

# **Microbiología General**

## **Manual de Guías de Laboratorio**



## **Visión**

Al 2021, ser la mejor universidad para el Perú y el mundo en el contexto de la Cuarta Revolución Industrial.

## **Misión**

Somos una organización de educación superior dinámica que, a través de un ecosistema educativo estimulante, experiencial y colaborativo, forma líderes con mentalidad emprendedora para crear impacto positivo en el Perú y en el mundo.



## Índice

Visión .....	3
Misión.....	3
<b>PRIMERA UNIDAD</b>	
GUÍA DE PRÁCTICA N° 01: BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA.....	5
GUÍA DE PRÁCTICA N° 02: LIMPIEZA, DESINFECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA SU ESTERILIZACIÓN .....	8
GUÍA DE PRÁCTICA N° 03: PREPARACION DE COLORANTES Y REACTIVOS .....	14
GUÍA DE PRÁCTICA N° 04: MANEJO DEL MICROSCOPIO.....	17
<b>SEGUNDA UNIDAD</b>	
GUÍA DE PRÁCTICA N° 05: COLORACION DIFERENCIALES.....	21
COLORACION ZIEHL-NEELSEN.....	23
GUÍA DE PRÁCTICA N° 6: PREPARACION MEDIOS DE CULTIVO .....	25
GUÍA DE PRÁCTICA N° 7: PREPARACION DE MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES .....	27
GUÍA DE PRÁCTICA N° 8: ESTUDIO DEL DESARROLLO BACTERIANO EN MEDIOS LÍQUIDOS, SEMISÓLIDO Y SÓLIDO.....	30
<b>TERECERA UNIDAD</b>	
GUÍA DE PRÁCTICA N° 9: MÉTODOS DE SIEMBRA.....	33
GUÍA DE PRÁCTICA N° 10: MORFOLOGIA DE LOS HONGOS ESTRUCTURA .....	36
GUÍA DE PRÁCTICA N° 11: PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNOSTICO MICOLOGICO .....	39
GUÍA DE PRÁCTICA N°12: IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS .....	41
<b>CUARTA UNIDAD</b>	
GUÍA DE PRÁCTICA N° 13: RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRA FECALES .....	43
GUÍA DE PRÁCTICA N° 14: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARÁSITOS .....	45
GUÍA DE PRÁCTICA N° 15: METODO CONCENTRADO .....	47
GUÍA DE PRÁCTICA N° 16: MÉTODOS ESPECIALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITOS .....	49



## Guía de práctica N° 01: Bioseguridad en el laboratorio de Microbiología

Sección : ..... Docente: Mg. Freddy Orihuela Villar  
Fecha : / / Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

- Los estudiantes usan lo EPP, antes de ingresar al salón de clases
- Aplican las normas de bioseguridad en todo momento de la práctica.
- Los estudiantes conforman grupos de 5 estudiantes y siguen las indicaciones de la guía de práctica

### 1. Propósito /Objetivo:

Identificar las medidas de bioseguridad para evitar accidentes en el laboratorio de Microbiología.

### Fundamento Teórico

Explica el manejo y manipulación de equipos, material de laboratorio teniendo en cuenta el correcto uso de métodos de barrera y protección personal.

### 2. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1			
2			
3			

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Guardapolvo		
2	Mascarilla		
3	Guantes		
4	Gorra		
5	Lentes		
6	Botas descartables		
7			



### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			
2			

### 3. Indicaciones/instrucciones:

Tomar Las precauciones estándar con el objetivo de disminuir el riesgo de transmisión de microorganismos de fuentes conocidas o desconocidas, entre pacientes y personal de salud.

El conjunto de medidas que deben aplicarse frente a la atención de todos los pacientes. En el laboratorio de microbiología se debe aplicar para la manipulación de toda muestra clínica, independiente de su clasificación de riesgo.

Las precauciones estándar incluyen:

- Lavado o higiene de manos
- Uso de equipo de protección personal cuando es necesario

### 4. Procedimientos:

Evite el contacto de la piel o membranas mucosas con sangre y otros líquidos de precaución universal.

Utilice siempre los elementos de protección personal durante la realización de disecciones, si se realizan: gorro, bata, tapa bocas, gafas de seguridad, botas, guantes, mascarilla.

Use delantal impermeable cuando haya posibilidad de salpicaduras o contacto con fluidos de precaución universal.

Los estudiantes, docentes y trabajadores del Laboratorio de Anatomía deberán lavarse las manos antes y después de cada procedimiento.

Evite accidentes con agujas y elementos punzocortantes.

Los estudiantes, docentes y trabajadores del Laboratorio de Microbiología que presenten lesiones exudativas o por quemadura, deben evitar contacto con el material de estudio.

Utilice guantes en todo procedimiento donde pueda existir riesgo de contacto con sangre y líquidos de precaución universal.

Desarrollar el hábito de mantener las manos lejos de la boca, nariz, ojos y cara. Esto puede prevenir la autoinoculación.

Deberá vacunarse todo el personal que desarrolle su labor en ambientes que tengan contacto, tanto directo como indirecto, con la sangre u otros fluidos biológicos de otras personas infectadas, o en los cuáles se desconoce si están enfermas o portadoras de algún microorganismo que puede ser prevenible por vacunación.

### 5. Resultados

### 6. Conclusiones



## **7. Sugerencias y /o recomendaciones**

Tener en cuenta siempre los

### **Principios de la Bioseguridad:**

- A) **Universalidad:** Las medidas deben involucrar a todas las muestras de tejidos y reactivos con los que se trabaje en el Laboratorio. Todo el personal debe seguir las medidas de precaución estandarizadas con el fin de prevenir la exposición de la piel y de las membranas mucosas, en todas las situaciones que puedan dar origen a accidentes de trabajo, estando o no previsto el contacto con las muestras.
- B) **Uso de barreras:** Comprende el concepto de evitar la exposición directa a fluidos orgánicos que se consideren de riesgo contaminante, mediante la utilización de materiales adecuados que se interpongan al contacto de los mismos. La utilización de barreras (Ej.: Guantes) no evitan los accidentes por exposición a estos fluidos, pero disminuye las consecuencias de dicho accidente.
- C) **Medios de eliminación de material contaminado:** Comprende el conjunto de dispositivos y procedimientos adecuados, a través de los cuales los materiales utilizados son depositados en los recipientes adecuados y eliminados sin riesgo.

## **8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

[http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1408/Medidas\\_HuatucoJulca\\_Jim.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1408/Medidas_HuatucoJulca_Jim.pdf?sequence=1&isAllowed=y)



## Guía de práctica N° 02: LIMPIEZA, DESINFECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA SU ESTERILIZACIÓN

Sección : .....Docente: Mg. Freddy

Orihuela Villar Fecha : / / Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

Deben mantener los mandiles abrochados, ya que nos van a ofrecer protección frente a salpicaduras y derrames de sustancias

En el laboratorio siempre es recomendable llevar recogidos los cabellos, ya que el pelo largo puede engancharse en los montajes y equipos y también es más fácil que se contamine con los productos

No se debe comer ni beber dentro del laboratorio, tampoco es aconsejable mascar chicle mientras se realicen las prácticas, ya que los alimentos o bebidas pueden contaminarse con productos químicos.

Está prohibido fumar dentro de los laboratorios, ya que son zonas donde hay bastantes productos químicos inflamables

No llevar pulseras, colgantes o mangas anchas que puedan engancharse en los montajes.

Es aconsejable lavarse las manos siempre que se tenga contacto con algún producto químico y antes de salir del laboratorio.

### 1. Propósito /Objetivo:

Realizar limpieza y desinfección del material de laboratorio y adquirir habilidad en el manejo del mismo y  
Clasificar los materiales de acuerdo a su naturaleza

### 2. Fundamento Teórico:

Es necesario que antes de comenzar cualquier trabajo experimental, el alumno conozca la diferencia entre un material limpio y un material estéril. Para el uso dentro del laboratorio de Microbiología Cada uno de los materiales tiene una función y su uso debe ser acorde con la tarea a realizar. La utilización inadecuada de este material da lugar a errores en las experiencias realizadas y aumenta el riesgo en el laboratorio.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos:

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Mechero bunsen		
2	Horno		
3	Autoclave		
4	Luz rayo ultravioleta		
5	Estufa		



### 3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Trípode y rejilla		
2	Porta tubos	13 x 15	
3	Pinza		
4	Mortero		
5	Varilla de vidrio		
6	Pizeta		
7	Termómetro		
8	Vaso de precipitación	250 ml	
9	Matraz Erlenmeyer		
10	Embudo de vidrio		
11	Tubo de ensayo		
12	Placa Petri		

### 3.3. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Hipoclorito de sodio		
2	Dicromato de potasio		
3	Fenol 5 %		
4	Alcohol de 70 grados		

## 4. Indicaciones/instrucciones:

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.

AUTOCLAVE (ver esquema)

La 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 la autoclave.

### Componentes de la autoclave

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





2. Soporte de la canasta: Se encuentra en el fondo de la autoclave y sostiene la canasta por encima del nivel del agua.
3. Drenaje: Llave de paso colocada en la base de la caldera, por donde sale el exceso de agua.
4. Tapa: Esta cubre y cierra herméticamente la caldera, se ajusta mediante una arandela de jebe.
5. 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.
6. 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.
7. Válvula de seguridad: Esta válvula deja escapar el vapor cuando la presión se eleva demasiado, evitando que ocurra una explosión.
8. Manómetro: Se ubica en la parte superior de la tapa, indica las libras de presión de vapor de agua.
9. 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 el 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 calentar 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.



#### 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.

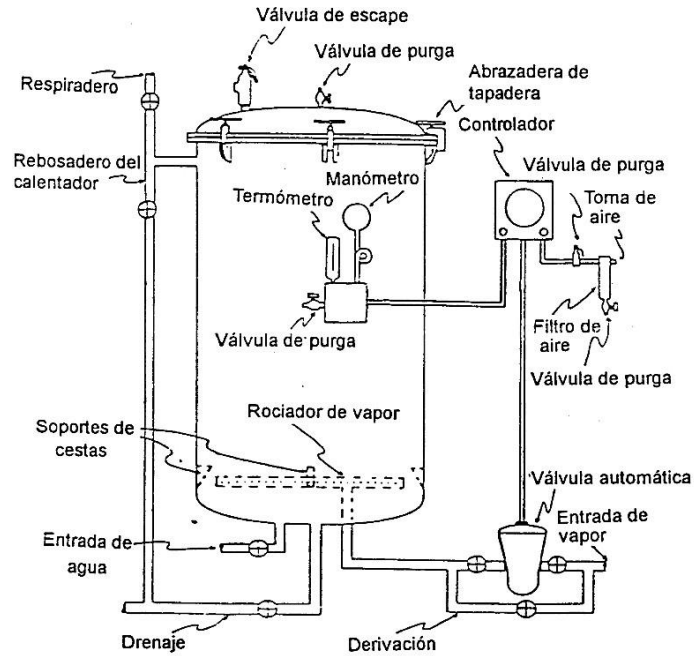
$$\text{Dosis de radiación} = \frac{\text{Energía UV}}{\text{X}} \times \frac{\text{Tiempo UV Sec}}{\text{cm}}$$

#### Área irradiada

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.



## Autoclave Vertical (Calor húmedo)

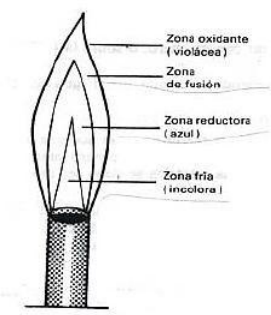












## Estufa (Calor seco)





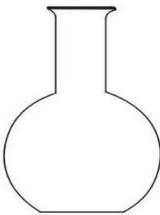













CRISTALERIA Y  
OTRO  
MATERIALES



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

CRISTALERÍA Y OTROS APARATOS PEQUEÑOS



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



## **5. Resultados**

## **6. Conclusiones**

## **7. Sugerencias y /o recomendaciones**

Se sugiere a los estudiantes leer la guía práctica antes de comenzar a utilizar los materiales para su reconocimiento y su buen uso

## **8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

[http://www.ing.unp.edu.ar/asignaturas/quimica/practicos\\_de\\_laboratorio\\_pdf/lab1.pdf](http://www.ing.unp.edu.ar/asignaturas/quimica/practicos_de_laboratorio_pdf/lab1.pdf)



## Guía de práctica N° 03: PREPARACION DE COLORANTES Y REACTIVOS

Sección : .....Docente: Mg. Freddy Orihuela villar Fecha : / / Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

El primer paso en cualquier estudio bacteriológico consiste en la preparación de colorantes y reactivos para lograr la observación microscópica de los microorganismos dentro de una muestra clínica. Una observación directa, sin coloración, nos dará escasa información sobre los microorganismos. Para obtener mayor información debemos colorear el material que vamos a estudiar y lo haremos con una o varias técnicas que nos den las características deseadas.

### 1. Propósito /Objetivo:

Preparar los colorantes y reactivos siguiendo las técnicas según los protocolos establecidos  
Clasificar los colorantes y reactivos de acuerdo a su naturaleza

### 2. Fundamento Teórico:

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.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos:

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio		
2	Mechero de bunsen		
3	Agitador magnético		
4	Balanza analítica		



### 3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Varilla de coloración		
3	Hisopos		
4	Asa de cool		
5	Probeta, fiola, matraz		
6	Vaso de precipitación		
7	espatula		

### 3.3. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cristal violeta		
2	Cristales de yodo		
3	Yoduro de potasio		
4	Alcohol de 96		
5	Acetona qp		
6	Safranina		
7	Oxalato de NH <sub>4</sub>		
8	Azul de metileno		
9	Fucsina		
10	Acido clorhídrico qp		
11	Cristal de fenol		
12	Agua destilada		

### 4. Indicaciones/instrucciones:

1. Es una técnica muy sencilla que se basa en el uso de un colorante (tinción) y que tiene una gran utilidad en medicina y que permite observar las bacterias mejor que bajo el microscopio.
2. La gran aportación práctica de la tinción de **Gram** es que permite determinar el tipo de antibiótico, así como su eficacia

### 5. Procedimientos:

#### COLORACION GRAM

Cristal violeta o violeta de genciana: Cristal violeta..... 2g  
Alcohol etílico 96 °..... 20 ml  
Oxalato de NH<sub>4</sub>.....0.8 gr  
Agua destilada..... 100 ml  
Mezclar y disolver

#### Alcohol – acetona:

Acetona q p .....50 ml  
Alcohol etílico de 96°.....50 ml  
Medir y mesclar





#### **Lugol:**

Yodo de cristales..... 1 g Yoduro  
de potasio..... 2 g Agua  
destilada..... 100 ml

Mezclar esta solución en un frasco de vidrio oscuro con el resto del agua destilada.

#### Safranina:

Safranina O..... 2.5 g  
Alcohol de 96° .....20 ml  
Agua destilada.....100 ml

Mezclar y disolver

### COLORACION ZIEHL- NEELSEN

#### **Carbolfucsina:**

Cristales de fenol.....2.5 ml  
Alcohol de 96° .....5 ml  
Fucsina básica .....0.5 gr  
Agua destilada .....100 m

#### **Decolorante: (Alcohol ácido 3 %)**

HCL q p ..... 3 ml  
Alcohol 96° .....100 ml  
Medir y mesclar

#### **Azul de metileno:**

Azul de metileno .....0.5 gr  
Ácido acético glacial.....0.5 ml  
Agua destilada .....100 ml  
Medir y mesclar

### **6. Resultados**

### **7. Conclusiones**

### **8. Sugerencias y /o recomendaciones**

Los colorantes y reactivos son fundamentales su uso en de microbiología desde finales del siglo XIX. y tiene una gran utilidad en medicina para lograr el objetivo se sugiere a los estudiantes realizar siguiendo los pasos y colorantes correctamente.

### **9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

<https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/3803/Koneman-Diagnostico-microbiologico.html>



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 04: MANEJO DEL MICROSCOPIO

Sección : .....Docente: Mg. Freddy Orihuela Villar Fecha : / / Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

Es importante conocer la estructura del microscopio para su correcto uso  
Colocarse el equipo de protección personal y utilizar el material de bioseguridad.  
Utilizar la guía práctica para seguir para el manejo correcto

### 1. Propósito /Objetivo:

Conocer el funcionamiento, componentes, cuidados y limpieza del microscopio óptico y el microscopio

### 2. Fundamento Teórico:

El instrumento básico para el estudio de células y tejidos es el MICROSCOPIO DE LUZ, su poder resolutivo es la capacidad de hacer que aquellos objetos que están muy juntos aparezcan separados; para que nos demos una idea el poder resolutivo del ojo humano es de aproximadamente 0.1 mm, de modo que si dos líneas están separadas entre sí por menos de 0.1 mm, dichas líneas aparecerán como una sola línea, no importa cuánto se acerque el observador a ellas; para tener un ejemplo, la mayoría de las células tienen un diámetro inferior a 0.1 mm es decir sin ayuda de lentes la vemos como una sola estructura.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio		

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Varillas de coloración		
3	Hisopos		
4	Asa de col		
5	Papel lente		

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Fucsina fenicada		
2	Alcohol acido		
3	Azul de metileno		

### 4. Indicaciones/instrucciones:

El microscopio debe ser transportado utilizando LAS DOS MANOS A LA VEZ, con la mano izquierda se sujeta por el brazo y con la mano derecha se sujeta por la parte inferior.

Antes de trasladarlo asegúrese de que todas las piezas que lo componen están aseguradas a él; asegúrese sobre todo objetivos, platina, espejo, lámpara y cable de luz enrollado.



Sitio de utilización. La superficie de uso debe ser firme, plana, estar LIMPIA, sin ningún objeto. El contacto tomacorriente debe estar a una distancia para que el cable no quede ni muy tenso ni muy holgado, el cable debe estar ubicado de tal manera que durante su uso no estorbe ni puedan atorarse los usuarios.

## 5. Procedimientos:

Uso del microscopio.

Durante su uso, POR NINGÚN MOTIVO debe ser movido de su lugar, como el uso del microscopio es común, los usuarios son los que deben moverse para hacer las observaciones. La intensidad de la luz debe ser regulada de tal manera que NO SOBREPASE la mitad de graduación máxima, lo ideal es un tercio, esto con varias finalidades: no calentar demasiado los microscopios, no dañar los reguladores, no sobre calentar los focos y con ello fundirlos y sobre todo no perjudicar la retina del usuario. Por ningún motivo deben ponerse al microscopio material de cristalería que este húmedo o que contenga alguna sustancia (colorante, solvente, reactivo, agua); únicamente debe hacer contacto con el microscopio material de cristalería: portaobjetos, cajas petri, vidrios de reloj, portaobjetos escavados. NO poner material directamente sobre la platina o la placa de observación.

### LIMPIEZA OPTICA.

Para evitar la contaminación de las superficies ópticas.

Mantener el microscopio cubierto con su funda cuando no está en uso.

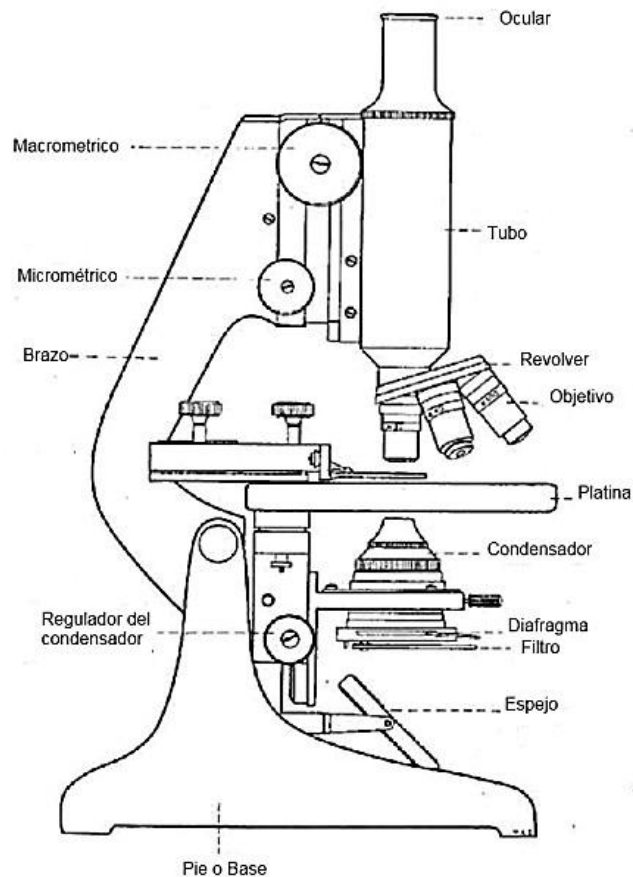
No toque los lentes con ningún objeto, sobre todo ponga atención en párpados, pestañas, dedos, aceite de inmersión. Los ojos del usuario no deben contener ninguna pintura, polvo, etc.

No frote los lentes con objetos que pudieran tener abrasivos o partículas que pudieran dañarlos (batas, pañuelos, papel absorbente, camisas, etc)

No ponga en el microscopio portaobjetos que contengan en la superficie inferior: agua, aceite, resina, jalea, o cualquier medio de montaje, etc.

Se pueden remover partículas sueltas por medio de soplar con una perilla de aire.

Otros contaminantes se quitan con disolventes como alcohol isopropílico; antes de usar un disolvente, cerciórese de que lo que va hacer no es perjudicial al microscopio; estos se aplican con frotación con papel de lentes, papel seda o con algodón limpio. Estos materiales no se vuelven a usar, porque podrían acarrear abrasivos, huellas digitales u otras películas delgadas de grasa pueden quitarse con disolventes según el paso (en caso de que estén los lentes sucios, el técnico responsable del laboratorio es quien deberá realizar esta operación).





## **6. Resultados**

## **7. Conclusiones**

## **8. Sugerencias y /o recomendaciones**

Utilizar todas las medias de bioseguridad

## **9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

<https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2016/08/practica-1.pdf>



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 05: COLORACION DIFERENCIALES (Gram y Zielh Neelsen)

Sección : .....Docente: Mg. Freddy

Orihuela Villar Fecha : / / Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

El primer paso en cualquier estudio bacteriológico consiste en la observación microscópica de la muestra. Una observación directa, sin coloración, nos dará escasa información sobre los microorganismos. Para obtener mayor información debemos colorear el material que vamos a estudiar y lo haremos con una o varias técnicas que nos den las características deseadas.

La coloración Gram Es un tipo de tinción diferencial que nos permite diferenciar las bacterias según sus características morfológicas. por lo tanto, es de vital importancia seguir los pasos correctamente ya establecidos con los diferentes reactivos, para lograr una buena coloración

### 1. Propósito /Objetivo:

Identificar a las bacterias Gram positivas y Gram negativas  
Reconocer las formas de las bacterias como son los Cocos, bacilos, espirilos

### 2. Fundamento Teórico:

**Cristal Violeta:** Tiñe a los Gram positivos, debido a la capa gruesa de peptidoglucanos.

**Lugol:** Mordiente, retiene al cristal violeta. **Alcohol acetona:** Decolora a los Gram negativos por la poca cantidad de peptidoglucanos. **Safranina:** Tiñe a los Gram negativos.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos:

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio		
2	Mechero de bunsen		
3			

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Varillas de coloración		
3	Hisopos		
4	Asa de siembra		



### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cristal violeta		
2	Alcohol acetona		
3	Safranina		
4	Aceite de inmersión		
5	Alcohol de isopropílico		
6	Lugol		

### 3. Indicaciones/instrucciones:

Es una técnica muy sencilla que se basa en el uso de un colorante (tinción) y que tiene una gran utilidad en medicina y que permite observar las bacterias mejor que bajo el microscopio.

La gran aportación práctica de la tinción de **Gram** es que permite determinar el tipo de antibiótico, así como su eficacia

### 4. Procedimientos:

Hacer frotis y fijarlo Agregar:

Cristal violeta x 2 minutos. Y enjuagar con agua corriente. Lugol x 1 minutos. Y enjuagar con agua corriente.

Alcohol acetona x 15 - 30 segundos. Y enjuagar con agua corriente. Safranina x 1 minutos. Y enjuagar con agua corriente.

Dejar secar a temperatura ambiente

Leer con aceite de inmersión con el objetivo de 100 X

### 5. Resultados

### 6. Conclusiones

### 7. Sugerencias y /o recomendaciones

La tinción de Gram se utiliza en microbiología desde finales del siglo XIX. Es una técnica muy sencilla que se basa en el uso de un colorante (tinción) y que tiene una gran utilidad en medicina para lograr el objetivo se sugiere a los estudiantes realizar siguiendo los pasos y colorantes correctamente.

### 8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

<https://biolprocariotas.files.wordpress.com/2010/03/microbiologia-general.pdf>



## COLORACION ZIEHL-NEELSEN

### Instrucciones:

Es importante efectuar el extendido fino sobre un portaobjeto limpio y perfectamente desengrasado  
Encender el mechero, para crear un ambiente aséptico.  
Colocarse guantes y material de bioseguridad.  
es importante seguir y cumplir con los tiempos establecidos en cada etapa de los colorantes para lograr una buena coloración.  
Utilizar la guía práctica para seguir los pasos correctamente

### 1. Propósito /Objetivo:

Identificar los bacilos alcohol ácido resistentes

### 2. Fundamento Teórico:

**Fucsina:** Interactúa con los ácidos grasos de la pared celular, su tinción mejora con el calor por su aspecto ceroso. **Alcohol ácido:** Elimina la fucsina en aquellos que su membrana no es afín al colorante. **Azul de Metileno:** Las estructuras decoloradas absorben el colorante.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio		
2	Mechero de bunsen		
3	Mechero de alcohol		

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Varilla de coloración		
3	Hisopos		
4	Asa de col		

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Fucsina fenicada		
2	Alcohol ácido		
3	Azul de metileno		

### 4. Indicaciones/instrucciones:

El diagnóstico definitivo de las enfermedades infecciosas causadas por micobacterias se basa en la demostración de su agente etiológico. Esto se consigue, entre Las técnicas de coloración y el buen estado de los colorantes para lograr teñir al micobactenas, esta técnica es conocida desde hace más de un siglo y han sido ampliamente difundidas. Por lo tanto, las indicaciones serian que los estudiantes sigan correctamente la técnica y el uso de los colorantes



## **5. Procedimientos:**

### **Muestra: esputo**

Hacer frotis de esputo de 2cm x 1 cm. Y fijarlo. agregar  
Fucsina x 4 minutos. y flamear la muestra hasta obtener 3 vapores; enjuagar. luego  
Decolorante x 4 minutos; enjuagar. luego  
Azul de metileno x 4 minutos; enjuagar

## **6. Resultados**

## **7. Conclusiones**

## **8. Sugerencias y /o recomendaciones**

Utilizar todas las medias de bioseguridad

## **Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

file:///D:/Descargas%20de%20Google/1964-  
Texto%20del%20manuscrito%20completo%20(cuadros%20y%20figuras%20insertos)-7352-1-  
10-20130819.pdf





## Guía de práctica N° 6: PREPARACION MEDIOS DE CULTIVO

Sección : .....Docente: Mg.T.M. Freddy  
Orihuela Villar Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

Evitar ingerir microorganismos por accidente, al llevarse los dedos o el lápiz a la boca.  
No frotarse los ojos o la nariz con las manos contaminadas.  
Las heridas en las manos deben vigilarse, ya que pueden ser una puerta de entrada a la infección. En caso de tenerlas, deben cubrirse adecuadamente con guantes quirúrgicos  
La preparación de los medios de cultivos como el agar sangre son muy sensibles a la contaminación ambiental, Por lo tanto, tenemos que seguir las instrucciones de cada medio de cultivo para lograr un buen preparado de los medios.

### 1. Propósito /Objetivo:

Identificar e Aislar de bacterias Gram positivas, negativas y hongos bacterias patógenas en los seres humanos.

### 2. Fundamento Teórico

El **agar sangre** es un medio de cultivo sólido enriquecido, diferencial pero no selectivo. Es utilizado para la recuperación y crecimiento de una gran variedad de microorganismos provenientes de muestras clínicas o para subcultivos.

### 3. Equipos, Materiales y

#### Reactivos 3.1 Equipos

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placas Petri		
2	Laminas porta objetos		
3	Laminas cubre objeto		
4	Matraz	250 ml	
5	Espátula		
6	Papel Graff		
7	Hilo pabilo		
8	Mechero de bunsen		



### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agar tripticasa soya		
2	Agua destilada		

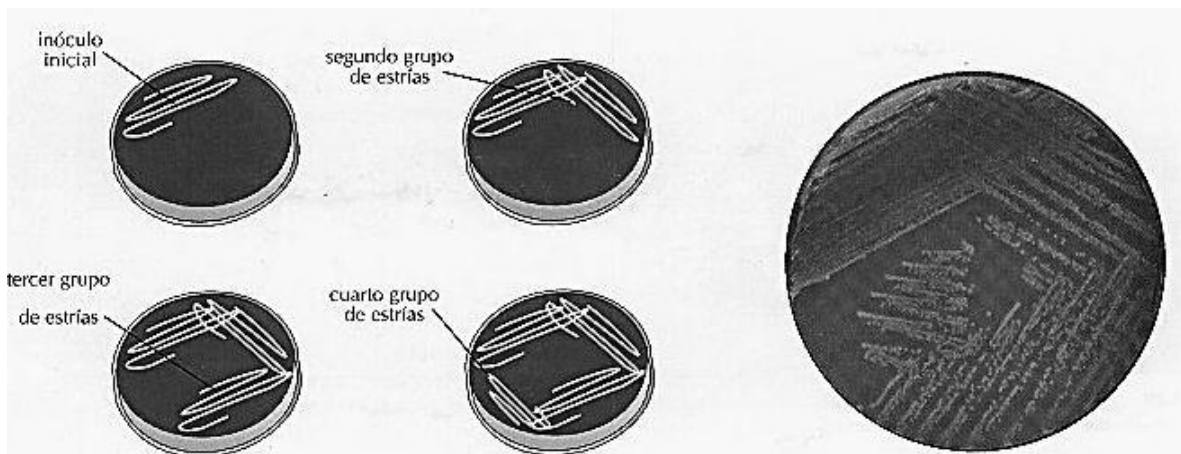
#### 4. Indicaciones/instrucciones:

#### 5. Procedimientos:

1. Preparar 100 ml del agar tripticasa soya y esterilizar a la autoclave.
2. Colocarlo 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 esterilizar, 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.

#### METODOS DE SIEMBRA MICROBIANA



#### 6. Resultados

#### 7. Conclusiones

#### 8. Sugerencias y /o recomendaciones

Utilizar las medidas de bioseguridad

#### 9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces

**recomendados** Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 7: PREPARACION DE MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES

Sección : .....Docente: Mg. T.M. Freddy  
Orihuela Villar Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

En estas prácticas vamos a utilizar especialmente el calor como método de esterilización

La presencia de microorganismos en todos los medios ambientales hace imprescindible que para estudiar una bacteria determinada sea necesario destruir todas aquellas que pudieran encontrarse contaminando los medios o los instrumentos de trabajo. Esto se consigue mediante la ESTERILIZACION, usando el mechero de bunsen

Los medios con contenido acuoso han de ser esterilizados en el AUTOCLAVE mediante calor húmedo, a 121 (2 atm) o 111 °C (1.5 atm) difunde muy rápidamente, haciendo que los elementos termosensibles de las células se desnaturalicen, especialmente sus enzimas.

estudiante debe tener en consideración de seguir las indicaciones correctamente ya que la siembra es el procedimiento por el cual un microorganismo en contacto con un medio de cultivo puede desarrollarse y multiplicarse, dando lugar a la formación de colonias aisladas

### 1. Propósito /Objetivo:

Aislamiento e identificación de bacterias Gram positivas, negativas bacterias patógenas en los seres humanos

### 2. Fundamento Teórico

El **agar MacConkey** es un medio de cultivo sólido que permite el aislamiento exclusivo de bacilos Gram negativos.

El **agar sal y manitol** o manitol salado es un medio de cultivo sólido, selectivo y diferencial. Fue creado por Chapman para el aislamiento de cocos Gram positivos patógenos, especialmente *Staphylococcus aureus*.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza eléctrica		
2	Autoclave		



### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placa Petri		
2	Laminas porta objeto		
3	Laminas cubre objeto		
4	Matraz	250 ml	
5	Espátula		
6	Papel Graff		
7	Hilo pabilo		
8	Mechero de bunsen		

### 3.2. Reactivos

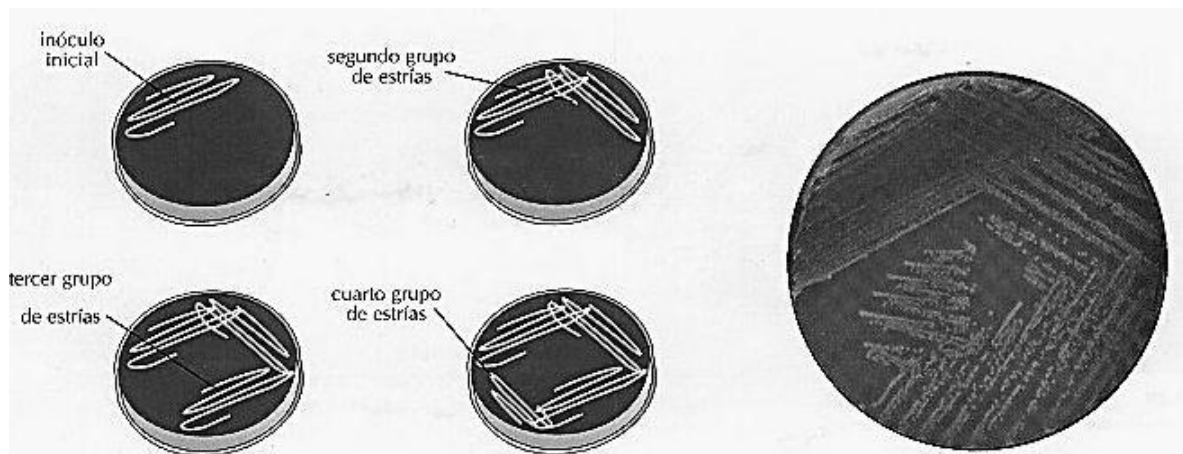
Íte m	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agar mac konkey		
2	Agar manitol salado		
3	Agua destilada		

### 4. Indicaciones/instrucciones:

### 5. Procedimientos:

Preparar 100 ml del mac konkey y manitol salado esterilizar a la autoclave. Mezclar con movimientos rotatorios suaves, para obtener un buen homogenizado. Repartir la mezcla en placas Petri estériles, aproximadamente 20 a 25 ml en cada una. Dejar solidificar y realizar el control de esterilizar, durante 24 – 48 horas a 37 °C Conservar refrigerado a 4°C hasta su empleo.

### METODOS DE SIEMBRA MICROBIANA



### 6. Resultados



## **7. Conclusiones**

## **8. Sugerencias y /o recomendaciones**

Utilizar las medidas de bioseguridad

## **9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000.  
Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 8: ESTUDIO DEL DESARROLLO BACTERIANO EN MEDIOS LÍQUIDOS, SEMISÓLIDO Y SÓLIDO

Sección : .....Docente: Mg. T.M. Freddy  
Orihuela Villar Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

En estas prácticas vamos a utilizar especialmente el calor como método de esterilización. La presencia de microorganismos en todos los medios ambientales hace imprescindible que para estudiar una bacteria determinada sea necesario destruir todas aquellas que pudieran encontrarse contaminando los medios o los instrumentos de trabajo. Esto se consigue mediante la ESTERILIZACIÓN, usando el mechero de bunsen.

Los medios con contenido acuoso han de ser esterilizados en el AUTOCLAVE mediante calor húmedo, a 121 (2 atm) o 111 °C (1.5 atm) difunde muy rápidamente, haciendo que los elementos termosensibles de las células se desnaturalicen, especialmente sus enzimas.

estudiante debe tener en consideración de seguir las indicaciones correctamente ya que la siembra es el procedimiento por el cual un microorganismo en contacto con un medio de cultivo puede desarrollar y multiplicarse, dando lugar a la formación de colonias aisladas,

### 1. Propósito /Objetivo:

Identificar el crecimiento y desarrollo bacteriano en medios líquidos, sólidos y semisólidos

### 2. Fundamento Teórico

El **caldo Trypticase soja** es un medio de cultivo líquido que permite reconocer el desarrollo bacteriano por enturbiamiento del medio.  
El medio de cultivo MIO es semisólido nos permite observar el crecimiento bacteriano, si la bacteria es inmóvil el desarrollo se presenta limitado a lo largo de la siembra por puntura, si es móvil crece en todo el tubo.  
Cultivo sólido EMB, nos permite observar las características morfológicas de las colonias

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza eléctrica		
2	Autoclave		
3	Mechero de bunsen		

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placa Petri		
2	Laminas porta objeto		
3	Laminas cobre objeto		
4	Matraz	250 ml	
5	Espátula		
6	Papel Graff		
7	Hilo pabilo		



### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agar EMB		
2	Caldo tripticasa soja		
3	Agar MIO		
4	Agua destilada		

## 4. Indicaciones/instrucciones:

### Indicaciones:

### Procedimientos:

#### Caldo soya tripticasa

Para preparar el caldo soya tripticasa se deben pesar 30 gr del medio comercial deshidratado en una balanza digital. Luego se disuelve en un litro de agua destilada contenida en una fiola.

La mezcla se deja en reposo por 5 minutos y posteriormente se lleva a una fuente de calor para ayudar a la disolución del medio. Se debe agitar frecuentemente mientras hierve por 1 minuto.

Una vez disuelto se distribuye en tubos del tamaño adecuado según se necesite. Se pueden usar tubos con tapón de algodón o con tapas de baquelita. Posteriormente, se esterilizan los tubos con el medio en la autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

El pH del medio debe quedar en  $7,3 \pm 0,2$

Se debe tener en cuenta que el color del medio de cultivo deshidratado es beige claro y debe almacenarse entre 10 a 35°C, en lugar seco. Mientras que el caldo preparado es de color ámbar claro y debe guardarse en nevera (2 a 8°C).

#### Agar EMB

El medio original deshidratado es de color beige claro.

Para preparar este medio de cultivo se deben pesar 36 gramos del medio deshidratado y suspenderlo en una fiola que contenga un litro de agua destilada.

Después de dejar la mezcla 5 minutos en reposo, llevar la fiola a una fuente de calor, mezclando de forma vigorosa y constante hasta que hierva y se logre disolver totalmente.

Posteriormente, se debe esterilizar el medio de cultivo ya disuelto utilizando la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

Terminado el tiempo, se saca del autoclave y se deja reposar brevemente. Luego se sirve aún caliente (45 – 50°C) entre 15 a 20 ml de agar en cada placa de Petri estéril. El medio debe ser azul tornasol.

Después de servidas las placas se dejan ligeramente destapadas hasta que el agar enfríe un poco. Luego se tapan y se deja que solidifiquen completamente. Posteriormente se ordenan en porta plaqueros en forma invertida y se guardan en nevera (8°C) hasta su uso.

Este procedimiento se realiza preferiblemente en una campana de flujo laminar o frente al mechero de Bunsen para evitar que se contaminen.

Es importante tener presente que cada casa comercial indicará la cantidad a pesar para preparar el medio de cultivo.

El pH final del medio debe ser de

$7.2 \pm 0.2$  Agar MIO

Suspender 31 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Distribuir en tubos de tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos



## **5. Resultados**

## **6. Conclusiones**

## **7. Sugerencias y /o recomendaciones**

Utilizar las medidas de bioseguridad

## **8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000.  
Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires





## GUÍA DE PRÁCTICA N° 9: MÉTODOS DE SIEMBRA

Sección : .....Docente: M.g. T.M. Freddy  
Orihuela Villar Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

Estudiante tener cuidado en la utilización correcta de los métodos de siembra  
Utilizar la guía práctica para seguir los pasos del procedimiento correctamente  
Utilizar con mucho cuidado el material del laboratorio

### 1. Propósito/objetivo:

Conocer los diferentes métodos de siembra en microbiología para el aislamiento, identificación y sensibilidad

### 2. Fundamento Teórico:

Sembrar: Es el acto de colocar el material bacteriológico en el medio de cultivo para promover su crecimiento y desarrollo, y subsiguiente multiplicación. El resultado de una siembra se llama: Cultivo Las siembras pueden ser:  
Primarias: cuando el material es inoculado en los medios por primera vez.  
Secundarias: cuando el material a inocular procede de una siembra primaria.

### 3. Equipos, Materiales y reactivos:

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Horno		
2	Autoclave		
3	Microscopio		
4	Balanza de Sensibilidad		
5	Mechero de bunsen		

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos de ensayo	12 X75	
2	Placas Petri descartables		
3	Tubos de ensayo	13 x 100	
4	Asa aro, y punta	1/ 1000	
5	Hisopos largos de algodón		
6	Fosforo		



### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agar MIO		
2	Agar SS		
3	Medio de TSI, LIA, Citrato de Simmons		
4	Agar Muller Hinton		
5	Caldo BHI		

### 4. Indicaciones e instrucciones:

Cumplir con las medidas de bioseguridad como es:

Uso de material de barrera como son guantes guardapolvo, mascarilla, cofia, gorro.

#### Procedimiento experimental:

**Siembra por dilución:** Se toma el tubo de ensayo con medio líquido BHI. Se toma el material a diluir y se siembra en el tubo con el uso del asa cargada con el material bacteriológico, se agita, con movimientos moderados.

Medio de cultivo: Líquido BHI

Instrumento: Asa en aro

Finalidad: poner la bacteria en suspensión.

**Siembra por estrías en superficie:** Se siembra el material en la superficie del agar tripticosa soya inclinado en un tubo de ensayo, allí se extiende por toda la superficie con el asa en punta bacteriológica, previamente esterilizada y cargada con el material a sembrar, haciendo estrías no muy amplias, pero tampoco muy estrechas. Se inicia por la parte más profunda de la superficie inclinada y se termina la estría en la parte más cerca de la boca del tubo.

Medio de cultivo: agar base

inclinado TSI Instrumento: asa o

aguja bacteriológica.

**Siembra por estría por agotamiento:** Con éste procedimiento se puede conseguir una buena separación de las colonias y aislarlas fácilmente. Para ello se funde el medio de cultivo SS, se vuelca en caja de Petri y se deja solidificar. Con el asa previamente esterilizada se toma material de un cultivo heterogéneo y se descarga sobre la superficie del medio formando estrías. Esto puede realizarse de varias formas:

Al comienzo se coloca el inóculo, luego se continúa con las estrías. Cuando se quiere obtener colonias muy separadas se puede utilizar dos o tres placas de Petri, para lo cual se repite la operación sin tomar con el asa nuevo material. Se puede dividir la placa de Petri en cuatro cuadrantes; una vez depositado el material en el primero, siguiendo el sentido de las agujas del reloj, se hace una estría luego en el segundo, tercero y cuarto cuadrante sin cargar nuevamente el asa; en el último cuadrante aparecerán las colonias aisladas. El inóculo se extiende sobre una pequeña zona de la placa, próxima al borde, se esteriliza el asa y se traza otra estría a partir del depósito y así sucesivamente.

Medio de cultivo: sólido en placa de Petri

agar SS Instrumento. Asa en aro

Finalidad. Obtener colonias aisladas

**Por picadura o punción:** Con una aguja se toma el material que se quiere sembrar y se lo introduce en el tubo, con medio semisólido. Introducir la aguja hasta el fondo, formando un canal de punción, trayecto por el cual la retiraremos luego. Este método se utiliza para estudiar la movilidad de las bacterias.

Medio de cultivo: Semisólido MIO

Instrumento: aguja bacteriológica

Finalidad: Estudiar la movilidad de las bacterias



**1. Resultados:**

**2. Observaciones:**

El uso del asa de colle de puntura y aro dependerá de la muestra y del medio de cultivo a usar

**3. Conclusiones:**

Anotar los hallazgos importantes y realizar el informe

**4. Sugerencias y/o recomendaciones:**

Utilizar las medidas de bioseguridad

**5. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., H.M. 2000.  
Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamerican ,  
Sommers B. Aires



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 10: MORFOLOGIA DE LOS HONGOS ESTRUCTURA

Sección : .....Docentes: Mg. Freddy  
Orihuela Villar Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### Instrucciones:

Estudiante utilizar las medidas de bioseguridad y seguir los pasos correctamente teniendo en consideración los tiempos de los reactivos para lograr la observación de las estructuras morfológicas de los hongos.

Esterilizar el material a utilizar en el laboratorio

Lavarse las manos después de terminar las practicas

Utilizar papel filtro y alcohol isopropílico para limpiar los lentes del microscopio

### 1. Propósito /Objetivo:

Reconoce 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.

### 2. Fundamento Teórico

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

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio		

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Laminillas		
3	Asa de cool		
4	Mechero bunsen		
5	Fosforo		
6	Hisopos		

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Azul de lactofenol		
2	KOH 10 %		
3	Agua destilada		



### 3.4. Muestras

Ítem	Muestras	Característica	Cantidad
1	Cultivo de Hongos levaduriformes y Filamentos		

#### 4. Indicaciones/instrucciones:

#### 5. PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

Se describen básicamente dos tipos de estudios, el examen directo y el cultivo.

Para asegurar una recuperación de hongos a partir de muestras clínicas, éstas deben de procesarse de inmediato mediante su inoculación sobre medios de cultivo.

##### EXAMEN DIRECTO

Este procedimiento no sustituye al cultivo. Brinda información preliminar o presuntiva al ser una técnica rápida que puede ser útil al clínico y en algunos casos llegar a ser diagnóstica.

Es así, que la presencia de hifas cenocíticas en pacientes con cetoacidosis diabética puede ser de gran valor para iniciar tratamiento contra posible mucormicosis. Entre los principales exámenes directos tenemos:

##### Hidróxido de potasio (KOH) 20%

Disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar a la llama ligeramente la preparación. Adicionalmente, se puede emplear colorantes para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización. La observación de hifas, permite sugerir la presencia de invasión micótica.

##### Tinta china

Es un método de contraste. Permite visualizar la cápsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura.

Existen artefactos (hematíes, burbujas de aire, leucocitos, gotas de grasa y partículas de talco) que pueden interferir y confundir al analista. La sensibilidad de la técnica es de 50% en pacientes sin VIH y se puede incrementar hasta 88% en pacientes VIH con meningitis criptocócica.

##### Coloración Giemsa

Es de utilidad para el diagnóstico de histoplasmosis, neumocistosis y otras micosis. Permite visualizar blastoconidias intracelulares al polimorfonuclear, como la fase tisular del *H. capsulatum*.

##### Coloración Gram

Es útil para observar blastoconidias y pseudomicelios de las especies del género *Candida*, *Malassezia* y *Cryptococcus*, las cuales son Gram positivas con variaciones en la intensidad de la coloración.

#### 6. Resultados

#### 7. Conclusiones



**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

Utilizar las medidas de bioseguridad

**9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces**

**recomendados** Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr.,  
Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition.  
Ed. Panamericana, B. Aires



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 11: PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNOSTICO MICOLOGICO

Sección : .....Docente: M.g. T.M. Freddy Orihuela Villar  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### 1. Propósito /Objetivo:

Prepara los medios de cultivo agar Sabouraud específico para hongos patógenas en los seres humanos.

### 2. Fundamento Teórico

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza eléctrica		
2	autoclave		

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placas Petri		
2	Laminas porta objeto		
3	Laminas cubre objeto		
4	Matraz	250 ml	
5	Espátula		
6	Papel Graff		
7	Hilo pabilo		
9	Mechero bunsen		

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agar sabouraud		
2	Agua destilada		
3			



**4. Indicaciones/instrucciones:**

**5. Procedimientos:**

Preparar 100 ml del agar Sabouraud y esterilizar a la autoclave. Colocarlo en Baño María y mantenerlo a una temperatura de 45°C. siempre junto a la llama del mechero.

Mezclar con movimientos rotatorios suaves, para obtener un buen homogenizado. Repartir la mezcla en placas Petri estériles, aproximadamente 20 a 25 ml en cada una. Dejar solidificar y realizar el control de esterilizar, durante 24 – 48 horas a 37 °C Conservar refrigerado a 4°C hasta su empleo.

**6. Resultados**

**7. Conclusiones**

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

Utilizar las medidas de bioseguridad

**9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires





## Guía de práctica N°12: IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES LEVADURAS

Sección : .....Docente: M.g. T.M. Freddy Orihuela Villar  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### 1. Propósito /Objetivo:

Reconoce La identificación taxonómica (morfo taxonómica) de las principalmente levaduras 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.

### 2. Fundamento Teórico

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

### 3. Equipos, Materiales y

#### Reactivos Equipos

#### Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Laminillas		
3	Asa de cool		
4	Mechero bunsen		
5	Fosforo		
6	Hisopos		

#### Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Azul de lactofenol		
2	KOH 10 %		
3	Agua destilada		

#### Muestras

Ítem	Muestras	Característica	Cantidad
1	Cultivo de Hongos levaduriformes y Filamentos		

### 4. Indicaciones/instrucciones:



## PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

### Procedimiento

Suspender un inóculo de la cepa pura de *Cándida* con 24 horas de desarrollo en 0,5 mL de suero humano o de conejo. Incubar a 35 – 37 °C por 2h y 30 min.

Colocar 2 ó 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto y cubrir con lámina cubre objeto y observar al microscopio con objetivo de 40X Interpretación:

La prueba es positiva al visualizar una estructura alargada que se origina a partir de la levadura. Realizar esta prueba empleando cepas controles en paralelo a la cepa en estudio.

Control positivo: *C. albicans*. Control negativo: *C. glabrata*.

Identificación de *Rhodotorula rubra*.

Morfología de las colonias Se caracterizan por ser de color rojo – anaranjado o naranja, de aspecto cremoso o rugoso, brillante y de superficie lisa.

Examen microscópico

Se observan levaduras redondas, ovoides de 2 – 6,5 micras de diámetro, en ocasiones forman pseudomicelio rudimentario, al examen directo con tinta china se visualiza una fina cápsula El medio CHROM agar *Candida*

*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*. Procedimiento

La siembra se realiza a partir de cepas muestras biológicas y se incuban a temperaturas de 30 a 37

°C durante 48 horas.

## 5. Resultados

## 6. Conclusiones

## 7. Sugerencias y /o recomendaciones

Utilizar las medidas de bioseguridad

## Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 13: RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRA FECALES

Sección : .....Docente: M.g. T.M. Freddy Orihuela Villar  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### 1. Propósito /Objetivo:

El objetivo principal es el de mantener la viabilidad de los parásitos que se encuentran en la muestra de heces y de procurar el buen manejo de la misma..

### 2. Fundamento Teórico

Para obtener resultados óptimos, la muestra de heces debería llevarse al laboratorio lo más pronto posible después de recogerla. Si esto no es posible, esta se debería guardar en un lugar fresco o en formol al 10 % llevándola luego al laboratorio para su procesamiento.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Refrigerador (opcional)		1
2			

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Fascos de boca ancha		1

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Formol 10 %		1

### 4. Indicaciones/instrucciones:

Mantener las normas básicas de bioseguridad.  
Redacta tus respuestas con letra clara, sin borrones.

### 5. Procedimientos:

Asegurarse de que la persona defaque en un recipiente aparte (bacinilla) cuidando que la muestra no se mezcle con orina.

Tomar una parte de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha y tapa rosca. Rotular el frasco colocando el nombre del paciente, edad y fecha de recolección.

Introducir la(s) muestra(s) en una funda plástica y cerrarla evitando que se derrame y se mezcle con otras muestras.

Transportar las muestras rápidamente, antes de que transcurran 2 horas de su emisión. Luego de



ese tiempo la muestra no será útil.

**6. Resultados**

.....  
.....  
.....  
.....

**La toma de muestra de sangre capilar está dada en los casos de:**

**7. Conclusiones**

.....  
.....  
.....  
.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

...mantener las medidas de bioseguridad

.....  
.....  
.....

**9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados:**

[https://www.paho.org/disasters/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=docs&alias=1279-procedimientos-para-la-identificacion-de-vibrio-cholerae-en-el-laboratorio-de-microbiologia&Itemid=1179&lang=en](https://www.paho.org/disasters/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=docs&alias=1279-procedimientos-para-la-identificacion-de-vibrio-cholerae-en-el-laboratorio-de-microbiologia&Itemid=1179&lang=en)



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 14: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARÁSITOS

Sección : .....Docente: M.g. T.M. Freddy Orihuela Villar  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### 1. Propósito /Objetivo:

Buscar en las muestras biológicas (heces) la presencia de quistes de los distintos parásitos para tener un conocimiento más amplio sobre ellos.

### 2. Fundamento Teórico

Observación macroscópica de la muestra: Una vez recibida una muestra, debe observarse las características organolépticas como consistencia (dura, pastosa, diarreica, etc.), forma, color (amarillo, negro, etc.), olor (fétido, rancio, pútrido, etc.), presencia de moco, sangre, segmentos o proglótidos de tenías, nemátodos adultos (Enterovirus, Ascaris, etc.). Estas características se anotan en la ficha de cada muestra. Los parásitos observados macroscópicamente deben colocarse en suero fisiológico, 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.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio	Con objetivo de 10 y 40	

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Laminas cubre objeto		
3	Guantes de látex		
4	Mascarilla		
5	Baguetas o mondadientes		
6	Algodón		



### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Suero fisiológico o solución de Lugol parasitológico		
2	Alcohol al 50%		
3	Lejía		

### 3.3. Muestras

Ítem	Muestra	Característica	Cantidad
1	Muestra biológica(heces) resientes o conservadas en formol al 10%		

#### 4. Indicaciones/instrucciones:

#### 5. 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.

#### 6. Resultados

#### 7. Conclusiones

#### 8. Sugerencias y /o recomendaciones

#### 9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires



## GUÍA DE PRÁCTICA N° 15: METODO CONCENTRADO

Sección : .....Docente: M.g. T.M. Freddy Orihuela Villar  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### 1. Propósito /Objetivo:

Buscar en las muestras biológicas (heces) la presencia de quistes y huevos de los distintos paracitos para tener un conocimiento más amplio sobre ellos.

### 2. Fundamento Teórico

Este método también es llamado examen coproparasitoscópico (cps) es un conjunto de técnicas diagnósticas que constituyen a la indicación para la identificación de la mayoría de las enteroparasitosis causadas por protozoarios o helmintos. Faust es el método más usado y efectivo, en este se precipitan los parásitos por centrifugación después de haber filtrado la muestra

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio		
2	Centrifuga		
3			

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Lamina porta objeto		
2	Lamina cubre objeto		
3	Gasa		
4	Tubos de ensayo		
5	Gradilla		
6	Embudo		
7			



### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Solución acuosa de sulfato de zinc		
2	Agua destilada		
3	Lugol		

### 3.3. Muestras

Ítem	Muestra	Característica	Cantidad
1	Muestra biológica(heces)		

#### 4. Indicaciones/instrucciones:

#### 5. Procedimientos:

##### PREPARACION DEL SULFATO DE ZINC

Pesar 330 gramos de sulfato de zinc y disolverlos en 1000 ml de agua destilada. La cantidad varía de acuerdo a la cantidad de solución a utilizar.

El sulfato tiene que tener una densidad de 1.18 con la finalidad de que los huevos y quistes salgan a la superficie después del centrifugado.

##### PASOS DEL METODO

En un vaso separar una porción de heces tamaño al de una aceituna, agregar agua destilada mover para mezclar bien.

Filtrar dos veces colocando en el embudo una gasa doblada en cuatro. Para evitar el paso de restos de comida esto en un tubo de ensayo.

Centrifugar el filtrado a 2500 rpm (revoluciones por minuto).

Decantar el líquido sobrenadante y completar con la solución de sulfato de zinc en la misma cantidad de la anterior para evitar derrames.

Llevarlo nuevamente a centrifugar a 1500 rpm.

Abrir la centrifuga con mucho cuidado para no mover, luego sacar las partículas que están en la superficie del tubo de ensayo.

Con la ayuda de un asa que mide 5 mm sacar el sobrenadante y ponerlo en un portaobjeto y agregarle una gota de lugol para colorear la muestra y sea más visible los huevos o quistes, cubrirlos con un cubreobjetos y llevarlos al microscopio.

Y observar.

#### 6. Resultados

#### 7. Conclusiones

Mantener las medidas de bioseguridad

#### 8. Sugerencias y /o recomendaciones

#### 9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Koneman E.W., Allen S.D., Dowell S.R.Jr., Sommers H.M. 2000. Diagnóstico. Microbiológico. 6th edition. Ed. Panamericana, B. Aires





## GUÍA DE PRÁCTICA N° 16: MÉTODOS ESPECIALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITOS

Sección : .....Docente: M.g. T.M. Freddy Orihuela Villar  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

### 1. Propósito /Objetivo:

Preparar una muestra de sangre para su estudio microscópico, comprobando la presencia o ausencia de parásitos hematológicos en ella, durante el proceso de observación.

### 2. Fundamento Teórico

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio		
2	Mechero de bunsen		
3	Mechero de Alcohol		

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas porta objeto		
2	Coloreador		
3	Hisopos		
4	Asa de cool		

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Fucsina Fenicada		
2	Alcohol Acido		
3	Azul de metileno		



**4. Indicaciones/instrucciones:**

**5. Procedimientos:**

Hacer frotis de 2cm x 1 cm. Y fijarlo.

Fucsina x 4 min. y flamear la muestra hasta obtener 3 vapores;  
enjuagar. Decolorante x 4 min; enjuagar.

Azul de metileno x 4 min; enjuagar

**6. Resultados**

**7. Conclusiones**

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

**9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

[http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163\\_malaria.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163_malaria.pdf)