristales..... 5g
- Agua destilada..... 95 ml

Mezclar y disolver

Mezclar 1 ml de la solución A con 9 ml de la solución B.

##### 2. Alcohol – ácido



- Ácido clorhídrico..... 3 ml
  - Etanol 95%..... 97 ml
3. Azul de metileno
- Azul de metileno..... 1 g
  - Agua destilada..... 99 ml
- Mezclar y disolver
7. COLORACION DE KINYOUN, FUCSINA FENICADA
- Fucsina básica..... 4 g
  - Fenol..... 8 g
  - Etanol al 95%..... 20 ml
  - Agua destilada..... 100 ml
- Disolver la fucsina básica en el alcohol y agregar lentamente el agua, agitando al mismo tiempo. Derretir el fenol en baño maría a 56°C y agregar 8 ml al colorante.
8. TINCION DE WAYSON
- SOLUCION A1:
- Fucsina básica..... 0.2 g
  - Metanol anhidro..... 10 ml
- SOLUCION A2:
- Azul de metileno..... 0.7 g
  - Metanol anhidro..... 10 ml
- Combinar las dos soluciones A
- SOLUCION B:
- Fenol..... 10 ml
  - Agua destilada..... 200 ml
- Disolver el fenol en baño maría a 56°C y agregar lentamente el agua.
- Mezclar la solución A con la solución B. Guardar en un frasco oscuro
9. COLORACION DE WIRTZ CONKLIN
1. Verde de Malaquita
- Verde de malaquita..... 5 g
  - Agua destilada..... 100 ml
2. Safranina
- Safranina..... 0.5 g
  - Agua destilada..... 100 ml
- Mezclar y disolver
10. COLORACION DE HISS
1. Fucsina básica:
- Fucsina básica..... 0.3 g
  - Agua destilada..... 100 ml



Mezclar y disolver

2. Sulfato de cobre:

- Sulfato de cobre..... 20 g
- Agua destilada..... 100 ml

11. COLORACION DE ALBERT

1. Azul de Toluidina (solución I)

- Azul de toluidina..... 0.75 g
- Verde de malaquita..... 1.0 g
- Ácido acético..... 5 ml
- Etanol 95%..... 10 ml
- Agua destilada..... 500 ml

2. Solución de Yodo – Yodura (Solución II)

- Yodo metálico..... 2 g
- Yoduro de Potasio..... 3 g
- Agua destilada..... 300 ml

Mezclar y disolver. Conservar en frasco ámbar.

12. OXIDASA

SOLUCION A:

- Alfa naftol..... 5 g
- Etanol absoluto..... 100 ml

SOLUCION B:

- N.N dimethyl – p-phenylendiamonium chloride..... 0.5 g
- Agua destilada..... 50 ml

Mezclar la solución A + B V/V

13. INDOL (según Kovacs)

- p-dimethylaminobenzaldehido..... 5 g
- Alcohol amílico..... 75 ml
- Ácido clorhídrico concentrado..... 25 ml

Disolver el aldehído con el alcohol y agregar lentamente el ácido. Preparar en pequeñas cantidades y guardarlas en refrigeración hasta su uso.

14. VOGES PROSKAUER

SOLUCION A:

- Alfa naftol..... 5 g
- Etanol absoluto..... 100 ml

SOLUCION B:

- Hidróxido de potasio..... 40 g
- Agua destilada..... 100 ml



15. ROJO DE METILO

- Rojo de metilo..... 0.1 g
- Etanol al 95%..... 300 ml
- Agua destilada..... 200 ml

16. CATALASA

- Peróxido de hidrógeno al 30%..... 3 ml
- Agua destilada..... 100 ml

17. ACIDO CLORHIDRICO 1 N

- Ácido clorhídrico..... 36 ml
- Agua destilada..... 964 ml

18. HIDROXIDO DE SODIO 1 N

- Hidróxido de sodio..... 40 ml
- Agua destilada.....960 ml

19. INDICADOR DE ANDRADE

- Agua destilada..... 100 ml
- Fucsina ácida..... 0.5 g
- NaOH 1N..... 16 ml

20. REACTIVO PARA PRUEBA DE NIACINA

- 4% de anilina en etanol al 95% o 1.5% de O- Toluidina en etanol al 95%.
  - 10% de solución acuosa de bromuro de cianógeno
- Conservar a 4°C hasta 2 semanas

La solución de bromuro de cianógeno es altamente tóxica y debe ser tratada con un volumen igual de NaOH 10N antes de desecharla.

21. REACTIVOS PARA PRUEBAS DE NITRITOS

SOLUCION A:

- 0.8% de ácido sulfamílico en ácido acético 5N disolver con ligero calentamiento.

SOLUCION B:

- 0.6% dimetil naftilamina en ácido acético de 5N
- 10% de polvo de Zinc suspenderlo en solución de meticelulosa.

NOTA: La alfa – naftilamina es carcinogénica y deberá manejarse con cuidado.



## PRÁCTICA N° 4

### MANEJO DEL MICROSCOPIO, ASA DE SIEMBRA OBSERVACION DE LAMINAS COLOREADAS, EXAMEN EN FRESCO

#### INTRODUCCIÓN

Muchas de las enfermedades infecciosas son transmisibles y se propagan por gérmenes que pueden ser observados con el microscopio óptico. Un microscopio debe manejarse y conservarse de manera adecuada.

NOTA: ver practica N° 1 para las partes del microscopio.

#### I. MANEJO DEL MICROSCOPIO

1. Colocar el microscopio sobre una mesa firme, de nivel uniforme, si se va utilizar iluminación eléctrica, el microscopio debe estar en la sombra, lejos de las ventanas.
2. Empleo del objeto seco de bajo poder (5x o 10x).
  - Descienda el condensador completamente.
  - Descienda el objetivo hasta el portaobjeto.
  - Mediante la cremallera avance rápido y eleve el objetivo hasta observar una imagen clara a través del ocular.

NOTA: Estos objetivos sirven para hacer una observación panorámica y focalizar lo que se desea observar. Se puede utilizar para observaciones directas en fresco.

3. Empleo del objetivo seco de gran poder (40x)
  - Bajar el condensador a la mitad de distancia que recorre.
  - Descender el objetivo hasta el portaobjeto (la distancia de operación es aproximadamente de 0.5 mm).
  - Elevar el objetivo lentamente hasta obtener una imagen borrosa en el campo del microscopio.
  - Buscar el enfoque con el microscopio.
  - Elevar el condensador hasta obtener la suficiente iluminación.

NOTA: Pueden observarse preparaciones de muestras directas en fresco, bacterias en movimiento, parásitos hongos, etc.

4. El empleo del objetivo de inmersión (90 – 100x)
  - Elevar el condensador totalmente.
  - Abrir el diafragma.
  - Descender el objetivo de 90 – 100x hasta que se ponga en contacto con la gota de aceite que tiene la lámina portaobjeto (evite presionar la preparación).
  - Utilizar el micrómetro para focalizar la imagen.

NOTA: Se debe utilizar las preparaciones teñidas completamente secas.



## CONSERVACION DEL MICROSCOPIO

1. Limpieza de los objetivos secos:
  - Con un trapo suave, limpie los objetivos moviendo de un lado a otro.
2. Limpieza del objetivo de inmersión
  - Quitar el aceite con papel absorbente ligeramente humedecido en xilol o tolueno, finalmente limpiar el lente con papel seco.
3. No dejar los microscopios sin oculares, ni objetivos.
4. Al terminar el trabajo limpiar el microscopio.
5. Transportar el microscopio con ambas manos, una en el pie y la otra en el asa del microscopio.

## MANEJO DEL ASA DE SIEMBRA

1. El asa de KOLLE o asa de SIEMBRA, debe esterilizarse antes y después de cada contacto con los microbios.
2. Si se trabaja con material viscoso, secar previamente el asa de la parte central azul de la llamas, para evitar la proyección de partículas, luego esterilizarla en las llamas rojas en posición vertical.
3. Por ningún motivo dejar el asa de siembra sobre la mesa sin haberla flameado previamente.

## II. OBSERVACION DE LAMINAS

### Introducción

El examen directo constituye una manera eficiente de estudiar la presencia de bacterias en medios biológicos que normalmente son estériles (LCR, líquido pleural, etc.) y en muestras de otros orígenes.

El examen directo puede ser: 1) en fresco.; 2) mediante frotices coloreados.

### 1. EXAMEN DIRECTO EN FRESCO

#### Material

- Laminas portaobjetos
- Laminillas cubreobjetos
- Muestra (LCR, sedimento e orina, suspensión de heces, secreciones, etc.)
- Pipetas Pasteur o asa de siembra

#### Procedimiento

1. Sobre la lámina portaobjeto depositar una gota de la muestra.
2. Cubrir con la laminilla
3. Observar con objetivo de 10x y 40x.

### 2. EXAMEN DE FROTICES COLOREADOS

#### Material

- Lamina portaobjeto
- Laminilla cubre objeto (en caso de montaje)





- Muestra (cultivo bacteriano, muestra patológicas).
- Asa de siembra
- Mechero

Procedimiento

1. Dividir la lámina en 3 partes: 1/3 para rotular el N° de muestra y 2/3 para la preparación del frotis.
2. Tomar una porción de la muestra con el asa de siembra estéril.
3. Colocar el asa sobre el portaobjeto y presionar ligeramente sobre este.
4. Mover el asa trazando un espiral del centro a la periferie.
5. Dejar cierta distancia entre el frotis y cada uno de los lados del portaobjeto.
6. Dejar secar la muestra completamente a temperatura ambiente o pasar 3 veces a través de la llama del mechero con el frotis hacia arriba.
7. Aplica la tinción.

## PROTOCOLO

OBSERVACION DE LAMINAS	
En Fresco	
Frotices	



## PRÁCTICA N° 5

### COLORACIONES DIFERENCIALES: Gram y Ziehl Neelsen

#### INTRODUCCIÓN

Los colorantes con compuestos químicos orgánicos que al unirse a la célula bacteriana van a permitir visualizar su morfología, paso inicial fundamental para llegar a la identificación final del microorganismo. Así todos los colorantes usados en microbiología son derivados del alquitrán. Todos poseen en su fórmula química al anillo benceno; la diferencia entre uno y otro colorante está en el número de anillos que posee, su disposición y la sustitución de los átomos de hidrógeno por otras moléculas.

Los colorantes se dividen en ácidos, básicos u neutros. En los colorantes ácidos (eosina, fucsina ácida, azul de anilina, fluoresceína) el grupo iónico que imparte el color, llamado también cromóforo tiene carga negativa y reacciona con sustancias básicas tales como el citoplasma. Colorantes básicos (azul de metileno, violeta de genciana, fucsina básica, safranina) el cromóforo tiene carga positiva y reacciona con sustancias ácidas como son los ácidos nucleicos.

Los colorantes neutros están compuestos por colorantes ácidos y básicos (hematoxilina (básico)) - eosina (ácido).

#### COLORACION DE GRAM MODIFICADO POR KOPELOFF

En 1844 el médico danés Gram, invento un método especial de tinción de valor práctico, taxonómico en bacteriología. Este método sirve para dividir bacterias en dos grupos:

- Gram positivo que conservan el complejo cristal de tinción de valor aparecen de color violeta.
- Gram negativos que pierden este complejo por la acción del alcohol – acetona y se colocan con el colorante de contraste, fucsina básica, apareciendo de color rojo.

La modificación hecha por Kopeloff consiste en añadir 1 a 2 gotas de bicarbonato de sodio al Violeta de genciana, lo que favorece la impregnación del colorante en la bacteria.

#### Material

- Placa de agar nutritivo con bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Serie de colorantes para Gram
  - Violeta de genciana (colorante primario)
  - Bicarbonato de Sodio
  - Lugol (mordiente)
  - Alcohol – acetona (decolorante)
  - Fucsina básica (colorante de contraste)
- Lamina porta objeto



- Asa de siembra de aro y punta.
- Solución fisiológica (SF) al 0.85%
- Láminas control coloreadas por Gram
- Mechero de Bunsen.
- Varillas para colocación.
- Microscopio.
- Aceite de cedro.

#### Procedimiento

1. Colocar con el asa en aro 1 – asadas de la solución fisiológica al 0.85% en el centro de la lámina portaobjeto.
  2. Con el asa de siembra en punta, tomar una porción muy pequeña de la colonia bacteriana y re suspenderla en la gota del SF, trazando una espiral del centro a la periferie, para obtener un frotis den capa fina.
  3. Fijar al calor.
  4. Cubrir el frotis con la solución de violeta de genciana y agregar 1 – 2 gotas de bicarbonato de sodio. Dejar actuar por dos minutos.
  5. Lavar con agua corriente.
  6. Cubrir con Lugol durante 2 minutos.
  7. Lavar con agua.
  8. Decolorar con alcohol – acetona, inclinando la lámina y agregando desde la parte superior del frotis (no directamente sobre este), hasta que no arrastre más colorante, máximo por 10 segundos.
  9. Lavar con agua
  10. Cubrir con fucsina básica por 30 segundos.
  11. Lavar con agua corriente
  12. Dejar secar al aire o con la ayuda de la flama débil del mechero.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión 100x.

#### Resultado

Las bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta y las Gram negativas de color rojo.

NOTA: si el frotis se realiza a partir de un cultivo líquido no es necesario usar la solución fisiológica al 0.85 %.

#### COLORACION DE ZIEHL NEELSEN

Existe un importante grupo de bacterias que no se tiñen con el Gram, debido a que su pared es particularmente gruesa por la presencia de lípidos, que la hacen impermeable a los colorantes. Tal es el caso del genero Mycobacterium. La colocación diferencial de Ziehl Neelsen permite colorear a estos microorganismos. Tanto el fenol contenido en el colorante primario como el calor de la llama directa aplicada a la lámina, ayudan a disolver los lípidos de la pared bacteriana de tal manera que permite el ingreso del colorante a la célula. Una vez coloreado este grupo bacteriano no se deja decolorar por el alcohol ácido. Estas se denominan bacterias ácido – alcohol resistente.



Material

- Lamina de frotis de Mycobacterium tuberculosis.
- Set de colorantes de Ziehl Neelsen
  - Fucsina fenicada (colorante primario)
  - Alcohol – ácido (decolorante)
  - Azul de metileno (colorante de contraste)
- Lámina control coloreada por Ziehl Neelsen
- Microscopio
- Aceite de cedro
- Mechero de alcohol

**PROTOCOLO**

LAMINA	MORFOLOGIA	ESQUEMA
GRAM POSITIVAS		
GRAM NEGATIVAS		



### Procedimiento

1. Cubrir el frotis con fucsina fenicada y calentar la lámina con el mechero de alcohol, hasta observar el desprendimiento de vapores. Evitar que el colorante hierva. Repetir por dos veces más.
2. Lavar con agua corriente.
3. Decolorar con el alcohol – ácido hasta que no arrastre colorante, por 2 minutos máximo.
4. Lavar con agua corriente.
5. Cubrir con azul de metileno o ácido pícrico durante 1 minuto.
6. Lavar con agua corriente.
7. Dejar secar al aire.

Observar al microscopio con aceite de inmersión 100x.

### Resultado

Las bacterias ácido – alcohol resistente se tiñen de color rojo y los demás microorganismos de color azul (azul de metileno) o amarillo (ácido pícrico)

## PROTOCOLO

LAMINA	DESCRIPCION MORFOLOGICA	ESQUEMA
Bacilo Tuberculoso		
Lamina preparada en la práctica		



## PRÁCTICA N°6

### PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO SIMPLES Y MEDIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS

#### INTRODUCCION

Para el aislamiento de bacterias de un material patológico, es necesario el cultivo de éstas en medios bacteriológicos que les permita llevar a cabo sus actividades vitales, por lo que es necesario la utilización de medios de cultivo con substratos fácilmente asimilables, con una determinada concentración de iones hidrógenos, sales, compuestos nitrogenados, hidratos de carbono, vitaminas, pH, humedad y temperatura adecuada.

Según su estado físico los medios de cultivo son:

- Medios líquidos
- Medios semisólidos
- Medios sólidos

Según los requerimientos de diagnóstico son:

- Medios simples

Contienen las sustancias más indispensables para su desarrollo, ejemplo caldo y agar nutritivo.

- Medios enriquecidos

Son aquellos que contiene además de los compuestos mínimos, sustancias que van a enriquecer el medio como sangre suero, y otros productos biológicos, que aportan los factores de crecimiento el cultivo de los microorganismos exigentes en estos medios de cultivo permiten su aislamiento y desarrollo satisfactorio.

- Medios selectivos

Utilizados para el cultivo preferencial de ciertas bacterias contenidas en una muestra con población poli microbiana. Contienen diferentes tipos de sustancias inhibitoras, que van a permitir solamente el desarrollo de determinados grupos bacterianos o especie bacteriana.

- Medios diferenciales

Usados para determinar los cambios bioquímicos y por ende la identificación de la especie bacteriana.

#### Material

- Probetas de 100 ml
- Balones de 200 ml
- Solución de NaOH 1N
- Solución de HCl 1N
- Baguetas
- Trípodes con malla de asbesto
- Tubos, placas de Petri y frascos estériles
- Pinzas



- Papel indicador de pH

## MEDIOS SIMPLES

### I. CALDO NUTRITIVO

#### Componentes

- Extracto de carne..... 0.3 gr
- Peptona..... 1.0 gr
- Glucosa..... 0.5 gr
- Cloruro de sodio..... 0.5 gr
- Agua destilada..... 100.0 ml

#### Preparación

1. Disolver en agua destilada o desmineralizada los ingredientes señalados.
2. Someter a la acción del calor hasta su completa solución.
3. Enfriar hasta aproximadamente 50°C
4. Ajustar el pH del medio a 7.0- 7.4, comprando con la escala de colores. Si el medio es ácido agregar gota a gota la solución del HCl, hasta lograr el pH óptimo.
5. Envasar, rotular señalando el tipo de medio, la cantidad y la fecha de preparación.
6. Esterilizar a la autoclave a 15 lb de presión (121 ° c) por 15 minutos.
7. Controlar la esterilidad del medio por incubación a 37°C por 24 horas.

### II. AGAR NUTRITIVO

#### Componentes

- Extracto de carne..... 0.3 gr.
- Peptona..... 1.0 gr.
- Glucosa..... 0.5 gr.
- Cloruro de sodio..... 0.5 gr.
- Agar – agar..... 1.5 gr.
- Agua destilada..... 100.0 ml pH 7.0 – 4

#### Preparación

1. Disolver primero el agar hasta su completa disolución, sometiéndolo a la acción de calor.
2. Agregar los demás ingredientes.
3. Ajustar el pH a 7.0 – 7.4 con las soluciones de NaOH o HCl.
4. Envasar, rotular señalando el tipo de medio, la cantidad y la fecha de preparación.
5. Esterilizar a la autoclave a 121 ° C por 15 minutos.
6. Controlar la esterilidad por incubación a 37°C por 18 – 24 horas.



## MEDIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS

### INTRODUCCION

Muchos microorganismos patógenos requieren de nutrientes específicos para su aislamiento y cultivo. Estos van a permitir que su crecimiento sea más rápido y abundante, razón por la cual se emplean medios enriquecidos.

La sustancia más utilizada y conocida es la sangre, que puede ser de carnero, conejo, caballo y humana, obtenidas con anticoagulante o defibrinada. Para su utilización se debe cumplir con ciertas condiciones, entre ellas:

- Ser la más fresca posible (+ 3 – 4 días)
  - No haber estado sometida a enfriamiento y calentamiento repetido.
1. Debe estar estéril, lo cual se demuestra mediante pruebas bacteriológicas al menos 48 horas antes de su uso.  
*Agar sangre:* Para su preparación se utilizan diferentes concentraciones, según la necesidad de requerimiento del microorganismo, puede ser 5 – 7% o 10%. Lo recomendado es una concentración final de 5%.  
*Agar chocolate:* Es un medio de cultivo empleado para el aislamiento de microorganismo que requieren factores nutricionales como el factor X (Hemina) y el factor V (NAD). Se prepara a partir de un medio base (agar BHI, agar Mueller Hinton, agar Base sangre, agar nutritivo) al que se le adiciona la sangre y se le somete a una temperatura de 80°C para lisis de los glóbulos rojos liberando la hemina, ya que el factor V es termolábil se debe evitar el recalentamiento.

### PREPARACION DEL AGAR SANGRE

#### Material

- Agar base estéril 100 ml.
- Baño de María a 45°C.
- Sangre citratada o defibrinada 5 ml.
- Placas Petri estériles.
- Mechero de Bunsen.

#### Preparación

1. Preparar 100 ml del agar base y esterilizar al autoclave.
2. Colocar en Baño María y mantenerlo a una temperatura de 45°C.
3. Retirar del Baño María y adicionar a 5 ml de sangre citratada o defibrinada, trabajando siempre junto a la llama del mechero.
4. Mezclar con movimientos rotatorios suaves, para obtener un buen homogenizado.
5. Repartir la mezcla en placas Petri estériles, aproximadamente 20 a 25 ml en cada una.
6. Dejar solidificar y realizar el control de esterilización, durante 24 – 48 horas a 37 °C
7. Conservar refrigerado a 4°C hasta su empleo.

El color normal del medio preparado debe ser rojo cereza.

### PREPARACION DEL AGAR CHOCOLATE

#### Material





- Agar sangre
- Placas Petri estériles
- Trípodes con plancha de asbesto.

Preparación

1. Someter el agar sangre a calentamiento, hasta una temperatura máxima de 80°C y la aparición de un color chocolate.
2. Repartir en placas Petri estériles 20 a 25 ml en cada una.
3. Dejar solidificar y controlar esterilidad.
4. Conservar refrigerado a 4°C hasta su uso.



## PRÁCTICA N°7

### PREPARACIÓN DE MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES

#### I. MEDIOS SELECTIVOS

Los medios selectivos son aquellos que poseen como parte de sus componentes una variedad de inhibidores en concentraciones adecuadas que impide el crecimiento de bacterias superfluas.

Por ejemplo, se emplean para el aislamiento de enterobacterias de importancia médica (*Salmonella*, *Shigella* y otras) a partir de muestras con una flora acompañante diversa. Adicionalmente los medios selectivos llevan indicadores que evidencian el metabolismo bacteriano facilitando la identificación preliminar del microorganismo.

1. AGAR MAC CONKEY	(gramos/litros)
• Peptona de caseína.....	17.0
• Peptona de carne.....	3.0
• Lactosa.....	10.0
• Sales biliares.....	1.5
• Cloruro de sodio.....	5.0
• Rojo neutro.....	0.03
• Cristal violeta.....	0.001
• Agar – agar.....	13.5
pH 7.1 ± 0.1	

Este medio se emplea para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y bacterias coliformes a partir de muestras clínicas y aguas residuales.

Las sales biliares y el cristal violeta actúan como agentes inhibidores de bacterias Gram positivas y de algunos entéricos exigentes. El rojo neutro es el indicador de pH que permite determinar los ácidos producidos de la degradación de la lactosa.

Preparación:

1. Pesar 50 g del producto deshidratado.
2. Disolver en un litro de agua destilada, remojar durante 15 minutos.
3. Hervir la solución hasta su completa disolución.
4. Auto clavar a 121°C por 15 minutos.
5. Enfriar a 50°C.
6. Repartir en placas estériles, aproximadamente 20 ml.

#### 2. AGAR SALMONELLA – SHIGELLA (SS)

	(Gramos/litros)
• Extracto de carne.....	5.0
• Peptona especial.....	5.0
• Lactosa.....	10.0



- Bilis de buey, desecada..... 8.5
  - Citrato de sodio..... 10.0
  - Tiosulfato de sodio..... 8.5
  - Hierro (III) citrato..... 1.0
  - Verde brillante.....0.0003
  - Rojo neutro..... 0.025
  - Agar – agar..... 12.0
- pH 7.2 ± 0.1

Preparación:

1. Pesar 60 gr del producto deshidratado.
  2. Disolver en un litro de agua destilada.
  3. Dejar remojar por 15 minutos.
  4. Someter al calor, agitando frecuentemente hasta ebullición y disolución total.
  5. Enfriar a 50°C.
  6. Repartir en placas Petri estériles aproximadamente 20 ml.
- El medio no necesita ser auto clavado.

### 3. AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO (XLD)

- (Gramos/litros)
- Xilosa..... 3.5
  - Lisina..... 5.0
  - Lactosa..... 7.5
  - Sacarosa..... 7.5
  - Cloruro de sodio..... 5.0
  - Extracto de levadura..... 3.0
  - Desoxicolato de sodio..... 2.5
  - Tiosulfato de sodio..... 6.8
  - Amonio y Hierro (III) citrato..... 0.8
  - Rojo de Fenol..... 0.08
  - Agar – agar..... 13.5
- pH 7.4

Este medio se utiliza principalmente para el aislamiento y diferenciación de bacterias entero patógenas, especialmente Salmonela, Shigella y Arizona.

El agar XLD permite las siguientes reacciones de diferenciación:

- Degradación de la xilosa, lactosa y sacarosa a ácido (viraje amarillo del indicador de pH rojo de fenol).
- La decarboxilación de la lisina a cadaverina (color rojo púrpura alrededor de la colonia)
- El tiosulfato sirve como indicador de la formación de sulfuro de hidrógeno (colonias con precipitado negro)



El viraje puede variar desde amarillo hasta rojo durante el curso de incubación prolongada.

Preparación:

1. Pesar 55g del producto deshidratado.
2. Disolver en un litro de agua destilada.
3. Dejar remojar por 15 minutos.
4. Calentar rápidamente hasta ebullición por unos segundos.
5. Enfriar rápidamente en agua fría a unos 50°C.
6. Repartir en placas Petri estériles aproximadamente 20 ml.

El medio en estado sólido tiene un color rojizo.

4. AGAR EMB (Bosina – Azul de Metileno)

(Gramos/litros)

- Peptona.....10.0
- Hidrogeno fosfato di potásico..... 2.0
- Lactosa.....5.0
- Sacarosa.....5.0
- Eosina amarillenta.....0.4
- Azul de metileno.....0.07
- Agar..... 13.5

pH 7.1 ± 0.1

Los gérmenes Gram positivos son inhibidos en su crecimiento gracias a la presencia de los colorantes: Eosina y Azul de Metileno.

El contenido en Lactosa y Sacarosa hacen posible la distinción de Salmonella, Shigella lactosa negativa y sacarosa negativa, frente a otra flora acompañante lactosa negativa pero sacarosa positiva como Citobacter, Proteus vulgaris, Aeromonas hydrophila.

La E. Coli se observará con un brillo metálico positivo sobre un crecimiento de colonias de color violeta Salmonella y Shigella no presentarán brillo metálico y sus colonias se observaran transparentes.

Preparación:

1. Pesar 36 g del producto deshidratado.
2. Disolver en un litro de agua destilada. Dejar remojar por 15 minutos.
3. Hervir hasta su completa disolución.
4. Auto clavar a 121°C por 15 minutos.
5. Enfriar a 50°C.
6. Repartir en placas Petri estériles aproximadamente 20 ml.

5. TCBS (Agar Tiosulfato – Citrato – Sales biliares – Sacarosa)

(Gramos/litros)



- Peptona de caseína..... 5.0
  - Peptona de carne..... 5.0
  - Extracto de levadura..... 5.0
  - Citrato de sodio..... 10.0
  - Tiosulfato de sodio.....10.0
  - Bilis de buey, desecada.....5.0
  - Colato de sodio..... 3.0
  - Sacarosa..... 20.0
  - Citrato de Hierro (III)..... 1.0
  - Agar..... 14.0
  - Azul de timol.....0.04
  - Azul de bromo timol..... 0.04
- pH 8.8 ± 0.1

Este medio se emplea preferentemente para el aislamiento de *Vibrio cholerae*.

Las elevadas concentraciones de tiosulfato y citrato, así como el medio fuertemente alcalino, inhiben notablemente a las enterobacterias. Solo algunas cepas sacarosa positivas pueden desarrollar entre ellos proteus y *Yersinia*.

La bilis de buey y el Colato inhiben, sobre todo a los enterococos.

El indicador mixto de azul de timol – azul de bromo timol presentan viraje al amarillo por la formación de ácido. Las colonias de *V. Cholerae* sacarosa positivas se observarán de color amarillo, mientras que para el *V. Parahaemolyticus* sacarosa negativas serán verde azulado.

Preparación:

1. Pesar 88 g del producto deshidratado.
2. Disolver en un litro de agua destilada, remojar durante 15 minutos.
3. Hervir hasta su completa disolución.
4. No esterilizar en autoclave.
5. Enfriar a 50°C.
6. Repartir en placas Petri estériles, aproximadamente 20 ml.

#### 6. AGAR HIPERTONICO SEGÚN CHAPMAN

(Gramos/litros)

- Peptona..... 10.0
- Extracto de carne..... 1.0
- Cloruro de sodio..... 75.0
- D (-) manitol..... 10.0
- Agar.....12.0
- Rojo de fenol..... 0.025

pH 7.4 ± 0.1



Debido a la concentración extremadamente alta de sal, permite solamente el crecimiento de microorganismos tolerantes a ella, entre los que se encuentra el género *Staphylococcus*.

La degradación del manitol con formación de ácido está notablemente correlacionada con la patogenicidad del germen.

El metabolismo del manitol se evidenciara por la viración a amarillo del indicador rojo de Fenol.

Preparación:

1. Pesar 108 g por litro del producto deshidratado.
2. Disolver en un litro de agua destilada, remojar durante 15 minutos.
3. Hervir hasta su completa disolución.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
5. Enfriar a 50°C.
6. Repartir en placas Petri estériles, aproximadamente 20 ml.

7. AGAR DCLS (Agar Desoxicolato – Citrato – Lactosa – Sacarosa )  
(Gramos/litros)

- Peptona de carne..... 5.5
- Extracto de carne..... 5.0
- Lactosa..... 10.5
- Sacarosa..... 10.5
- Citrato de sodio 2-hidratado..... 6.0
- Tiosulfato de sodio..... 4.0
- Desoxicolato de sodio.....3.0
- Citrato de Amonio y Hierro (III).....1.0
- Rojo neutro.....0.02
- Agar..... 13.0

pH 7.5 ± 0.1

Agar selectivo para el aislamiento y diferenciación de enterobacterias patógenas.

La presencia de desoxicolato y citrato inhiben a la flora Gram positiva, la degradación de la lactosa y sacarosa se manifiesta por el viraje del indicador rojo neutro al rojo.

Las colonias de *Salmonella* y *Shigella* se conservarán incoloras con el centro negrozco.

Preparación:

1. Pesar 57 g por el litro del producto deshidratado.
2. Disolver en un litro de agua destilada, remojar durante 15 minutos.



3. Hervir hasta su completa disolución.
4. No esterilizar en autoclave.
5. Enfriar na 50°C.
6. Repartir en placas Petri estériles, aproximadamente 20 ml.

#### 8. AGAR ENTERICO DE HEKTOEN

Composición:

- Peptona Proteosa..... 12 g
- Sales biliares..... 9 g
- Extracto de levadura..... 3 g
- Lactosa..... 12 g
- Salicina..... 2 g
- Sacarosa..... 12 g
- ClNa..... 5 g
- Tiosulfato de sodio..... 5 g
- Citrato férrico de amonio..... 1.5 g
- Agar..... 14 g
- Fucsina ácida..... 0.1 g
- Azul de bromotimol..... 0.065 g
- Agua destilada..... 1000 ml

Preparación:

Preparar una suspensión con 76 g de medio deshidratado, si se usa el producto comercial en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta el punto de ebullición y continuar hasta que el medio se disuelva. No poner en autoclave.

Enfriar hasta 50°C y volcar en placas Petri. Este medio resulta útil para el aislamiento y diferenciación de bacterias patógenas entéricas Gram negativas. Las coliformes generalmente aparecen de color salmón a anaranjado, mientras que Salmonella y Shigella muestran un color verde azulado.



## 9. AGAR SELECTIVO PARA CAMPYLOBACTER

Composición:

- Peptona proteína..... 21 g
  - Electrolitos..... 5 g
  - Almidón soluble..... 1 g
  - Agar..... 13 g
  - Agua destilada..... 1000 ml
- pH 7.3 0.1

Preparación:

Disolver y autoclavar a 121°C por 15 minutos, dejar enfriar a 40°C -50°C, incorporar 50 – 70 ml de sangre desfibrinada y un frasco de suplemento selectivo por cada 200 ml de medio de cultivo. Verter en placas estériles.

Suplemento:

- Vancomicina..... 2.0 mg
- Polimixina..... 50.0 ug
- Trimethoprim..... 1.0 mg

Disolver el liofilizado en 2 ml de agua destilada estéril.

Este medio es usado para el aislamiento de Campylobacter a partir del material clínico así como el procedente de alimentos contaminados.

Es un medio rico en nutrientes y los antibióticos añadidos como suplemento selectivo inhiben considerablemente la flora acompañante.

## 10. AGAR ROGOSA SELECTIVO PARA Lactobacillus

Composición:

- Peptona de caseína..... 10.0 g
- Extracto de levadura..... 5.0 g
- Glucosa..... 20.0 g
- Deshidrogeno fosfato potásico..... 6.0 g
- Citrato amónico..... 2.0 g
- Tween 80..... 1.0 g
- Acetato sódico..... 15.0 g
- Sulfato de magnesio..... 0.12 g
- Agar..... 15.0 g
- Agua..... 1000 ml

Disolver y ajustar el pH a 5.5

No esterilizar en autoclave. Es utilizado para el aislamiento de Lactobacillus de la flora bucal e intestinal, así como en carnes, leche y otros alimentos.





Debido a su alta concentración de acetato y el valor de pH, la flora acompañante es inhibida en cierta medida.

Añadiendo pequeñas cantidades de manganeso, magnesio y hierro se garantiza el crecimiento óptimo de los lactobacillus.

## II. MEDIOS DIFERENCIALES

Todas las bacterias requieren después de su aislamiento primario la identificación de especie. Para ello es necesario determinar características metabólicas adicionales, empleando medios diferenciales, los cuales poseen dentro de sus ingredientes carbohidratos, aminoácidos y otros sustratos que van a ser utilizados por el microorganismo, siendo interpretados posteriormente por el profesional calificado correspondiente del laboratorio de microbiología.

Existen muchos tipos de medios diferenciales. En la práctica se preparan algunos de éstos.

### 1. AGAR DE HIERRTO TRES AZUCARES

(TSI= Triple Sugar Iron)

	(Gramos/litros)
• Extracto de carne.....	3.0
• Extracto de levadura.....	3.0
• Peptona de caseína.....	15.0
• Peptona de carne.....	5.0
• Lactosa.....	10.0
• Sacarosa.....	10.0
• Glucosa.....	1.0
• Citrato amonio – férrico.....	0.5
• Cloruro de sodio.....	5.0
• Tiosulfato de sodio.....	0.5
• Rojo de Fenol.....	0.024
• Agar – agar.....	12.0

pH 7.4 ± 0.1

- Este medio de diferenciación bioquímicas e utiliza para identificar a las bacterias Gram negativas por géneros y especie.
- La degradación del carbohidrato con formación de ácido se comprueba por el viraje del indicador rojo de fenol a amarillo y una alcalinización por un viraje hacia rojo oscuro.
- La degradación de la glucosa a ácido produce cambio de color solo en la zona columnar del medio, pues debido a su baja concentración, la escasa cantidad de ácido producido en la superficie inclinada del agar se evapora rápidamente.
- Si, en cambio son degradadas la lactosa y sacarosa, que se encuentran en mayor proporción, se observa un viraje de color amarillo en todo el tubo.



- El tiosulfato de sodio se reduce por acción de algunas bacterias a sulfuro de hidrogeno, el cual reacciona con la sal férrica produciendo H<sub>2</sub>S, un precipado negro.
- La formación de grietas o cavidades en el medio, indican la formación de gas (Co<sub>2</sub>) por la degradación del azúcar.

Preparación:

1. Suspender 65 g del producto deshidratado en un litro de agua destilada o desmineralizada.
2. Remojar durante 15 minutos.
3. Hervir hasta la completa disolución.
4. Distribuir en tubos de 13x100 aproximadamente de 3 a 4 ml.
5. Esterilizar al autoclave a 121°C por 15 minutos.
6. Después de la esterilización, colocar los tubos en posición inclinada, procurando que la zona columnar y la superficie (pico flauta) tengan la misma longitud, aproximadamente 3 cm.

El color del medio de diferenciación es rojo a naranja.

## 2. AGAR CITRATO según SIMMONS

(Gramos/litros)

- Amonio dihidrogenofosfato..... 1.0
- Hidrogeno fosfato di potásico..... 1.0
- Citrato de sodio..... 2.0
- Cloruro de sodio..... 5.0
- Sulfato de magnesio..... 0.2
- Azul de bromotimol..... 0.08
- Agar – agar..... 12.0

pH 6.9 ± 0.1

El medio se emplea para la diferenciación bioquímica de bacterias. La degradación del citrato produce una alcalinización del medio, que se reconoce por el viraje de color verde a azul oscuro del indicador de pH del azul de Bromotimol.

Preparación:

1. Suspender 65 g del producto deshidratado en un litro de agua destilada o desmineralizada.
2. Remojar durante 15 minutos.
3. Calentar hasta la ebullición, agitando con frecuencia hasta la completa disolución.
4. Esterilizar al autoclave a 121°C por 15 minutos.
5. Distribuir en tubos de 13x100 aproximadamente de 3 a 4 ml.



### 3. AGAR UREA según CHRISTENSEN (basal)

	(Gramos/litros)
• Peptona especial.....	1.0
• Glucosa.....	1.0
• Cloruro de sodio.....	5.0
• Dihidrogenofosfato potásico.....	2.0
• Rojo de fenol.....	0.012
• Agar – agar.....	12.0
pH 6.8 ± 0.1	
Solución de úrea	
• Urea.....	40.0
• Agua destilada.....	1 litro

Esta solución se utiliza para la diferenciación de microorganismos que degradan o no la urea.

- La urea por acción de la enzima ureasa contenida por algunos microorganismos es hidrolizada a dióxido de carbono y amoníaco.
- El amoníaco produce alcalinización del medio, lo cual se demuestra por el viraje del rojo de fenol de amarillo a rosado intenso.

Preparación:

1. Disolver 21 g del producto deshidratado en 950 ml de agua destilada o desmineralizada.
2. Remojar durante 15 minutos.
3. Hervir hasta la disolución total.
4. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
5. Antes de su uso añadir 550 ml de la solución de úrea al 40% al medio de cultivo fundido y enfriado hasta uno 55°C, bajo condiciones estériles, mezclando homogéneamente.
6. Distribuir en tubos de 13x100 aproximadamente de 3 a 4 ml solidificando en plano inclinado.

### 4. CALDO PEPTONADO (Prueba de Indol)

	(Gramos/litros)
• Peptona.....	20.0
• Coruro de sodio.....	10.0
• Agua destilada.....	1000.0 ml

El medio es empleado para la diferenciación de muchas especies de bacterias que degradan el triptófano por acción de la enzima triptofanasa. El producto metabólico detectado al agregar el reactivo de Kovac o de Ehrlich es en Indol.

Preparación:



1. Disolver los ingredientes por calentamiento, hasta la clarificación del medio.
2. Enfriar a 50°C.
3. Autoclavar a 15 lb de presión por 15 minutos.
4. Repartir el medio en tubos estériles de 13x100 aproximadamente de 3 a 4 ml.

Para la interpretación del producto metabólico producido por el microorganismo, se requiere del siguiente reactivo:

Reactivo de Kovac

- Alcohol amílico..... 150.0 ml
- p – dimetil aminobenzaldehido..... 10.0 g
- Ácido clorhídrico..... 50ml

5. CALDO MR – VP (Rojo de Metilo – Voges Proskauer)

Composición:

- Peptona especial.....7.0
- Glucosa..... 5.0
- Fosfato dipotásico.....5.0

pH 6.9 ± 0.1

Con este medio se realizan dos tipos de pruebas bioquímicas: Rojo de Metilo y Voges Proskauer, dichas pruebas sirven para poder identificar a diversos microorganismos.

Preparación:

1. Disolver 17 g del producto deshidratado, en un litro de agua destilada.
2. Disolver por ligero el calentamiento.
3. Distribuir en tubos de 13x100, aproximadamente 5 ml.
4. Esterilizar el autoclave a 121°C x 15 minutos.

- Reactivo Rojo de Metilo  
Rojo de metilo..... 0.1 g  
Alcohol etílico..... 300.0 ml

La prueba de rojo de metilo sirve para identificar la formación de ácidos fuertes a partir de la glucosa.

- Reactivo de Voges – Proskauer
  1. Alfa naftol.....5.0 g  
Alcohol etílico absoluto..... 100.0 ml
  2. Hidroxido de potasio.....40.0 g  
Agua destilada..... 100.0 ml

La prueba de Voges – proskauer sirve para identificar la formación de acetoina a partir de la glucosa.



## 6. AGAR LISINA HIERRO

	(Gramos/litros)
• Peptona de gelatina.....	20.0
• Extracto de levadura.....	10.0
• Glucosa.....	1.0
• L- Lisina.....	10.0
• Citrato férrico de amonio.....	0.5
• Tiosulfato de sodio.....	0.04
• Púrpura de bromocresol.....	0.02
• Agar – agar.....	13.5

pH 6.7 ± 0.1

Este medio se emplea para la diferenciación bioquímica de los bacilos entéricos y microorganismo afines, en el cual podemos observar la decarboxilación de la lisina, la desanimación y producción de hidrogeno sulfurado.

El agar Lisina – Hierro tiene incorporado el indicador de pH púrpura de Bromocresol, oscilando el rango de pH entre 5.2 (amarillo) y 6.8 (púrpura). Las bacterias que decarboxilan la lisina, elevan el pH del medio debido a la producción de amina tornándose el medio de color púrpura en el fondo del tubo. Si no se produce decarboxilación, en el fondo del tubo es color amarillo producto de la acidez de la glucosa.

En la desanimación de la lisina, la acción sobre el aminoácido producirá un complejo desconocido que alcalinizará el medio formándose un complejo anaranjado que al combinarse con el indicador da un color rojo en el tubo.

La producción de hidrógeno sulfurado se detecta debido al tiosulfato de sodio y mediante el indicador que es el citrato férrico de amonio, se produce un precipitado negro insoluble (H<sub>2</sub>S).

Preparación:

- 1) Disolver 33 g del producto deshidratado en un litro de agua destilada.
- 2) Dejar embeber por 15 minutos.
- 3) Disolver por calentamiento agitando con frecuencia.
- 4) Distribuir en tubos de 13x100 y autooclavar a 15 lb de presión por 15 minutos.
- 5) Enfriar en plano inclinado.



7. SLU MODIFICADA (Sacarosa – Lactosa – Urea - Movilidad)
- A. Medio base (Gramos/litros)
- Proteasa peptona..... 10.0
  - Cloruro de sodio..... 5.0
  - Agar..... 4.5
  - Indicador Andrade – Azul de timol..... 10.0
- pH 7.4 ± 0.1
- B. Medio de Carbohidratos
- Lactosa..... 10.0
  - Sacarosa..... 1.0
  - Urea..... 10.0
  - pH 7.4 ± 0.1

Medio de cultivo semisólido cuya finalidad es la observación de la movilidad de la bacteria manifestada por una turbidez difusa alrededor del canal de picadura. Si la movilidad es negativa solo se observará crecimiento en el trazo de siembra.

El metabolismo de la Sacarosa y la Lactosa se pone de manifiesto por la viración del indicador de Andrade observándose rojo- naranja; si los microorganismos también metabolizan la úrea se producirán productos alcalinos que se evidenciarán por la viración del azul de timol.

Preparación:

- 1) Preparar el medio base en las cantidades indicadas para un litro de agua destilada.
- 2) Filtrar a través de gasa o algodón.
- 3) Autoclavar a 121°C x 15 minutos.
- 4) Esterilizar por filtración el medio con carbohidratos.
- 5) Cuando el medio base se encuentre a 50°C adicione 100 cc del medio con carbohidratos, todo en condiciones de esterilidad.
- 6) Homogenizar y repartir en tubos de 13x100 estériles aproximadamente 4cc.
- 7) Dejar solidificar en posición vertical

#### INDICADOR DE ANDRADE

Composición:

1. Fucsina ácida (solución acuosa al 0.5%)..... 100cc
2. NaOH 1 N..... 16 cc

#### INDICADOR DE ANDRADE – AZUL DE TIMOL

Composición:



- 1. Indicador de Andrade..... 100 cc
- 2. Azul de Timol..... 0.4 g

8. SIM (Sulfuro – Indol - Movilidad)

Composición:

- Peptona de caseína.....20.0
- Peptona de carne.....6.6
- Citrato de amonio y hierro III.....9.2
- Tiosulfato sódico..... 0.2
- Agar.....3.0

pH 7.3 ± 0.1

Medio de cultivo semisólido cuya finalidad es la observación de motilidad de la bacteria que se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de la picadura.

Una motilidad negativa se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal.

La formación de H<sub>2</sub>S se reconoce por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento. La demostración del Indol se efectúa mediante la adición del reactivo de Kovacs y formación de una capa roja sobre la superficie del medio.

Preparación:

- 1) Pesar 30 g del producto deshidratado.
- 2) Disolver en 1L de agua destilada, remojar durante 15 minutos.
- 3) Hervir hasta su completa disolución.
- 4) Repartir en tubos de 13x100 estériles, 4 cc en cada uno.
- 5) Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
- 6) Dejar solidificar en posición vertical.

9. MEDIO OF de HUGH Y LEIFSON (1953):

Composición:

- Peptona..... 2 g
- NaCl..... 5 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.3 g
- Agar..... 3 g
- Agua destilada..... 1000 ml
- Azul de bromotimol  
Solución acuosa al 0.2%..... 15 ml



Disolver los sólidos por calentamiento en agua. Ajustar el pH a 7.1 filtrar y agregar el indicador.

Esterilizar a 115°C durante 20 minutos. Asépticamente agregar una solución estéril del carbohidrato correspondiente para tener una concentración final del 1%. Mezclar y distribuir asépticamente en volúmenes de 10 ml en tubos estériles de no más de 16 mm de diámetro.

#### 10. AGAR ESCULINA

- Esculina..... 1 g
- Citrato férrico.....0.5 g
- Agua peptonada.....1000 ml
- Agar.....20 g

Disolver la esculina, la sal de fierro y el agar en el agua peptonada, esterilizar a 115°C por 10 minutos.

#### 11. LECHE TORNASOLADA

- Leche desnatada en polvo.....100 g
- Tornasol..... 5 g
- Agua destilada.....1000 ml

Colocar en autoclave durante 10 minutos a 10 lbs. El color rosado del tornasol indica una reacción ácida provocada por la fermentación de la lactosa. Un color púrpura o azul (alcalina) indica que no hay fermentación de la lactosa. El color blanco (reducción) resulta cuando el tornasol sirve como aceptor electrónico y es reducido a su leucobase. La coagulación es causada por la precipitación de la caseína por el ácido producido a partir de la lactosa.

También puede provocar la coagulación por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina.

La peptonización (disolución del coágulo) indica la digestión del cuajo o proteínas de la leche por las enzimas proteolíticas.

#### 12. MEDIO DE GELATINA DILUIDO

Composición:

- Gelatina.....4 g
- Agua destilada.....1000 ml

Distribuir en tubos, colocar en autoclave a 121°C durante 5 minutos.

#### 13. MEDIO DE GELATINA

Composición:

- Gelatina..... 12 g
- Caldo BHI.....100 ml





Calentar en Baño María hasta disolver completamente la gelatina.  
Ajustar el pH a 7.0.

Colocar en tubos y autoclavar a 121°C por 15 minutos.

**14. AGAR CON CISTINA Y TRIPTICASA (ACT) MAS CARBOHIDRATOS PARA FERMENTACION DE NEISSERIAS**

- Cistina..... 0.5 g
  - Tripticasa..... 20 g
  - Agar.....3.5 g
  - ClNa.....5 g
  - Sulfito de Sodio.....0.5 g
  - Rojo de Fenol.....0.017 g
  - Agua destilada.....1000 ml
- pH 7.3

Esterilizar a 115°C por 15 minutos. Preparar soluciones al 20% de glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa en agua destilada, distribuir en tubos y esterilizar por filtración de membrana.

Agregar por cada 100 ml de medio CTA enfriado, 5 ml de carbohidrato, mezclar y distribuir 2 ml por tubo mantener a 4°C

INDICADOR	ESCALA pH	ACIDO	BASICO
Rojo de Fenol	6.8 – 8.4	Amarillo	Rojo
Rojo Neutro	6.8 – 8.0	Rojo	Amarillo
Azul de Bromotimol	6.0 – 7.6	Amarillo	Azul
Púrpura de Bromocresol	5.2 – 6.8	Amarillo	Púrpura
Azul de Timol	8.0 – 9.6	Amarillo	Azul
Rojo de Metilo	4.2 – 6.2	Rojo	Amarillo
Andrade	5.0 – 9.6	Rojo	Azul
Eosina B.N.	10.5 – 14.0	Púrpura	Amarillo



## PRÁCTICA N° 8

### ESTUDIO DE *STAPHYLOCOCCUS*

(Primera practica)

#### INTRODUCCION

Los estafilococos constituyen un grupo de microorganismos esféricos, Gram positivos, agrupados típicamente en forma de racimo, pero se les encuentra también formando tétradas o aisladas, son inmóviles y no esporuladas.

Pertencen a la familia Micrococcaceae. La especie patógena del género es *Staphylococcus aureus*. Este microorganismo puede formar parte de la flora normal de las fosas nasales y del perineo del ser humano y es causante de diversos procesos infecciosos purulentos, de infecciones alimentarias y de infecciones particularmente graves como bacteriemias.

La producción de una serie de enzimas y toxinas ayuda a entender la patogenia de las enfermedades causadas por este germen y algunas de ellas, como la enzima coagulasa, nos ayudan a identificar la especie *S. aureus* en el laboratorio.

Algunas especies de estafilococos coagulasa negativos tales como *S. epidermis* y *S. saprophyticus*, considerados hasta hace relativamente poco tiempo como patógenos, vienen teniendo un papel relevante en cuadros infecciosos bacteriémicos y urinarios.

Material:

- Placa de agar sangre.
- Placa de agar hipertónico de Chapman.
- Placa de agar DNAsa.
- Placa de agar Mueller – Hinton.
- Tubos con caldo nutritivo.
- Tubo con caldo plasma.
- Cepa de *S. aureus* en caldo nutritivo.
- Cepa de *S. epidermis* en caldo nutritivo.
- Cepa de *S. saprophyticus* en caldo nutritivo.
- Tubos en caldo nutritivo con las tres cepas de estafilococos con la turbidez equivalente al tubo de N° 0.5 de la escala de Mac Farland.
- Torundas estériles.
- Disco de Novobiocina.
- Reactivo de catalasa.
- Pinzas.
- Laminas portaobjeto.
- Set de colorantes de Gram.



Procedimiento:

Morfología microscópica y colonial

1. Inocular las tres cepas de estafilococos por dispersión agotamiento en la placa de agar sangre.
2. Incubar a 37°C por 24 horas.

Lecturas: morfología microscópica y colonial.

1. Observar las características típicas de las colonias de los estafilococos.
2. Hacer frotices en capa fina a partir de las colonias crecidas en el agar sangre, colorear por Gram y observar al microscopio a 100X.
3. Anotar los resultados en el protocolo.

Crecimiento en medio líquido

1. Inocular las tres cepas de estafilococos por inoculación en los tubos con caldo nutritivo.
2. Incubar a 37°C por 24 horas.

Lecturas: Crecimiento en medio líquido.

1. Observar el crecimiento de los estafilococos en el caldo nutritivo: turbidez homogénea en todo el tubo, con formación de poco sedimento.

Crecimiento en el agar hipertónico de Chapman.

1. Inocular las tres cepas de estafilococos en la placa de agar hipertónico de Chapman.
2. Inocular a 37°C por 24 horas.

Lectura: Crecimiento en el agar hipertónico de Chapman

1. Observar las colonias manita positiva de *S. aureus* y *S. saprophyticus* que presentan un halo de color amarillo por viraje del indicador rojo de fenol, y las colonias manita negativas de *S. epidermis*.

Prueba de coagulasa

1. Inocular las tres cepas de estafilococos en tubos con caldo plasma.
2. Inocular a 37°C por 24 horas.

Lectura: Prueba de la coagulasa.

1. Observar cada hora la aparición de coágulos, por espacio de 4 horas. De ser negativo el resultado, dejar incubando y hacer una lectura final a las 24 horas.
2. Si aparece un coágulo, la bacteria posee la enzima coagulasa y se trata de la especie *S. aureus*.

Prueba de la DNAsa

1. Inocular las tres cepas bacterianas en una placa de agar DNAsa en forma tupida en un área circular de 1 cm. de diámetro.
2. Incubar a 37°C por 24 horas.

Lectura: Prueba de la DNAsa

1. Con una pipeta Pasteur gotear una gota de HCl 1N al borde del crecimiento bacteriano de cada una de las especies y esperar unos minutos.
2. El HCl 1N precipita el DNA contenido en el medio de cultivo, enturbiándolo. Alrededor del crecimiento de *S. aureus* se observa un halo transparente como resultado de la



producción de DNAsa de parte de la bacteria, que metabolizó el DNA contenido en el medio circundante.

3. Alrededor del crecimiento de las otras dos especies, no se encontrará dicho halo, sino turbidez; son DNAsa negativas.

Prueba de sensibilidad a la Novobiocina

1. Inocular un cuadrante de la placa de agar Müller Hinton en tapete utilizando una torunda embebida en el caldo nutritivo inoculando con cada una de las cepas de estafilococos, cuya turbidez equivale al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland.
2. Colocar con una pinza previamente esterilizada al calor, un disco de Novobiocina en cada uno de los cuadrantes inoculados.
3. Incubar la placa a 37°C por 24 horas.

Lectura:

1. Observar la aparición de un halo de inhibición alrededor del disco colocado en los cuadrantes inoculados con *S. aureus* y *S. epidermis*, lo que indica sensibilidad a la Novobiocina.
2. Observar que no aparece dicho halo de inhibición alrededor del disco en el cuadrante inoculado con *S. saprophyticus* lo que indica esta es resistente a la Novobiocina.
3. Esta prueba ayuda para diferenciar las tres especies patógenas de estafilococos.

Antibiograma

Se efectuará un antibiograma por el método de disco difusión de Kirby-Bauer, descrito en la práctica anterior.

Los *S. aureus* son bacterias muy resistentes a los antibióticos y por eso se les debe hacer siempre un antibiograma una vez que se ha aislado una cepa de una muestra problema.

Prueba de catalasa

1. Colocar con el asa de siembra una pequeña parte de la colonia de cada una de las cepas sobre la lámina.
2. Añadir una gota de peróxido de hidrógeno.
3. Observar la aparición de burbujas, lo que indica la presencia de la enzima catalasa. Todos los estafilococos son catalasa positivos.



PROTOCOLO

AISLAMIENTO

MEDIO DE CULTIVO	COLONIAS				
	Tamaño	Forma	Pigmento	Hemólisis	Gram
AGAR SANGRE					

TIPIFICACION

CEPA	Hemólisis	Manitol	Coagulasa	Catalasa	DNAsa	Novobiocina
S. aureus						
S. epidermis						
S. saprophyticus						



## PRÁCTICA N° 9

### MORFOLOGIA DE LOS HONGOS ESTRUCTURA VEGETATIVA Y REPRODUCCION

#### INTRODUCCION

La identificación taxonómica (morfo taxonómica) de los hongos se basa principalmente en el estudio cultural macroscópico y microscópico de las estructuras vegetativas y/o reproducción, los cuales varían de forma, dimensión, color textura, posición, etc.; y presentan en muchos casos estructuras específicas de función definida.

En la actualidad los datos morfológicos se complementan con los aportes bioquímicos serológicos moleculares para permitir una mejor clasificación de algunos hongos.

#### A. Estudio macroscópico

La descripción de las características de los hongos son usualmente basadas en el crecimiento la colonia fúngica en un medio de cultivo estándar como el Agar Saboraud Glucosado. Esas características de crecimiento pueden variar de acuerdo al pH, temperatura, etc., por lo que es necesario considerar todos estos factores para una identificación correcta de los hongos.

Características de la colonia:

1. Aspecto: Se refiere a las características de crecimiento de micelio aéreo. Elevación densidad.  
Ejemplos: lanoso, algodonoso, atreciopelado, particulado, peludo, lampiño, etc.
2. Superficie: Se refiere a las características de crecimiento en la superficie: prominencia, depresiones de la colonia.  
Ejemplos: planas, rugosa, morticulada, cereorfirme, craterofirme.
3. Color: Varían de acuerdo a la especie del hongo: blanco, amarillo, verde, pardo, gris, marrón, negro, etc.
4. Pigmento: Cuando la colonia produce pigmentos de diferentes colores que difunden atrás del medio.
5. Velocidad de desarrollo: Se refiere a la velocidad de crecimiento pudiendo ser: rápida, moderada o lenta.

#### B. Estudio microscópico

##### 1. Estructura vegetativa:

- 1.1. Levaduras (H. levaduriformes): Son hongos unicelulares que presentan una forma redondeada u ovalada; reproduciéndose asexualmente por medio de yemas blastoconidias. Ejemplo: Candida, Saccharomyces, Rhodotorula.

Pseudomicelio: Estructura producto de la elongación de una blastoconidia yema, presentando a su vez brotes sucesivos. Ejemplo: Candida albicans.

- 1.2. Hongos filamentosos: Son hongos pluricelulares por hifas.

- 1.2.1. Hifas: Filamentos microscópicos multicelulares que se proyectan ramifican entrecruzan sobre un sustrato formando una malla denominada el micelio (colonia). Las hifas pueden ser:



1.2.1.1. Septadas: Presentan tabiques o paredes transversales, delimitando a cada una de las células que conforman la hifa; los cuales realizan intercambio de fluidos citoplasmáticos a través de los poros. Son los más frecuentes midiendo de 3 a 4  $\mu$ m de diámetro.

1.2.1.2. Aseptadas: Llamadas también hifa “cenocíticas” no presentan tabiques, son anchas, sifonadas y se observa una estructura continua, multinucleada, midiendo de 6 a 10  $\mu$ m de diámetro. Ejemplo: Zygomycetes (Mucor, Rhizopus, Absidia, etc.)

## 2. Estructuras de Reproducción:

La reproducción de los hongos puede ser sexual y asexual. Dependiendo del sustrato y condiciones ambientales. Los hongos pueden presentar una o ambas formas de reproducción.

2.1. Reproducción asexual: llamada también imperfecta o Anomorfa. Los hongos se multiplican partir de un micelio aéreo reproductor sin que exista de por medio fusión de núcleos, llegando a formar estructuras de fructificación o de resistencia.

2.1.1. Conidias: Elementos fúngicos externos que se origina a partir de una célula conidiógena a través de una serie de eventos llamados conidiogéneses, los cuales favorecen la propagación de los hongos. Varían en forma, tamaño, color tabicamiento, etc.

2.1.1.1. De acuerdo al tabicamiento: los conidias se clasifican en:

Hialinas: (amerosporas) Son conidias sin septos. Se observa de preferencia en hongos dermatofitos. Ejemplo: Trichophyton, Microsporum.

Hialofragmas: Son conidias que presentan uno o más septos hialinos con paredes delgadas. Ejemplo: Fusarium.

Dictiosporadas: Conidas que presentan tabiques perpendiculares entre si presentando una superficie de aspecto de muro. Ejemplo: Alternaria Stemphylium.

Didimosporas: Conidias que presentan un septo transversal. Ejemplo: Cephalosporium.

Fragmosporas: Conidias que presentan más de un septo transversal, de color oscuro y de paredes gruesas. Ejemplo: Helminthosporium Curvularia.

2.1.1.2. De acuerdo a su origen:

Blastoconidias: Conidias formadas por brotación de un elemento preexistente. Se encuentran en hifas y levaduras. Ejemplo: Cladosporium, Candida, etc.

Microconidias: Se refiere a la conidia unicelular que proviene de la transformación de una hifa entera preexistente.

Macroconidias: Es una conidia multicelular que proviene de la transformación del elemento de una hifa preexistente.

Clamidoconidias: Conidias resistente de pared gruesa formada bajo condiciones adversas del medio ambiente. Se observan en las hifas de disposición terminal e intercalar.

Arroconidias: Fragmentos de hifas formados por la desarticulación de los puntos de septación. Pueden presentarse adyacentes una a otra en la hifa o separadas. Alternando espacios vacíos. Presentan pared gruesa y forma de barril.



Ejemplos: Geotrichum, Coccidioides.

2.1.2. Esporas:

2.1.2.1. Esporangiosporas: Son endosporas formadas en el interior de una estructura llamada esporangio, el cual es sostenido en su base por la columella desde una hifa especializada llamada Esporangioforo.

2.1.2.2. Picnidiosporas: Son ectoendosporas encerradas en cavidades especiales llamadas "picnidios".

2.2. Reproducción sexual: También llamada perfecta o Teleomorfa. En esta fase se fusionan dos gametos, produciéndose la meiosis que da como resultado una spora sexual según la especie del hongo. Ejemplo: Zigosporas, Ascosporas, Basidiosporas, otras.

3. Otras estructuras vegetativas

3.1. Esporóforos: Son estructuras fúngicas especializadas que portan o dan origen a esporas asexuales.

Estas pueden ser:

3.1.1. Esporangioforos: Hifa modificada que portan los esporangios, dentro de los caules se originan endosporas. Ejemplo: Rhizopus, Mucor.

3.1.2. Conidióforos: Hifa especializada que da origen a conidias o exoesporas. Ejemplo: Aspergillus, Penicillium.

3.2. Cladosporas: Vesícula de doble pared gruesa, o subterminal de similar apariencia a calminconidias, son observadas en levaduras. Ejemplo: Candida albicans.

3.3. Cápsula: Estructura mucilaginosa, constituida básicamente por polisacáridos, presenta en la pared externa de algunas células levaduriformes. Ejemplos: Criptococos neoformans.

3.4. Esclerocios: Cuerpos duros formados por numerosas hifas densamente entrelazadas protegidas por una capa gruesa, son ricos en sustancias de reserva y pueden permanecer en estado de latencia por mucho tiempo. Ejemplo: Maduella, Rhizoctonia, Sclerotium, etc.

3.5. Rizoides: Estructuras de absorción y fijación. Ejemplo: Rhizopus, Mucor.

3.6. Estolones: Estructuras de fijación y propagación. Ejemplo: Absidia y Mucor.

3.7. Picnidios: Estructuras redondeadas de superficie lisa o rugosa y que parasitan vegetales. Los picnidios presentan un micelio protector llamado peridio, cuando el picnidio madura las picnidiosporas salen por un poro o por rotura de la pared del peridio.

Materiales

- Cultivo de hongos levaduriformes y filamentosos.
- Láminas montadas con micro cultivos de los siguientes hongos.
  - Rhizopus, aspergillus, fusarium, madurella, Cephalosporium, Helminthosporium, Rhodotorula, Penicillium, Trichophyton, Geotrichum, Alternaria y otros.
- Cultivo de Sclerotium en Agar Czápek.
- Láminas con tinta china de Cryptococcus neoformans.
- Material básico de laboratorio.





#### Procedimiento

- Realice un estudio macroscópico y microscópico con objetivos de menor y mediano aumento ocalizando y diferenciando las principales estructuras como: Esporangióforos, tipos de conidias, clamidosporas, etc.

#### Resultados

- Hacer esquemas de sus observaciones en el protocolo.



PROTOCOLO

TIPOS DE ESTRUCTURAS	ESTRUCTURAS Y ORGANOS DE REPRODUCCION ASEXUAL
Levaduras Blastoconidias Clamidosporas	
Hifas cenocíticas Esporagioforos Rizoides	
Hifas septadas Conidióforos Conidias	
Clamidoconidias	
Artroconidias	
Conidias Hialofragmas	



TIPOS DE ESTRUCTURAS	ESTRUCTURAS Y ORGANOS DE REPRODUCCION ASEXUAL
Macroconidias dictiosporadas	
Macroconidias didismosporadas	
Macroconidias fragmosporadas	
Cápsulas	
Esclerocios	
Picnidios	



## PRÁCTICA N° 13

### RECOLECCION Y PRESERVACION DE MUESTRAS FECALES

Generalidades: Las muestras fecales están formadas por alimentos no digeridos, secreciones digestivas, bacterias, hongos y agua. La frecuencia de evacuación puede ser 1 o 2 veces al día. La cantidad normal de muestra fecal eliminada diariamente es de aproximadamente 100 o 200 gramos, en el adulto. Normalmente las heces son de consistencia blanda, moldeadas, cilíndricas, de color amarillo castaño claro u oscuro, dependiendo de los alimentos ingeridos. Son de olor desagradable pero no fétido. Estas características pueden variar debido a la dieta, medicamentos o estados patológicos.

Para un diagnóstico acertado es necesario considerar varios factores: buena recolección de la muestra, adecuada preparación de la misma, personal capacitado y laboratorio especialmente implementado para este tipo de muestras.

Recolección de la muestra: Dependiendo del tipo de parasitosis que se sospeche la colección de la muestra puede ser de tres formas diferentes, mediante la expulsión natural, uso de purgantes en casos especiales de Amebiosis intestinal crónica y en Strongyloidosis; en lactantes o niños pequeños la muestra puede tomarse del pañal, recién emitida o utilizando la cucharilla rectal, y si está hospitalizado, por sonda rectal. El examen debe ser seriado, es decir, no menos de tres muestras.

#### Material

1. Muestra de heces del paciente.
2. Recipiente limpio de vidrio o plástico con tapa de rosca de 30 a 50 ml o recipiente descartable con tapa, etiqueta y ficha de datos.
3. Baja lengua, cucharilla o bagueta.
4. Bolsa de plástico.
5. Refrigeradora (opcional).
6. Formol – sal, PVA o Schaudinn (opcional).

#### Procedimiento

1. Recomendar al paciente que orine primero y luego defeque en un recipiente distinto (bacinica, chata o plástico).
2. Con ayuda del baja lengua o cucharilla o bagueta o palito de madera recoja una porción de heces del tamaño de una aceituna o de un limón y colóquelo en el recipiente.
3. La muestra debe ser llevada al laboratorio a la brevedad posible. De no ser así, se puede mantener en refrigeración por no más de 24 horas de emitida la muestra.
4. El recipiente debe tener una etiqueta consignando los datos del paciente, acompañado de una ficha de identificación (nombre, edad, sexo, procedencia, fecha, etc.)
5. Si no es posible completar el examen coproparasitológico se puede utilizar soluciones preservantes como: Formol sal al 10% que fija quistes y huevos o Fijador de Schadinn o alcohol poli vinílico que conserva trofozoitos y quistes. Merthiolate-yodo-formolaina (MIF) que además fija y colorea la muestra. Se debe colocar una parte de la muestra fecal que debe desmenuzarse y mezclarse con tres partes del preservante.

#### RECONOCIMIENTO DE ELEMENTOS NORMALES Y ANORMALES EN LAS MUESTRAS DE HECES

Entre los elementos normales de origen vegetal presentes en las heces se pueden observar:



- Granos de almidón
- Pelo vegetal
- Pared celular vegetal
- Gotas de grasa
- Células vegetales en empalizada
- Estructura vascular vegetal
- Células vegetales
- Grano de polen
- Fibra de algodón
- Hongos
- Levaduras

Entre los elementos normales de origen mineral presentes en las heces se pueden observar:

- Fosfato amónico magnésico
- Oxalato de calcio
- Fosfato cálcico neutro
- Ácido úrico
- Cistina
- Colesterol
- Leucina
- Sulfanilamida
- Carbonato de calcio
- Cristales de Charcot-Leyden
- Ácidos grasos

Entre los elementos anormales (parásitos del tubo digestivo) presentes en las heces se pueden observar:

- Trofozoíto de *Entamoeba histolytica*
- Quistes de *E. histolytica*
- Trofozoíto de *Entamoeba coli*
- Quiste de *E. coli*
- Quiste de *Endolimax nana*
- Quiste de *Iodamoeba buschlii*
- Trofozoíto de *Giardia lamblia*
- Quiste de *G. lamblia*
- Trofozoíto de *Chilomastix mesnili*
- Quiste de *Ch. mesnili*
- Trofozoíto de *Trichomonas hominis*
- Trofozoíto de *Balantidium coli*
- Quiste de *B. coli*
- Trofozoíto uninucleado de *Dientamoeba fragilis*
- Trofozoíto binucleado de *D. fragilis*
- Huevo de *Taenia* sp
- Proglótido grávido de *Taenia saginata*.
- Proglótico grávido de *Taenia solium*



- Huevo de *Diphyllbothrium pacificum*
- Proglótido de *D. pacificum*
- Huevo de *Hymenolepis diminuta*
- Huevo de *Hymenolepis nana*
- Capsula ovigera de *Dipylidium caninum*
- Huevo de *Fasciola hepática*
- Huevo de *Paragonimus mexicanus*
- Huevo de *Schistosoma mansoni*
- Huevo larvado de *Enterobius vermicularis*
- Huevo fértil de *Ascaris lumbricoides*
- Huevo infértil de *A. lumbricoides*
- Huevo de *Trichuris trichiura*
- Huevo de Uncinarias
- Larva rabditoide de *Strongyloides estercoralis*
- Huevo de *Meloidogyne sp*
- Huevo de *Heterodera sp*
- Huevo de *Trichostrongylus sp.*



## PRÁCTICA N° 14

### MÉTODOS DE DIAGNOSTICO DE ENTEROPARÁSITOS

Generalidades: Conocidos también como exámenes coproparasitológicos. Corresponden al estudio de las muestras fecales para la búsqueda e identificación de formas parasitarias. Se pueden dividir en métodos: Directo, Concentración y Especiales. La elección del método depende de la especie parasitaria que se sospecha.

Observación macroscópica de la muestra: Una vez recibida una muestra, debe observarse las características organolépticas como consistencia (dura, pastosa, diarreica, etc.), forma, color (amarilla, acólica, negra, etc.), olor (fétido, rancio, pútrido, etc.), presencia de moco, sangre, segmentos o proglótidos de tenias, nemátodes adultos (*Enterobius*, *Ascaris*, etc.). Estas características se anotan en la ficha de cada muestra. Los parásitos observados macroscópicamente deben colocarse en suero fisiológico o en alcohol al 70% o en formol al 10% para su posterior identificación.

Observación microscópica de la muestra:

#### METODO DIRECTO:

Es el más simple y fácil de realizar.

#### Material

1. Muestra de heces recientes o conservadas en formol al 10%.
2. Suero fisiológico o solución de Lugol parasitológico.
3. Láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos, guantes de látex, mascarilla.
4. Baguetas o mondadientes, algodón, alcohol 50%, lejía.
5. Microscopio con objetivos de 10 y 40 x.

#### Procedimiento

1. Si la muestra es reciente, coloque en una lámina portaobjetos una gota de suero fisiológico y con ayuda de la bagueta o mondadientes tome una pequeña porción de heces y emulsiónela en la gota de suero fisiológico. Trate de que la preparación no sea gruesa.
2. Cubra con una laminilla cubreobjetos y observe al microscopio con objetivos de 10 y luego de 40 x.
3. Este método permite observar trofozoítos de amebas, flagelados, ciliados en movimiento y larvas de helmintos, aunque se les observa incoloros. También se puede observar quistes y huevos.
4. Si la muestra está conservada en formol sal o es reciente, se repite el procedimiento de preparación utilizando una gota de Lugol que colorea los quistes, huevos y larvas así como algunas características morfológicas que ayudan a la identificación.



## PRÁCTICA N° 15

### MÉTODOS DE CONCENTRACION

Cuando el número de elementos parasitarios como quistes y huevos es escaso, se requiere el uso de técnicas que eliminen residuos y permitan concentrar mayor número de los elementos parasitarios. Pueden ser de dos tipos:

1. Métodos de alta densidad o de flotación: requieren de soluciones químicas concentradas de densidad mayor a 1200, superior a la densidad de los quistes y huevos que tienen densidad alrededor de 1050 a 1150. Ejemplo: Método de Faust, Método de Willis, etc.
2. Métodos de baja densidad i de sedimentación: requieren soluciones químicas diluidas de menor densidad que los huevos o quistes, que por su mayor peso precipitan y van al fondo del recipiente. Ejemplo: Método de Telemán, Método de Ritchie, etc.

Método de Faust:

También denominado Método Mixto porque utiliza centrifugación y flotación. Se requiere una solución saturada de sulfato de Zinc al 33% con densidad de 1180.

Material

1. Muestra de heces reciente o conservada con formol sal al 10%.
2. Agua destilada o corriente.
3. Solución de sulfato de Zinc al 33%.
4. Vaso, colador, gasa, pipeta Pasteur, láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos 22x22 mm.
5. Baguetas, algodón, alcohol 50%, Lugol, lejía, tubos de centrifuga de 10x130mm, gradilla, guantes de látex, mascarilla (opcional).
6. Densímetro, centrifuga.
7. Microscopio con objetivos de 10 y 40x.

Procedimiento

1. Cuele la muestra o coloque 1 gr de heces o 1 cc de la muestra en el tubo de centrifuga. Agregue agua hasta la mitad del tubo y emulsione con ayuda de la bagueta. Agregue agua hasta 1 cm antes del borde del tubo, contrapese con otro tubo.
2. Centrifugue a 2500 rpm durante 2 minutos.
3. Decante y agregue agua y emulsione con la bagueta nuevamente. Agregue agua hasta 1 cm del borde del tubo y centrifugue. Repita este procedimiento tres veces.
4. Decante y agregue 3 ml de sulfato de zinc al 33%, emulsione con la bagueta y agregue sulfato de Zinc hasta 1 cm antes del borde del tubo.
5. Centrifugue a 2500 rpm durante 1 minuto.
6. Coloque el tubo sin eliminar nada en la gradilla, agregue sulfato de Zinc con ayuda de la pipeta de Pasteur hasta formar un menisco. Coloque una laminilla cubreobjetos de 22x22 mm sobre el borde del tubo y deje reposar durante 5 minutos.
7. Coloque una gota de Lugol en una lámina portaobjeto y ponga la laminilla cubreobjetos sobre la gota de Lugol.
8. Observe al microscopio con objetivo de 10 y 40 x.





#### Método de Willis:

Es un método de flotación. Requiere solución saturada de cloruro de sodio al 37,7% con densidad de 1200.

#### Material

1. Muestra de heces reciente o conservada con formol sal al 10%.
2. Solución saturada de cloruro de sodio al 37,7%.
3. Laminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos 22x22 mm.
4. Baguetas, algodón, alcohol 50%, Lugol, lejía.
5. Tubos de centrifuga de 16x150 mm o frascos limpios de penicilina, gradilla, pipeta Pasteur.
6. Densímetro.
7. Microscopio de 10 y 40 x.

#### Procedimiento

1. Coloque 1 a 2 gr o 1 a 2 cc de heces en el tubo. Agregue 3 a 4 cc de la solución saturada de cloruro de sodio, emulsionar con la bagueta.
2. Colocar el tubo en la gradilla, agregar cloruro de sodio hasta 1 cm antes del borde del tubo.
3. Con la pipeta Pasteur complete la solución de cloruro de sodio hasta formar un menisco en el borde del tubo.
4. Coloque una laminilla cubreobjetos sobre el borde del tubo y deje reposar durante 5 a 15 minutos.
5. Coloque una gota de Lugol en una lámina portaobjetos y ponga la laminilla cubreobjetos sobre la gota de Lugol.
6. Observe al microscopio con objetivo de 10 y luego pase a 40 x.

#### Método de Telemán:

Es un método de sedimentación y centrifugación. Requiere formol sal al 10% y acetato de etilo.

#### Material

1. Muestra de heces en formol sal al 10%.
2. Acetato de etilo.
3. Vaso, colador, gasa, pipeta Pasteur, tetina, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos.
4. Bagueta, algodón, alcohol 50%, Lugol, lejía, tubos de centrifuga, gradilla, papel parafinado, guantes de látex, mascarilla (opcional).
5. Centrifuga.
6. Microscopio con lentes de 10 y 40 x.

#### Procedimiento

1. Cuele la muestra y coloque 2/3 en el tubo de centrifuga.
2. Agregue 1/3 de acetato de etilo, agite el tubo cubriéndolo con papel parafinado.
3. Centrifugue a 2000 rpm durante 5 a 15 minutos.
4. Decante, rompa con la bagueta el tapón de heces que se ha formado en la mitad del tubo.
5. Coloque una gota de Lugol en una lámina portaobjetos.
6. Tome una porción del sedimento con una pipeta Pasteur y coloque en la lámina portaobjetos, cubrir con una laminilla cubreobjetos y observe al microscopio con objetivos de 10x y 40x.



## PRÁCTICA N° 16

### MÉTODOS ESPECIALES PARA EL DIAGNOSTICO DE ENTEROPARÁSITOS

Hay algunos parásitos cuyo diagnóstico no es posible realizar con los métodos anteriores, por esta razón se recurre a técnicas especiales de acuerdo a su comportamiento y/o características biológicas. Entre ellos tenemos:

#### Método de Graham

Llamado también método de la cinta adhesiva, se utiliza para el diagnóstico de huevos de *Enterobius vermicularis* (Oxyuro) y de huevos de *Taenia* sp.

#### Material

1. Lámina portaobjetos, guantes de cirugía, mascarilla.
2. Rollo de cinta scotch de ½ pulgada de ancho.
3. Etiquetas, ficha de datos.
4. Algodón, alcohol 50% lejía.
5. Microscopio con lentes de 10 y 40x.

#### Procedimiento

1. Se prepara la lámina portaobjetos con la cinta adhesiva y que sobresalga 1 cm, a cada extremo de la lámina, en un extremo se pega una etiqueta para los datos del paciente o número de la ficha. El otro extremo se dobla sobre sí mismo, para poder tomar la muestra.
2. Se toma la muestra, desprendiendo la cinta adhesiva, y con ayuda de un baja lengua, se expone la parte adhesiva, o colocando el dedo índice de la mano derecha sobre la parte lisa quedando la parte adhesiva expuesta. (Es preferible, para obtener éxito debe tomarse la muestra en la mañana antes del aseo personal).
3. Con la otra mano, se expone el ano separando los glúteos.
4. Se aplica la cinta adhesiva en la región perineal, se retira y se adhiere nuevamente a la lámina portaobjetos.
5. Se rotula o etiqueta la lámina.
6. Se observa al microscopio a 10 y 40 aumentos. Los huevos se reconocen por su forma, generalmente larvados incoloros, por lo que hay que oscurecer el campo cerrando el diafragma y bajando el condensador del microscopio. Ocasionalmente se puede encontrar huevos de otros parásitos.
7. La muestra puede aclararse colocando y una gota de una solución xilol-Lugol (1:1)