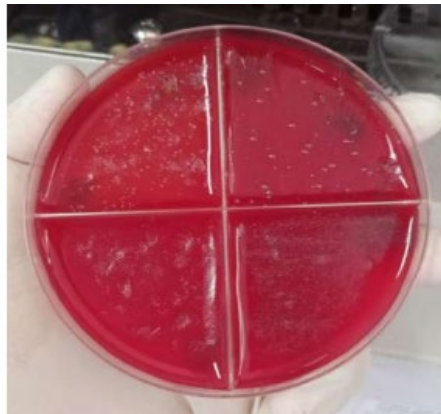
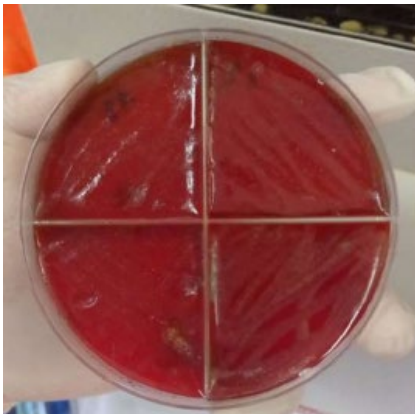


Guía de Laboratorio

Microbiología General y Oral

MG. C. D. Edna Mercedes Yangali Gamarra



Guía de Trabajo

Microbiología General y Oral

Material publicado con fines de estudio.

Código: (24UC00089)

Huancayo, 2023

De esta edición

© Universidad Continental, Oficina de Gestión Curricular Av. San Carlos 1795,

Huancayo-Perú

Teléfono: (51 64) 481-430 anexo 7361

Correo electrónico: recursosucvirtual@continental.edu.pe

<http://www.continental.edu.pe/>

Cuidado de edición Fondo Editorial

Diseño y diagramación Fondo Editorial

Todos los derechos reservados.

La *Guía de Trabajo*, recurso educativo editado por la Oficina de Gestión Curricular, puede ser impresa para fines de estudio.

Contenido

Presentación	5
Primera Unidad	7
Introducción a la microbiología y respuesta del huésped ante patógenos.....	7
.....	7
Semana 1: Sesión 2.....	8
Bioseguridad, técnicas de desinfección y esterilización	8
Semana 2: Sesión 2.....	13
Descripción, manejo de equipo y material de laboratorio.....	13
Semana 3: Sesión 2.....	20
Tinción y morfología de bacterias y hongos.....	20
Semana 4: Sesión 2.....	27
Medios de cultivo, técnicas de siembra y morfología de bacterias y hongos ..	27
Segunda Unidad.....	33
Microorganismos Relacionados con Enfermedades Infecciosas Sistémicas.....	33
.....	33
Semana 5: Sesión 2.....	34
Respuesta inespecífica del sistema inmune	34
Semana 6: Sesión 2.....	39
Serología	39
Semana 7: Sesión 2.....	46
Parasitología	46
Semana 8: Sesión 2.....	51
Protozoarios en sangre y tejidos – helmintos.....	51
Tercera Unidad	59
Microorganismos relacionados con patologías orales.....	59
.....	59
Semana 9: Sesión 2.....	60
Aislamiento de staphylococcus y streptococcus	60
Semana 10: Sesión 2.....	64
Prueba de actividad cariogénica.....	64
Semana 11: Sesión 2.....	69

Micología de importancia médica y odontológica – estudio de <i>Candida albicans</i>	69
Semana 12: Sesión 2.....	77
Estudio de microorganismos del surco gingival.....	77
Cuarta Unidad	81
Ecología bucal. Microbiología de las patologías infecciosas bucodentales.....	81
.....	81
Semana 13: Sesión 2.....	82
Exudado faríngeo.....	82
Semana 14: Sesión 2.....	86
Virología – Virus de importancia estomatológica	86
Semana 15: Sesión 2.....	90
Antibiograma.....	90
Referencias	104

Presentación

Esta nueva oportunidad nos permite ofrecer a los usuarios la Guía de Laboratorio, fruto del esfuerzo colaborativo del equipo docente. La guía como valiosa alternativa para estudiantes e interesados, brindándoles acceso a fuentes bibliográficas que reflejan experiencias exitosas y la revisión continua de conocimientos en evolución. Los conceptos presentados no solo sirven como punto de partida, sino que también estimulan a los usuarios a ampliar su búsqueda de información para mantenerse actualizados. El compromiso es facilitar el acceso a recursos que fomenten el aprendizaje continuo y la mejora constante de los conocimientos.

La guía está estructurada en cuatro unidades fundamentales: Introducción a la microbiología y respuesta del huésped ante patógenos, microorganismos relacionados con enfermedades infecciosas sistémicas, microorganismos relacionados con patologías orales y ecología bucal y microbiología de las patologías infecciosas bucodentales. Su diseño está especialmente concebido para respaldar el desarrollo de las clases prácticas, proporcionando no solo los elementos esenciales para la aplicación práctica de los conocimientos, sino también información adicional sobre los aspectos teóricos pertinentes. Cada sección de la guía incluye espacio dedicado para que los estudiantes realicen anotaciones, dibujos de observaciones y respondan al cuestionario correspondiente, facilitando así una experiencia de aprendizaje participativa y completa.

Al finalizar la asignatura, el estudiante será capaz de identificar la formación, el desarrollo y los elementos microbiológicos, propios del cuerpo humano y en particular de la cavidad bucal, de describir los aspectos fundamentales sobre la microbiota oral, será capaz de explicar los procesos infecciosos estomatológicos y su posible complicación sistémica, de establecer relaciones entre los microorganismos vinculados a las afecciones orales según las condiciones intrínsecas y extrínsecas de la salud general y de explicar la etiología, patogenia, manifestaciones clínicas, prevención de las infecciones orales más relevantes que les permita la elaboración de un buen diagnóstico presuntivo.

Recomendaciones para el uso de la guía de laboratorio de Microbiología:

Exploración preliminar: antes de cada clase práctica, tómate el tiempo necesario para revisar la sección correspondiente de la guía. Familiarízate con los conceptos clave, objetivos y procedimientos que se abordarán durante la sesión. Si es posible revisar también el material compartido en el aula virtual.

Verificar el material atendido por el personal de laboratorio antes de que se inicie la práctica: asegúrate de contar con todos los materiales necesarios para las clases

prácticas según las indicaciones de la guía. Esto incluye instrumentos, reactivos y cualquier otro elemento mencionado. La verificación previa contribuirá a una experiencia más fluida y enriquecedora.

Participación activa: durante las clases prácticas, participa en las actividades propuestas. Realiza anotaciones detalladas, observaciones precisas y, cuando sea pertinente, realiza dibujos que complementen tu comprensión de los conceptos.

Uso de espacios designados: aprovecha los espacios dedicados en la guía para tus anotaciones. Estos espacios están diseñados para que personalices tu aprendizaje y refuerces los conceptos mediante reflexiones y observaciones propias.

Cuestionarios y autoevaluación: después de cada clase, dedica tiempo a responder los cuestionarios proporcionados en la guía. Esta autoevaluación te permitirá consolidar tus conocimientos e identificar áreas que puedan requerir más atención.

Búsqueda adicional de información: la guía sirve como punto de partida, pero no dudes en ampliar tu conocimiento mediante la búsqueda de información adicional. Utiliza las fuentes bibliográficas recomendadas y otras fuentes confiables para profundizar en los temas tratados, contactarse con el *Hub* de información de la universidad.

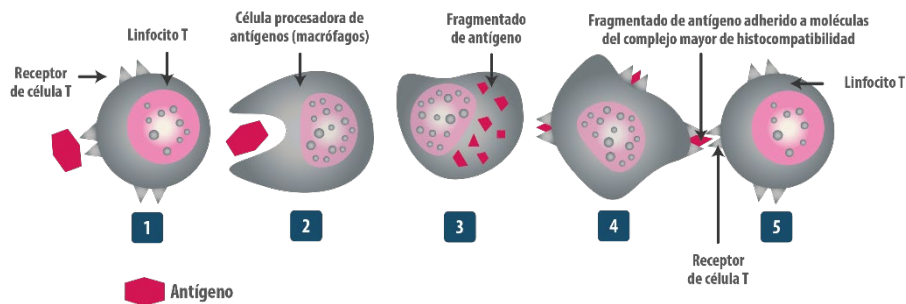
Colaboración y discusión: fomenta la colaboración con tus compañeros. Compartir observaciones, discutir conceptos y comparar resultados puede enriquecer la experiencia de aprendizaje de todos.

Feedback constructivo: si identificas áreas de mejora o tienes sugerencias para su optimización, comunícalo a tu docente. Tu retroalimentación es valiosa para la mejora continua del material educativo.

Mag. C. D. Edna Mercedes Yangali Gamarra

Primera Unidad

Introducción a la microbiología y respuesta del huésped ante patógenos



Semana 1: Sesión 2

Bioseguridad, técnicas de desinfección y esterilización

Sección: Fecha: /...../..... Duración: 90´

Docente: Unidad: 1

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Previo a su uso, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

I. Propósito

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Adquirirá conocimientos fundamentales sobre bioseguridad, lo que le posibilitará identificar los riesgos asociados y los métodos preventivos aplicables en el entorno del laboratorio.
- Iniciará actividades prácticas que refuercen los aspectos teóricos de la asignatura de microbiología.
- Se familiarizará con las normativas de bioseguridad que gobiernan los laboratorios de microbiología, permitiéndole su aplicación efectiva.
- Describirá y considerará los diversos procedimientos de desinfección y esterilización utilizados en un laboratorio de microbiología clínica.

II. Fundamentos teóricos

Bioseguridad

Se define como un conjunto de precauciones diseñadas para preservar la salud y seguridad de las personas frente a posibles riesgos laborales. Además, implica la toma de decisiones, responsabilidades, cuidados y dirección, tanto individual como colectivamente, por parte de estudiantes y profesores involucrados en cada práctica o actividad llevada a cabo en el laboratorio (Acosta y Andrade, 2008).

Factores de riesgo

El conocimiento acerca del origen y las características de posibles agentes causales de accidentes representa un elemento de gran importancia en la

implementación de medidas y acciones relacionadas con la bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología. Estos son:

a) Agentes biológicos

Los agentes microbianos penetran al organismo por:

1. Ingestión de alimentos o aguas contaminadas por:

- Bacterias: *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigella*, etc.
- Parásitos: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Ascaris*, *Enterobius*, *Trichuris*, *Hymenolepis*, *Taenia*, *Diphyllobothrium*, etc.
- Virus: Virus del sarampión, poliomielitis, enterovirus, etc.

2. Inhalación de microorganismos como:

- *Mycobacterium tuberculosis*, virus influenza, virus del sarampión, etc.

3. Inoculación directa de sangre o fluidos corporales:

- Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
- Hepatitis, etc.

4. Contacto directo o indirecto con pacientes, que puede llevar a enfermedades como:

- Conjuntivitis
- Micosis cutánea
- Escabiosis, etc.

Agentes físicos y mecánicos:

Incluyen temperaturas extremas, contactos eléctricos defectuosos, vidrios rotos o recipientes dañados, que pueden ocasionar quemaduras o heridas.

Agentes químicos:

Diversos agentes con propiedades que representan riesgos, como corrosivos (ácido acético, fenol), tóxicos (medicamentos como barbitúricos), productos caseros y alimentos contaminados (gasolina, lejía), carcinogénicos (bencina) e inflamables-explosivos (acetona, metanol).

Normas de bioseguridad:

- ✓ Mantener el laboratorio ordenado y limpio, limitando el material no pertinente.
- ✓ Descontaminar mesas de trabajo diariamente y después de derrames.
- ✓ Lavarse las manos antes y después de manipular material biológico.
- ✓ Descontaminar desechos antes de eliminarlos.
- ✓ Uso de mandiles durante la permanencia en el laboratorio.
- ✓ Prohibición de pipetear con la boca.

- ✓ Mantener las puertas cerradas durante las prácticas.
- ✓ Reportar de inmediato derrames o exposiciones a materiales peligrosos.
- ✓ Limitar el ingreso a personas con riesgo de infección.
- ✓ Proscripción de comer, beber, fumar o almacenar alimentos en el laboratorio.

Estrategias de protección en trabajadores de salud:

1. Profilaxis preexposición mediante vacunas.
2. Profilaxis postexposición con vacunas.

Técnicas de desinfección y esterilización:

- Desinfección: Destrucción de microorganismos en objetos o superficies mediante desinfectantes.
- Esterilización: Eliminación de todas las formas de vida en objetos inanimados por métodos físicos o químicos.

Métodos de esterilización:

- Agentes físicos como calor húmedo y seco, filtración, humedad y desecación, y radiaciones.
- Agentes químicos como bactericidas, viricidas, bacteriostáticos y virustáticos.

Equipos/Materiales:

Se solicitará al personal de laboratorio equipos y materiales básicos para que los estudiantes los reconozcan, siguiendo estrictamente las medidas de bioseguridad.

Indicaciones y procedimientos:

Se incluye el uso obligatorio de equipo de protección personal, lavado estricto de manos, manipulación segura de muestras, desinfección de superficies y seguimiento de normas y protocolos establecidos. También se destaca la importancia de conocer la ubicación y el uso de equipos de seguridad, informar sobre derrames o accidentes, y mantenerse al día con las vacunas recomendadas. Se hacen hincapié en la concientización del grupo sobre la cultura de bioseguridad y la responsabilidad colectiva en la seguridad (Acosta y Andrade, 2008).

Figura 1

Estandarización para el manejo de EPP



Fuente: Google Imágenes (<https://n9.cl/egify>)

III. Resultados (Analizar y procesar las condiciones de bioseguridad en un laboratorio de Microbiología General y Oral).

IV. Conclusiones (Especificar cuáles son las principales consideraciones de bioseguridad que se debe de tener en cuenta en un laboratorio de Microbiología)

V. Sugerencias / recomendaciones

VII. Cuestionario previo a la práctica: (Resolver lo siguiente)

- 7.1. Elabore una relación de los principales agentes físicos utilizados en microbiología
- 7.2. Enumere las características y propiedades de los agentes químicos más usados que actúan sobre las bacterias.
- 7.3. Detalle los mecanismos de acción de cada uno de los agentes físicos y químicos, sobre las células procariotas y eucariotas.
- 7.4. Elabore un cuadro comparativo de los diferentes niveles de bioseguridad de los laboratorios de microbiología.
- 7.5. ¿Cuál es el nivel de bioseguridad al que pertenece nuestro laboratorio?
- 7.6. Mencione 5 reglas básicas de higiene y seguridad en el laboratorio
- 7.7. Mencione 5 elementos de protección personal
- 7.8. Mencione 3 de los procedimientos ante emergencias

Semana 2: Sesión 2

Descripción, manejo de equipo y material de laboratorio

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 90 minutos

Docente: Unidad: 1

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

I. Propósito

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Conocerá el equipo y materiales de uso general en el laboratorio de Microbiología.
- Aprenderá el manejo y uso correcto del equipo y material que utilizará durante el desarrollo de sus prácticas.
- Conocerá las partes de un microscopio óptico, así como, las bases para su funcionamiento.

II. Fundamentos teóricos

Un laboratorio de Microbiología es un lugar habilitado para el manejo y estudio de microorganismos. Es importante recordar que la finalidad es determinar las características de los mismos, para poder llegar a su identificación.

Para la realización de cultivos en el laboratorio, es indispensable contar con el siguiente material, sin embargo, para cada práctica se puede especificar material adicional. A continuación, se menciona el material de uso principal que cada uno de los estudiantes deberá describir el día de la práctica:

- Mechero de bunsen
- Gradillas
- Pinzas
- Asas bacteriológicas
- Pizetas con agua estéril

- Marcadores de vidrio
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Tubos de ensayo
- Cajas de Petri
- Espátulas de Drigalski
- Puente para tinción
- Mechero de alcohol
- Pipeta Pasteur
- Batería de tinción
- Reactivos: los determina la técnica

El laboratorio de Microbiología dispone de los aparatos e instrumentos necesarios para el correcto desarrollo de su actividad. Entre ellos encontramos los siguientes (los estudiantes describirán su uso y fundamento):

- Autoclave
- Baño María
- Estufa de incubación
- Jarra de anaerobiosis
- Refrigerador
- Centrífuga
- Balanza gramera
- Horno eléctrico
- Contador de colonias
- Micropipetas
- Estereoscopio
- Microscopios ópticos: para el adecuado manejo de los microscopios, es indispensable considerar los siguientes apartados: traslado adecuado, limpieza, manejo adecuado de oculares (los de uso de aceite de inmersión). El desarrollo de la Microbiología como ciencia tiene su apoyo en la microscopía tanto óptica como electrónica. La primera para observar morfología, agrupación y motilidad y la segunda nos permite observar ultraestructura celular. A continuación, se mencionan las partes del microscopio que cada estudiante deberá identificar y describir:

Partes del sistema óptico:

- a. Ocular
- b. Tubo del ocular
- c. Revólver o disco giratorio
- d. Objetivo
- e. Condensador

- f. Diafragma
- g. Foco

Partes del sistema mecánico:

- a) Soporte
- b) Platina
- c) Carro
- d) Cabezal
- e) Tornillo de enfoque

Traslado y manejo del microscopio:

- Al trasladarlo colocar una mano sobre la base y la otra en el brazo o columna y desplazarlo en posición erguida. No inclinarlo, ya que se pueden caer los oculares o salirse los filtros. Es responsabilidad de los alumnos la integridad de los filtros.
- Antes de usarlo, deben cerciorarse de que las lentes (objetivos, oculares, condensador y filtro no falten y estén limpios). De no ser así reportarlo de inmediato.
- Transportará el microscopio a una mesa fija, de tal modo que pueda sentarse con comodidad para ver el ocular sin apoyarse.
- Enchufar el cable del microscopio a la toma de corriente.
- Se girará el revolver hasta situar el objetivo de menor aumento (el más corto) en línea con el ocular.
- Accionando el tornillo macrométrico, se subirá la platina hasta el tope. No forzar ninguno de los elementos mecánicos, si alguno no se puede accionar convenientemente, reportar.
- Colocar la preparación sobre la platina. Se debe procurar que el objetivo a observar quede centrado.
- Encender la luz mediante el interruptor situado en la base.
- Mirando por el ocular, cerrar el diafragma lo más posible, accionando su palanca en sentido contrario a las manecillas del reloj. Debe observarse el campo iluminado con una luz ni muy brillante ni demasiado tenue.
- Mirando por el ocular, accionar el mando de enfoque lentamente en sentido de las manecillas del reloj para bajar la platina alejando la preparación del objetivo hasta que el objeto se observe. Ajustar el enfoque mediante el tornillo micrométrico.
- Moviendo la preparación, buscar una zona de observación adecuada.
- Para observar con un objetivo de mayor aumento, girar el revólver al objetivo siguiente.
- Para enfocar, normalmente, será necesario girar unas pocas vueltas el tornillo micrométrico en un sentido o en el otro. Si el campo se muestra muy oscuro, abrir

algo el diafragma.

- Al finalizar su trabajo bajar la platina y quitar la preparación.
- Colocar el objetivo de menor aumento en posición de observación.
- Limpiar con papel suave y secante la platina.
- Limpiar los objetivos con papel lente sobre todo si usó aceite de inmersión.
- Bajar la intensidad de la luz de la lámpara.
- Apagar el microscopio.
- Desenchufar y enrollar el cable para no pisarlo al transportarlo, colocar una mano en la base y la otra en el brazo para su devolución.

Realizar los dibujos de los equipos, materiales y reactivos.

III. Equipos / Materiales

3.1 Equipos

Tabla 1

Equipos

Ítem	Material	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto	1
2	Autoclave	1
3	Estereoscopio	1
4	Baño María	1
5	Estufa de incubación	1
6	Jarra de anaerobiosis	1
7	Refrigerador	1
8	Centrífuga	1
9	Balanza gramera	1
10	Horno eléctrico	1
11	Contador de colonias	1
12	Micropipetas	1
13	Estereoscopio	1

Tabla 2

Materiales

Ítem	Material	Cantidad
1	Mechero de Bunsen	1
2	Asas bacteriológicas	1
3	Espátula de Drigalski	1
4	Marcador de vidrio	1
5	Portaobjetos y cubreobjetos	1
6	Gradillas	1
7	Pinzas	1
8	Pizetas con agua estéril	1
9	Tubos de ensayo	1
10	Cajas Petri	1
11	Puente para tinción	1
12	Mechero de alcohol	1
13	Pipeta Pasteur	1
14	Punta para micropipeta	1
15	Papel de trigo/Graff	1
16	Gotero	1
17	Aceite de inmersión	1
18	Papel lente	1
19	Éter (solución para limpieza de las lentes del microscopio)	1
20	Xilol (solución para limpieza de las lentes del microscopio)	1

Tabla 3

Reactivos

Ítem	Material	Cantidad
1	Batería de tinción Gram	01
2	Batería de tinción ácido alcohol resistente	01
3	KOH 10 %	01
4	Nigrosina o tinta china	01
5	Azul de metileno	01
6	Medio de cultivo en polvo	01
7	Azul de algodón	01
8	Azul de lactofenol	01

III. Indicaciones y procedimientos

Cada grupo de trabajo deberá llevar para la práctica agua estancada y chicha de jora madura para la observación de microorganismos (MO) al ejercitar el uso del microscopio óptico compuesto.

Grafique cada uno de los materiales y equipos de uso en el laboratorio. Pregunte sobre cualquier procedimiento y uso de materiales o equipos en el cual tenga duda de su uso.

IV. Procedimientos:

- 4.1 Identifique cada uno de los materiales, reactivos y equipos a usar en el laboratorio de microbiología.
- 4.2 Describa el uso adecuado de cada uno de los materiales, reactivos y equipos a usar en el laboratorio.
- 4.3 Grafique cada uno de los materiales y equipos indicando detalladamente sus partes.
- 4.4. Con un gotero ubique una gota de agua estancada en un portaobjetos, una gota de chicha de jora en otra lámina portaobjetos, cubra con un cubreobjetos y siga paso a paso el manejo del microscopio para lograr observar adecuadamente el preparado.
- 4.5 Se les entregará una lámina fijada y coloreada para observarla al microscopio con la lente de inmersión. Ubique en la lámina portaobjeto una gota de aceite de inmersión y observe con la lente respectiva, siga paso a paso las recomendaciones para un buen uso y manejo del microscopio.

V. Resultados (Dibujos adicionar hojas)

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

VIII. Cuestionario previo a la práctica

- 8.1. ¿Qué utilidad tiene la incubadora?
- 8.2. ¿Qué utilidad tiene la jarra anaeróbica?
- 8.3. Explique el funcionamiento de la autoclave.
- 8.4. ¿Para qué se utiliza el sistema de refrigeración en microbiología?
- 8.5. ¿De cuántos sistemas se compone el microscopio?
- 8.6. ¿Qué es poder de resolución?
- 8.7. ¿Cuáles son los objetivos más utilizados en la práctica microbiológica?
- 8.8. ¿Por qué se llama objetivo de inmersión y en qué difiere el objetivo de inmersión de los otros objetivos?

Semana 3: Sesión 2

Tinción y morfología de bacterias y hongos

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 1

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

I. Propósito

Los estudiantes aprenderán sobre diversas técnicas de tinción destinadas a distinguir las características microscópicas específicas de bacterias y hongos. Además, tendrán la oportunidad de llevar a cabo la tinción más comúnmente utilizada para observar tanto bacterias como hongos.

II. Fundamentos teóricos

Según Castañeda et al. (2021), los microorganismos vivos suelen carecer de color, lo que dificulta su observación bajo un microscopio óptico de campo claro debido a la falta de contraste entre las células y el entorno circundante. Para superar esto, se utiliza la técnica de fijación y tinción en un frotis.

En la preparación de un frotis, se distribuye una pequeña suspensión de microorganismos sobre una superficie transparente, la cual se fija mediante calor o solventes orgánicos. Este proceso provoca la inactivación o muerte celular, junto con algunas modificaciones en las características de los microorganismos.

Existen varios tipos de tinciones, clasificadas según el número y tipo de colorantes utilizados, así como los objetivos de estudio. La tinción simple utiliza un solo colorante, mientras que las tinciones diferenciales emplean más de uno para distinguir microorganismos con características superficiales diferentes. Un ejemplo destacado es la tinción de Gram, propuesta por Christian Gram, que clasifica bacterias en Gram positivas y Gram negativas.

Las tinciones selectivas permiten observar estructuras especializadas útiles para la clasificación taxonómica de bacterias. Por ejemplo, la tinción de endosporas

identifica bacterias de los géneros Bacillus y Clostridium.

La tinción de azul de lactofenol se utiliza para observar hongos y se basa en la afinidad del colorante por las estructuras fúngicas. Sus características especiales, como la capacidad del fenol para destruir flora acompañante, el ácido láctico para conservar estructuras fúngicas y el azul de algodón para adherirse a las hifas y conidios, hacen que sea efectiva en la observación de hongos microscópicos obtenidos en cultivos por aislamiento.

III. Equipos / Materiales

Tabla 4

Equipos

Ítem	Material	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto	2 por grupo
2	Estereoscopio	1 por grupo

Tabla 5

Materiales

Ítem	Material	Cantidad
1	Mechero de Bunsen	1 por grupo
2	Asas bacteriológicas	1 por grupo
3	Rotulador	1 por grupo
4	Portaobjetos y cubreobjetos	5 por grupo
5	Gradillas	1 por grupo
6	Puente para tinción	1 por grupo
7	Cinta adhesiva en dispensador	1 por grupo
8	Papel lente	1 por grupo
9	Pinza metálica	1 por grupo

Tabla 6

Reactivos

Ítem	Material	Cantidad
1	Batería de tinción Gram	1 por grupo
2	Batería de tinción Ziehl Neelsen	1 por grupo
3	KOH 10 %	1 por grupo
4	Nígratina o tinta china	5 por grupo
5	Azul de metileno	1 por grupo
6	Azul de lactofenol	1 por grupo
7	Azul de algodón	1 por grupo
8	Éter y xilol	1 por grupo
9	Hipoclorito de sodio al 13 % en frasco con boca ancha con tapa rosca	1 por grupo
10	Alcohol isopropílico o etílico 70 % en frasco con boca ancha con tapa	1 por grupo
11	Aceite de inmersión	1 por grupo

IV. Indicaciones y procedimientos

Cualquiera de las técnicas de coloración bacteriana y micótica, implica cuidadoso procesamiento del material a colorearse. La calidad de los tintes, fijadores, mordientes y decolorantes deben ser garantizados al igual que la preparación.

Por grupo de trabajo, obtendrán las muestras biológicas requeridas y mencionadas en los materiales en cada uno de los procedimientos de coloración.

Procedimientos

1. Etapas por seguir:

1.1 Extensión o frotis:

- La lámina debe estar transparente, desengrasada y limpia.
- Si el cultivo es líquido, con el asa de siembra en aro, esterilizado previamente al rojo, tomar 1 o 2 gotas y extender suavemente sobre el centro del portaobjetos.
- Si el cultivo es sólido, primero, colocar con el asa, una gota de agua destilada estéril, sobre el portaobjeto y luego tomar el inóculo, emulsionar y extender igual que en el caso anterior.

1.2 Fijación:

- ✓ Someter el frotis a la llama del mechero con calentamiento moderado o con alcohol de 96° u otro líquido fijador (laca).

1.3 Coloración:

- Cubrir la extensión fijada con la solución colorante ensayada.
- Evitar la evaporación del colorante, controlando el tiempo que debe actuar.
- Se intensifica la coloración con el uso de mordientes como el Lugol en el caso de la tinción Gram, ácido tánico para teñir flagelos, etc.
- El tiempo de coloración, varía de acuerdo a la técnica aplicada.

1.4 Diferenciación:

- Con alcohol, alcohol-acetona o ácidos fuertes como agentes decolorantes.
- El empleo de cada uno de ellos, depende de la técnica empleada.
- El decolorante debe dejarse actuar hasta que el líquido pase a incoloro, lo que asegura el desprendimiento del exceso de colorante.

1.5 Lavado:

- ✓ Utilizar agua corriente para retirar el exceso del diferenciador. En algunos casos se recomienda usar agua destilada.

1.6 Decoloración:

- Para la tinción de estructuras que se decoloran por acción de los diferenciadores.
- Hacer actuar los colorantes de contraste en el tiempo recomendado por la técnica.

1.7 Lavado final:

- Realizarlo utilizando un chorro continuo de agua corriente, hasta que arrastre todo exceso de colorante.
- Es preferible para algunas técnicas, el uso de agua destilada solamente.
- Evitar la formación de precipitados.

1.8 Secado:

- Referible a temperatura ambiente, colocando el preparado inclinado para el escurrimiento. Y con el frotis protegido de polvo o impurezas.
- Se puede acelerar el secado con el calor del mechero, evitando sobrecalentamientos.

1.9 Observación al microscopio:

- Con lente de inmersión y aceite de cedro.
- Conviene primero enfocar con lente de menor aumento.

2. Coloración por el método de Gram

2.1 Materiales:

- o Cultivo de 24 horas, en caldo.
- o Bateria Gram: cristal violeta, safranina, Lugol, y alcohol-acetona.
- o Láminas portaobjetos limpias, asa de siembra, lápiz marcador, gradilla.
- o Microscopio y aceite de cedro, papel lente y solución desinfectante.

2.2 Procedimiento:

- Del cultivo de bacterias, tomar el inóculo con el asa de siembra, extender sobre la lámina, conforme a lo indicado anteriormente. Flamear nuevamente el asa hasta quedar estéril y situar en la gradilla.
- Fijar la preparación a la llama del mechero o al ambiente. Se controla sobre el dorso de la mano, si el calentamiento es moderado, no habrá calcinación.
- Cubrir con la solución cristal violeta por un minuto.
- Lavar ligeramente con agua corriente.
- Cubrir la preparación con Lugol durante un minuto.
- Diferenciar con alcohol-acetona hasta que este no arrastre colorante. Es mejor regular la acción del alcohol-acetona, con movimientos de balanceo antes de descartar el decolorante.
- Lavar con agua corriente.
- Contrastar con el colorante safranina por 30".
- Lavar con agua corriente, para evitar precipitados.
- Secar al ambiente o con ayuda del mechero.
- Observar al microscopio con lente de inmersión y aceite de cedro.
- Resultado: se observarán cocos aislados, en parejas, en racimos y en cadenas.
- También bacilos rectangulares, aislados o en cadenas. Todos los de color morado intenso son los Gram (+). Los bacilos pequeños aislados de color rojo y los diplococos rojos en forma de granos de café, son los Gram (-).

3. Coloración de bacterias acido-alcohol resistentes (BAAR) por el metodo de Ziehl Neelsen.

3.1 Materiales:

- Esputo positivo de enfermos tuberculosos.
- Bateria de coloración: fucsina fenicada, azul de metileno al 0.3 %, alcohol-ácido nítrico al 33 % o ácido clorhídrico al 3 %.
- Bateria Gram: cristal violeta, safranina, Lugol, y alcohol-acetona.
- Láminas portaobjetos limpias, asa de siembra, lápiz marcador, gradilla.

- Microscopio y aceite de cedro, papel lente y solución desinfectante (fenol al 5 %).
- Mechero de alcohol.

3.2 Procedimiento:

- Muy cuidadosamente, tomar con el asa de siembra, un poco de esputo evitando la formación de aerosoles.
- Extender sobre la lámina, sin llegar a los bordes.
- Introducir el asa en un recipiente con arena. Seguidamente quemar el asa para eliminar excedente de inóculo.
- Cubrir la preparación con colorante fucsina. Calentar tres veces hasta el desprendimiento de vapores blancos. Evitar que hierva. A la evaporación por calentamiento, agregar más colorante para una acción constante (5 min).
- Diferenciar con alcohol ácido hasta que corra incoloro.
- Lavar con agua corriente.
- Recolorear con azul de metileno durante un minuto.
- Lavar con agua corriente, prolongar el lavado para arrastre de los precipitados.
- Secar al ambiente o a la llama del mechero.
- Observar al microscopio con lente de inmersión y aceite de cedro.
- Resultados: los BAAR se observarán como bacilos delgados y un poco alargados, teñidos uniformemente de rojo o con granulaciones rojo intenso sobre fondo rosado del bacilo. La flora acompañante aparecerá teñida de azul.

4. Coloración de hongos y levaduras

4.1 Materiales:

- Placas Petri con cultivo de hongos filamentosos.
- Chicha de jora madura.
- Batería de coloración: azul de lactofenol, azul de algodón, azul de metileno.
- KOH al 10 %.
- Láminas portaobjetos limpias, asa de siembra, lápiz marcador, gradilla.
- Microscopio y aceite de cedro, papel lente y solución desinfectante (fenol al 5 %)

4.2 Procedimiento:

- Sobre portaobjeto limpio y seco depositaremos 2 gotas de azul de lactofenol.
- Cortar un trozo de cinta adhesiva transparente y pegarla en el extremo del asa estéril, con cuidado pasaremos el extremo de la cinta adhesiva por el borde exterior de la colonia, pegaremos la cinta adhesiva en el portaobjetos que tiene el colorante, retirando con cuidado el asa.
- Añade una gota de colorante sobre la cinta adhesiva y cubra la preparación con un

cubreobjetos. Observa al microscopio.

- Sobre otro portaobjeto ubique una gota de chicha de jora, agregue una gota de azul de metileno y observe al microscopio.

V. Resultados (Dibujos adicionar hojas)

VI. Conclusiones

VII. Sugerencias / recomendaciones

VIII. Cuestionario previo a la práctica

8.1 Describa ¿Cuáles son las técnicas para preparar un frotis?

8.2 Describa la técnica de Gram y su fundamento

8.3 Describa la técnica que debe utilizarse cuando las bacterias son ácido-alcohol resistente.

8.4 ¿Qué es una bacteria ácido alcohol resistente? Mencione dos nombres de bacterias y qué enfermedades ocasionan.

8.5 ¿Cuáles son las tinciones que se utilizan para observar hongos?

8.6 ¿Cuál es la técnica de tinción para observar *Cándida albicans*?

Semana 4: Sesión 2

Medios de cultivo, técnicas de siembra y morfología de bacterias y hongos

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 1

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

I. Propósito

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Conocerá los diferentes tipos de medios de cultivo de acuerdo a su composición química, características físicas y uso.
- Realizará las diferentes técnicas de siembra en los diferentes medios de cultivo.
- Describirá los aspectos más comunes de las colonias microbianas mediante observación macroscópica.

II. Fundamentos teóricos

Según Hernández et al. (2022), las bacterias están divididas en dos grupos nutricionales. El primero, son las bacterias heterótrofas, que obtienen su energía química de componentes orgánicos preformados. Todos los patógenos humanos conocidos están comprendidos en esta categoría.

El segundo grupo es el de las autótrofas, las que dependen de moléculas **no** orgánicas simples para fabricar su alimento. Estas son autosuficientes, ya que se proveen ellas mismas de los nutrientes que necesitan para crecer; un ejemplo, son las bacterias fotosintéticas.

3.1 Medios de cultivo

Todo material en el que los microorganismos encuentran nutrientes y en el que puedan reproducirse es un medio de cultivo. Los medios de cultivo son preparados que

intentan reproducir artificialmente todas las condiciones del hábitat natural óptimo (nutrientes, pH, etc.) de los agentes microbianos.

Componentes que se utilizan para la elaboración de un medio de cultivo:

- Agua
- Peptonas (fuente de N, C y S)
- Cloruro de sodio
- Minerales
- Agentes solidificantes
- Extracto de levadura
- Suero o sangre de caballo o de ovino

Clasificación de los medios de cultivo

a) Según su consistencia

- Líquidos (caldos)
- Semisólidos
- Sólidos (agares)
- Hidratos de carbono
- Extracto de carne

b) Según su aporte nutritivo

- Usuales (contienen sustancias nutritivas mínimas para el crecimiento de bacterias poco exigentes).
- Enriquecidos (son medios a los que se les añade suero, sangre o factores esenciales como vitaminas o cofactores. Permiten el crecimiento de bacterias exigentes)

c) Según su utilización

- Medios de aislamiento (medios selectivos, medios de enriquecimiento y medios selectivos diferenciales)
- Medios para resiembra
- Medios de identificación
- Medios para antibiograma
- Medios de conservación
- Medios de transporte Cary Blair

La selección del medio de cultivo debe hacerse de acuerdo con el tipo de microorganismo que se necesite aislar o estudiar.

3.2 Técnicas de siembra

Para el sembrado de microorganismos sobre un medio de cultivo, se emplean, hisopos, pipetas, pipeta Pasteur, asa de siembra, espátula.

Con las técnicas de cultivo, en un medio sólido podemos observar en las placas Petri, los caracteres culturales como son: forma, elevación, bordes, tamaño, superficie, consistencia, color, transparencia, etc. de las colonias que en ellos han crecido.

En un medio líquido, en tubos, se observa el grado de crecimiento, turbidez, formación de película en la superficie o de anillo en las paredes del tubo, sedimento, y olor.

En agar inclinado, se aprecia en los tubos, la intensidad y forma de crecimiento, bordes, aspecto, color, consistencia y olor.

3.3 Técnicas de cultivo

- Siembra en estría simple
- Siembra en placa vertida
- Siembra en estría cruzada
- Siembra por picadura
- Siembra para cultivo puro
- Siembra en medio líquido

3.4 Morfología colonial bacteriana

Cuando se tiene un medio de cultivo (agar sólido) en placa Petri se reporta la morfología colonial tal como uno la percibe:

- Puntiformes
- Redondeadas
- Lisas
- Onduladas
- Mucosas
- Lobuladas
- Filamentosas
- Rizoides
- Planoconvexas
- Convexas
- Umbilicadas
- Papilladas, etc.

III. Equipos / Materiales

Tabla 7

Equipos

Ítem	Equipo	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto	2 por grupo
2	Estereoscopio	1
3	Baño María	1
4	Jarra de anaerobiosis	1
5	Horno eléctrico	1
6	Contador de colonias	1
7	Micropipetas	1
8	Estereoscopio	1

Tabla 8

Material

Ítem	Material	Cantidad
1	Mechero de Bunsen	2 por grupo
2	Asa bacteriológica	1
3	Asa recta de siembra	1
4	Espátula de Drigalski	1
5	Marcador de vidrio	1
6	Porta objetos y cubreobjetos	1
7	Gradillas	1
8	Pizetas con agua estéril	1
9	Puente para tinción	
10	Papel de trigo/Graff	
11	Encendedor o caja con palillos de fósforo	

Tabla 9

Reactivos

Ítem	Reactivo	Cantidad
1	Batería de tinción Gram	1 por grupo
2	Batería de tinción ácido alcohol resistente	1 por grupo
3	KOH 10 %	1 por grupo
4	Nigrosina o tinta china	1 por grupo
5	Azul de metileno	1 por grupo
6	Placas Petri con agar Sangre	1 por grupo
7	Placas Petri con agar Sabouraud	1 por grupo
8	Placas Petri con agar Tripticasa de soya	1 por grupo
9	Placas Petri con agar Manitol salado	1 por grupo
10	Placas Petri con agar MacConkey	1 por grupo
11	Placas Petri con agar EMB	1 por grupo
12	Placas Petri con agar TCBS	1 por grupo
13	Placas Petri con agar SS/XLD	1 por grupo
14	Placas Petri con agar Chocolate	1 por grupo

16	Tubos con caldo BHI	1 por grupo
17	Tubos con medio SIM	1 por grupo
18	Tubos con medio de transporte Cary Blair	1 por grupo
19	Agua peptonada	1 por grupo

IV. Indicaciones y procedimientos

- Limpiar y esterilizar el área de trabajo.
- Prender los mecheros,
- Identificar y organizar el material dentro del área de trabajo,
- Rotular los tubos y cajas Petri.

V. Procedimiento:

- 5.1** Sembrar en estría cruzada la placa de agar sangre.
- 5.2** Sembrar para cultivo puro en placa de agar tripticasa soya
- 5.3** Sembrar por picadura en tubo con tripticasa soya
- 5.4** Sembrar en medio líquido con caldo cerebro-corazón
- 5.5** Sembrar en cada uno de los medios provistos por el laboratorio

VI. Resultados (dibujos)

VII. Conclusiones

VIII. Sugerencias / recomendaciones

V. Cuestionario previo a la práctica

9.1 ¿Cómo se clasifican los medios de cultivo? Ejemplos

9.2 Mencione qué microorganismos se cultivan en cada uno de los medios mencionados anteriormente.

9.3 Mencione los factores de crecimiento microbiano

9.4 Describa y dibuje los aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas sobre medio sólido.

Segunda Unidad

Microorganismos Relacionados con Enfermedades Infecciosas Sistémicas



Semana 5: Sesión 2

Respuesta inespecífica del sistema inmune

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

I. Propósito

- Observa los efectos de la relación hospedero – parásito: adherencia de los microorganismos de la cavidad oral.
- Observa resultado de la fagocitosis de microorganismos.

II. Fundamentos teóricos

Según Negroni (2018), en el estudio de la relación hospedero – parásito se consideran las características patogénicas de los macroorganismos (adherencia, invasividad, toxigenicidad, los mecanismos de escape del sistema inmunitario) y de los mecanismos de defensa del hospedero (resistencia):

- a) Inmunidad natural de especie, raza, edad, individuo, etc. Los mecanismos de respuesta inespecíficos como barreras: piel y mucosas, fagocitosis, sistema retículo endotelial, componentes tisulares, inflamación, fiebre.
- b) Inmunidad adquirida: pasiva y activa, humoral y celular. Los mecanismos de respuesta son específicos con formación de anticuerpos, participación de linfocitos o de ambos a la vez (Negroni, 2018).

Algunas definiciones:

- ✓ **Inmunidad:** estado de resistencia frente a microorganismos, toxinas y células reconocidas como extrañas, por acción de células (celular) y anticuerpos (humoral) con acciones específicas.
- ✓ **Infeción:** ingreso, desarrollo o multiplicación de agentes infecciosos (bacterias, hongos, parásitos, virus, etc.). Este proceso no significa necesariamente enfermedad.

- ✓ **Invasión:** proceso por el cual los microorganismos ingresan a las células o tejidos del hospedero para diseminarse
- ✓ **Portador:** persona o animal con infección asintomática.

Atributos de los microorganismos

- ❖ **Adherencia:** la mayoría de los microorganismos requieren colonizar las superficies mucosas para producir una infección. Esto es posible gracias a la presencia en el agente infeccioso pili o fimbrias, antígenos de superficie, mucopolisacáridos y ácido lipoteicoico y receptores en las células del hospedero.
- ❖ **Oportunista:** atributo de un agente infeccioso con capacidad de causar enfermedad cuando hay alteraciones en la resistencia en el hospedero.
- ❖ **Patógeno:** microorganismo capaz de ocasionar enfermedad.
- ❖ **Patogenicidad:** atributo de los microorganismos para causar enfermedad.
- ❖ **Toxigenicidad:** capacidad de producir toxina por parte de un microorganismo, lo cual contribuye al desarrollo de la enfermedad.
- ❖ **Virulencia:** grado de patogenicidad, relacionado con la capacidad de invasividad y toxigenicidad de un agente infeccioso.

Mecanismos de defensa del hospedero:

- **Fagocitosis:** mecanismo inespecífico con participación de fagocitos: mononucleares (monocitos y macrófagos) y polimorfonucleares, mediante el cual se ingieren microorganismos y partículas diversas.
- **Fiebre:** síndrome asociado a las infecciones, por acción de endotoxinas, caracterizado por taquicardia, aumento de temperatura, etc.
- **Hospedero:** persona o animal vivo, que en condiciones normales permite la presencia y supervivencia de un agente infeccioso.
- **Inflamación:** proceso de alteración de los tejidos por lesión o destrucción, produciendo signos y síntomas.
- **Macrófago:** célula mononuclear con capacidad fagocítica, presente en los tejidos y sitios de inflamación; cuyo origen está en los monocitos de la médula ósea.
- **Oponina:** sustancia que potencia la fagocitosis (anticuerpo y complemento).
- **Oponización:** recubrimiento de partículas extrañas (microorganismos y otros) por opsoninas que facilitan la captación por las células fagocíticas.
- **Polimorfonucleares (PMN):** leucocitos polinucleares, participantes importantes en la destrucción de los microorganismos.
- **Quimiotaxis:** proceso por el cual los fagocitos reconocen y responden a los factores quimiotácticos permitiendo aproximarse a los agentes invasores.
- **Resistencia:** mecanismos de defensa contra la invasión o multiplicación de los agentes infecciosos, así como de sus efectos tóxicos.
- **Resistencia a la fagocitosis:** mediante:
 - a) Cápsula polisacárido (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*) a polipeptídica (*B. anthracis*)
 - b) Proteína M (*Streptococcus A*)
 - c) Antígenos somáticos o en gramnegativos
 - d) Sustancias secretadas por bacterias, leucocidinas, que matan los leucocitos. A su vez estas acciones pueden ser contrarrestada con anticuerpos específicos (opsoninas, antiproteína M, etc.).
- **Susceptibilidad:** falta de resistencia suficiente que proteja contra microorganismos patógenos para impedir la enfermedad (Liébana 2002).

III. Equipos / Materiales

Tabla 10

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo

Tabla 11

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Hisopo		1 por grupo
4	Rotulador		1 por grupo
5	Porta objetos y cubreobjetos		1 por grupo
6	Gradillas		1 por grupo
7	Puente para tinción		1 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		1 por grupo
9	Placas Petri dividido en 4 con agar nutritivo		1 por grupo
10	Lámina con microorganismos fagocitados		1 por grupo

Tabla 12

Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo

IV. Indicaciones

Tome todas las precauciones de bioseguridad para trabajar.

V. Procedimientos

5.1. Observación de la flora normal de la piel

- Colocar los dedos sin lavar en la superficie del agar en dos cuadrantes.
- Colocar los dedos lavados en la superficie del agar en dos cuadrantes.
- Incubar la placa a 37° por 24 horas.
- Comparar los resultados e interpretar.

5.2. Observación de adherencia de microorganismos

- Colorear el frotis obtenido de un estudiante por grupo.

5.3. Observación de fagocitosis

- Hacer las observaciones, identificando los elementos que intervienen.

VI. Resultados (Dibujos)

VII. Conclusiones

VIII. Sugerencias / recomendaciones

IX. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 Mediante un ejemplo de enfermedad infecciosa explique: vía de entrada, vía de salida, mecanismos de transmisión, fuente de transmisión, periodo de incubación.
- 9.2 Clasifique las enfermedades infecciosas (mapa conceptual o mental)
- 9.3 Mediante un ejemplo explique los mecanismos de respuesta inespecífica de inmune que participan en un proceso infeccioso en la cavidad bucal.

Semana 6: Sesión 2

Serología

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 90 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

II. Propósito

- Interpreta las reacciones antígeno – anticuerpo *in vitro*.
- Identifica los componentes en una reacción serológica y menciona las aplicaciones de estas pruebas.

III. Fundamentos teóricos

La serología es el estudio de los sueros sanguíneos, que son fracciones líquidas obtenidas después de la coagulación de la sangre. Se centra en la detección y estudio de antígenos y anticuerpos presentes en el suero (Liébana, 2002).

Reacciones antígeno – anticuerpo

Antígeno (Ag): sustancias con capacidad de combinarse con los anticuerpos *in vitro* o *in vivo*. Pueden ser macromoléculas de proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos, etc.

Anticuerpo (Ac): proteínas (inmunoglobulinas) producida como resultado de la introducción del inmunógeno y que combina con él.

La reacción antígeno – anticuerpo, constituye el fenómeno central de la inmunología. En estas reacciones se distinguen las siguientes frases:

- a) Unión antígeno – anticuerpo, unión del sitio activo con el determinante antigénico (epítopo), está afectado por factores externos como pH, temperatura, etc.
- b) Manifestaciones de dicha unión, con pruebas *in vitro* o *in vivo*.

Si el antígeno es soluble, el complejo antígeno – anticuerpo precipita.

Si es partícula: glóbulos rojos, bacterias, células, etc., se aglutinará en forma de agregados; en caso de que esta unión se realice en presencia de complemento y eritrocitos como indicador, se lesionará la membrana de los glóbulos motivando la salida de la hemoglobina.

Reacciones serológicas:

Permite identificar antígenos como anticuerpos, siendo uno de ellos conocido.

Precipitación: Características:

Ag soluble, precipitenógeno

Ac, precipitina

Resultado: formación de pequeñas pero visibles escamas o gránulos.

Aplicaciones:

- ✚ Determinar Ac desconocidos en sueros de pacientes.
- ✚ Identificar microorganismos
- ✚ Identificar sustancias proteínicas (Bromatología)
- ✚ Identificar manchas de sangre (Medicina legal)
- ✚ Base para otras técnicas serológicas como inmunodifusión, inmunoelectroforesis, etc.

Aglutinación: Características:

Ag: Aglutinógeno en forma de partículas grandes (bacterias, eritrocitos, partículas de polímeros artificiales en suspensión).

Ac: Aglutininas

Resultado: formación de grumos.

Aplicaciones:

- ✚ Determinar de anticuerpos.
- ✚ Identificación de microorganismos
- ✚ Determinación de grupos sanguíneos y factor Rh.

Estas reacciones son menos específicas por la variedad de antígenos de la célula bacteriana.

Elisa: (inmuno ensayo ligado a enzima)

- ✓ Para determinar antígenos o para determinar anticuerpos:
 - Microplacas sensibilizadas con antígeno correspondiente
 - Aplicación del suero problema
 - Aplicación del conjugado (anticuerpo monoclonal anti IgG)
 - Sustrato más cromógeno
 - Lectura e interpretación

PCR: (reacción en cadena de la polimerasa)

Permite la identificación de secuencia de nucleótidos a partir de pequeñas cantidades por replicación sucesiva.

Figura 2

Pruebas serológicas



Fuente: Google Imágenes (<https://n9.cl/i4uld>)

IV. Equipos / Materiales

Tabla 13

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo

Tabla 14*Materiales*

Ítem	Material	Cantidad
1	Tubo de ensayo con sangre y anticoagulante	1 por grupo
2	Cristal para las reacciones de aglutinación	1 por grupo
3	Pipetas Pasteur con bulbo de 0.2 ml y de 1 ml	1 por grupo
4	Hisopos	1 por grupo
5	Tubo de ensayo	1 por grupo
6	Jeringa con aguja N.º 18 de punta roma	1 por grupo
7	Mondadientes	1 por grupo
8	Láminas excavadas o como anillo de parafina	1 por grupo

Tabla 15*Reactivos*

Ítem	Material	Cantidad
1	Agua clorada	1 por grupo
2	Ac- Ag A de eritrócitos (color azul)	1 por grupo
3	Ac- Ag B	1 por grupo
4	Ac- Ag A+B	1 por grupo
5	Ac contra el Ag Rh	1 por grupo
6	Suero positivo (anti- <i>Treponema pallidum</i>) inactivado por BM 56 °C por 30 minutos.	1 por grupo
7	Suero negativo	1 por grupo
8	Antígeno VDRL (Venereal Disease Research Laboratory, cardiolipina, cholesterol y Lecitina)	1 por grupo
9	Suero anti- <i>Brucella</i>	1 por grupo
10	Suero anti- <i>Salmonella</i>	1 por grupo
11	Ag. Tífico O, Tífico H <i>Brucella abortus</i>	1 por grupo

V. Indicaciones

Toda muestra biológica debe ser considerada como potencialmente reserva de MO patógenos.

VI. Procedimientos**a) Reacción antígeno anticuerpo**

- 6.1. El estudiante seleccionado para la toma de muestra de sangre se presentará al laboratorio en el momento que le indique el personal de laboratorio.
- 6.2. Colocar una gota de cada reactivo o Ac en cada circulito del cristal para las reacciones de aglutinación.
- 6.3. Resuspender la muestra de sangre con ligeros movimientos.
- 6.4. Se toma un poco de muestra con la pipeta Pasteur con mucho cuidado y sin tocar los reactivos colocados en el cristal para las reacciones de aglutinación, una gotita de sangre.
- 6.5. Tapar el tubo de ensayo con sangre y colocarlo en la gradilla.
- 6.6. Mezclar la muestra de sangre con cada reactivo, cada uno con diferentes palitos.

- 6.7. Cada palito usado, tirarlo al recipiente con agua clorada.
- 6.8. Girar un poco la placa sin que se salga la muestra de los circuitos.
- 6.9. Observar las reacciones.

b) Aglutinación

Procedimiento cuantitativo: proceder de acuerdo al siguiente cuadro:

Tabla 16

Procedimiento cuantitativo

Ag Salmonella O: una gota	Ag Salmonella H: una gota	Ag Brucella abortus: una gota
Suero anti-Salmonella	Suero anti-Salmonella	Suero anti-Brucella
0,025 ml (1/40)	0,025 ml (1/40)	0,4 ml (1/25)
0,0125 ml (1/80)	0,0125 ml (1/80)	0,02 ml (1/50)
0,0062 ml (1/160)	0,0062 ml (1/160)	0,01 ml (1/100)

c) Test de Elisa-Anticuerpos anti HIV

Procedimiento del test de Elisa

1. Colocar 150 µl de la muestra y de cada control (positivo y negativo) en cada pocito.
2. Agregar 50 µl de diluyente de la muestra, a las muestras y los controles, mezclar suave dando golpecitos al soporte.
3. Agregar una perla a cada pozo. Tapar y mezclar sin formar burbujas.
4. Incubar a 40 °C en el *commander* por 30 minutos, con rotación.
5. Sacar la placa del *commander* y luego lavar con agua destilada por una vez en el lavador automático.
6. Agregar 200 µl de conjugado diluido a cada pozo. Cubrir y mezclar.
7. Incubar a 40 °C en el *commander* por 30 minutos, con rotación.
8. Faltando 10 minutos para terminar la incubación preparar el sustrato OPD (1 tableta de OPD diluir con 5 ml de diluyente de OPD).
9. Sacar la placa del *commander* y luego lavar con agua destilada por una vez en el lavador automático.
10. Transferir las perlas a tubos limpios (tener cuidado de hacerlo en el orden debido según el protocolo de trabajo). Pipetear 300 µl de OPD en cada tubo y en un tubo que servirá de blanco.

11. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
12. Agregar a cada tubo 1 ml de ácido sulfúrico para detener la reacción.
Mezclar.
13. Leer dentro de las dos horas.
14. Lectura en el Quantum
Usar el módulo A
Programar fecha, hora, filtro, 492, 600, modo 1.28
Leer control negativo por 3 veces
Leer control positivo una vez
Leer la muestra.

VII. Resultados (fotos y dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

- 10.1.** ¿Cuáles son las principales diferencias entre antígenos y anticuerpos?
- 10.2.** Explique el principio detrás de la reacción antígeno – anticuerpo.
- 10.3.** ¿Cómo se pueden identificar las inmunodeficiencias mediante pruebas serológicas?
- 10.4.** ¿Cómo se utilizan las pruebas serológicas en el diagnóstico y monitoreo de enfermedades autoinmunes como el lupus o la artritis reumatoide?

Semana 7: Sesión 2

Parasitología

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen

II. Propósito

- Identifica, analiza y relaciona los principales métodos de diagnóstico de las enfermedades parasitarias en los diferentes estadios, así como investiga los aspectos epidemiológicos de las enfermedades de mayor prevalencia en el país.

III. Fundamentos teóricos

La parasitología es la rama de la biología que se ocupa del estudio de los parásitos, organismos que viven a expensas de otro organismo, llamado huésped. En el contexto de la odontología, los parásitos pueden afectar la cavidad oral y las estructuras relacionadas (Murray et al., 2021).

Clasificación de los parásitos:

✓ **Protozoarios:**

- Organismos unicelulares que pueden causar enfermedades como la amebiasis bucal.
- Algunos pueden formar quistes resistentes en la cavidad oral.

✓ **Helmintos:**

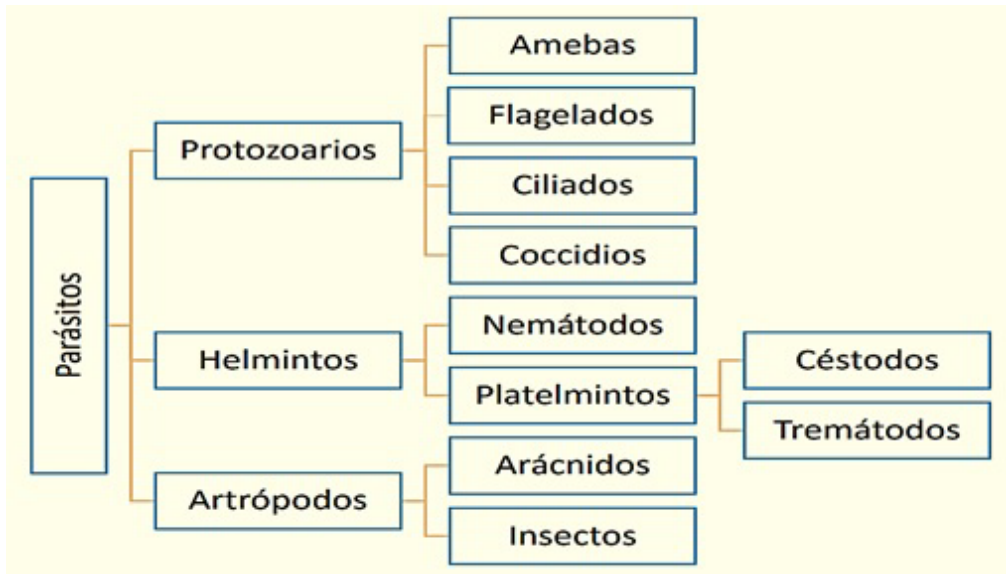
- Incluyen gusanos intestinales y otros helmintos que pueden afectar el sistema gastrointestinal, incluida la cavidad oral.
- Algunos helmintos pueden migrar hacia la región oral durante su ciclo de vida.

✓ **Ectoparásitos:**

- Piojos y ácaros que pueden afectar la piel y el cuero cabelludo, con consecuencias en la salud bucal.

Figura 3

Clasificación general de los parásitos



Fuente: Murray et al. (2021)

Definiciones

- ✚ **Agente infeccioso:** es el microorganismo sea virus, rickettsia, bacteria, hongo, protozooario o helminto, que tiene la capacidad de producir una infección o una enfermedad infecciosa.
- ✚ **Contacto:** es cualquier persona o animal que se ha relacionado con otro infectado o con un ambiente contaminado con posibilidad de contraer la infección.
- ✚ **Contaminación:** presencia de un agente infeccioso en la superficie del cuerpo, materiales, instrumentales, objetos, etc.
- ✚ **Desinfección:** eliminación de agentes infecciosos que están fuera del cuerpo por medio de agentes químicos o físicos.
- ✚ **Endemia:** presencia habitual de una enfermedad o agente infeccioso en un área geográfica determinada. También se considera a la prevalencia usual de una enfermedad dentro de esa zona.
- ✚ **Enfermedad infecciosa:** enfermedad manifiesta resultado de una infección.
- ✚ **Enfermedad transmisible:** cualquier enfermedad causada por un agente infeccioso específico o sus productos tóxicos, que se manifiesta por la transmisión del agente o sus productos, de una persona o animal infectados a un huésped susceptible, directa o indirectamente (vector u objetos).
- ✚ **Epidemia:** presencia de caos de una enfermedad o brote de una comunidad o región que excede la incidencia normal prevista.
- ✚ **Fuente de infección:** persona, animal objeto o sustancia de la cual el agente infeccioso pasa a un huésped.

- ✚ **Huésped u hospedero:** persona o animal vivo, que en circunstancias naturales, permiten la subsistencia o alojamiento de un agente infeccioso.
- ✚ **Periodo de incubación:** tiempo que transcurre entre la exposición a un agente infeccioso y la aparición de síntomas de la enfermedad.
- ✚ **Infección:** ingreso, desarrollo o multiplicación de agente infeccioso en un organismo (persona o animal)
- ✚ **Infestación:** presencia, desarrollo y reproducción de artrópodos en cuerpos, ropa, objetos.

IV. Equipos / Materiales

Tabla 17

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo

Tabla 18

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Plumón indeleble		1 por grupo
4	Portaobjetos y cubreobjetos		1 por grupo
5	Gradillas		1 por grupo
6	Puente para tinción		1 por grupo
7	Pizetas con agua estéril		1 por grupo
8	Cinta Scotch		1 por grupo

Tabla 19

Reactivos

Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo
2	Lugol para heces		1 por grupo
3	Yoduro de potasio		1 por grupo
4	Cristales de yodo		1 por grupo
5	Suero fisiológico		1 por grupo

V. Indicaciones

Para la toma de muestra, el paciente no debe haber consumido antibióticos por lo menos 3 días antes.

VI. Informe

Haga un esquema de sus observaciones indicando las estructuras y estadios correspondientes

Complete el cuadro siguiente con los datos de los protozoarios

Tabla 20

Protozoarios

Nombre del protozooario	Mecanismo de infección	Estadio diagnóstico	Muestra

VII. Resultados (fotos y dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

10.1. Haga un informe de sus observaciones indicando las estructuras y estadios correspondientes.

10.2. Complete el cuadro siguiente con los datos de los protozoarios

Tabla 21

Datos de protozoarios

Nombre	Mecanismo de infección	Estadio diagnóstico	Muestra

10.3. Indique los mecanismos de acción patógena de los parásitos

10.4. Mencione ejemplos de mecanismos de transmisión.

10.5. Mencione ejemplos de vías de infección.

Semana 8: Sesión 2

Protozoarios en sangre y tejidos – helmintos

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

II. Propósito

- Identifica, analiza y relaciona los principales métodos de diagnóstico de las enfermedades parasitarias en los diferentes estadios, así como investiga los aspectos epidemiológicos de las enfermedades de mayor prevalencia en el país.
- Identifica, analiza y relaciona los principales métodos de diagnóstico de las enfermedades helmínticas en los diferentes estadios, así como investiga los aspectos epidemiológicos de las enfermedades de mayor prevalencia.

III. Fundamentos teóricos

Protozoarios en sangre y tejidos (Murray et al., 2021):

- ✓ **Leishmania brasiliensis:** hemoflagelado con dos estadios típicos: amastogote y promastigote. Produce en el país la uta y espundia en zonas endémicas, relacionado con la presencia del vector: Lutzomya.
- ✓ **Amastigote:** forma ovoide, núcleo y cinetoplasto. Forma típica en tejidos de los mamíferos.
- ✓ **Promastigote:** formas flageladas, alargadas, sin membrana ondulante. Presente en cultivos e insectos transmisores.
- ✓ **Trypanosoma cruzi:** produce enfermedad de Chagas o tripanosomiasis sudamericana, en áreas endémicas, relacionada con la presencia del vector: Triatoma infestans.
- ✓ **Tripomatigote:** en sangre del huésped vertebrado, se observa fusiforme con núcleo central, cinetoplasto, membrana ondulante y flagelo anterior libre.
- ✓ **Epimastigote:** forma de transición en vector.

- ✓ **Promastigote:** forma de transición en vector.
- ✓ **Amastigote:** en las células musculares cardíacas y lisas.
- ✓ **Plasmodium:** protozoarios cuyas especies: *P. vivax*, *P. malarie*, *P. falciparum*. Produce la malaria o paludismo en áreas endémicas, transmitido por el *Anopheles*. Parasito de sangre y tejidos. El ciclo vital se desarrolla en dos huéspedes humanos (ciclo sexual) y en el insecto *Anopheles* (ciclo sexual).

Los frotis teñidos los plasmodios se observan como una masa cromatinica rodeado de escaso citoplasma dentro de los glóbulos rojos. Los estadios sucesivos son: Trofozoito anular, T. amiboide, T. maduro, esquizonte maduro, gametocitos (micro y macrogametocito).

Helmintos

Los parásitos intestinales de este grupo se conocen desde la antigüedad y actualmente se conocen sus ciclos de vida, mecanismos de infección, control y tratamiento, pero a pesar de ello sigue siendo un problema frecuente en países como Perú y sobre todo en lugares de clima templado. Los helmintos se clasifican en Nematelmintos (Nematodos) y Platelminintos (cestodos y trematodos).

Nemátodos

- ❖ **Áscaris lumbricoides:** parásito del intestino del hombre (ascariasis)

Estadios:

Huevo: en heces se observa de forma ovalada mamelonados o no

Larvas: con 3 mudas migratorias. Ciclo de Loos: entérico - hepato – pulmonar – entérico

Adulto: observar morfología, tamaño, dimorfismo sexual. Macho con extremo curvo, espículas. Hembras con parte posterior recto, y vulva en la mitad anterior del cuerpo.

- ❖ **Trichocephalus dispar o trichuris trichiura:** porción filiforme en sus tres quintos anteriores. Se localiza en el ciego produce trichuriasis. Estadios:

Huevo: en heces, se observa de forma de barril con los polos bien diferenciados y triple capsula.

Larvas: penetra en la zona cercana al intestino delgado.

Adulto: macho, de 30 – 45 mm de longitud, parte posterior más gruesa enrollada y con espícula lanceolada. Hembra: alargada de 35 - 50 mm de longitud, presenta la vulva en la intersección de la porción filiforme con la mayor dimensión. Vive adherida a la pared del ciego.

- ❖ **Enterobius vermicularis:** se localizan en el intestino, porción del ciego. Produce oxiuriasis o enterobiasis.

Estadios:

Huevo: ovoide aplanado en la cara ventral, mide 50 – 60 μm

Larvas: sufre dos mudas.

Adulto: macho de 2 – 5 mm con el extremo anterior encorvado. Una espícula.

Hembra: 8 – 13 mm cola afilada.

Para el diagnóstico se emplea la técnica de la cinta adhesiva (Graham).

Cestodos

- ❖ **Taenia solium:** los adultos hermafroditas se localizan en el intestino del hombre produciendo teniasis y las larvas *Cysticercus cellulosae* (equivocadamente llamada triquina) en los músculos del cerdo. En el hombre es muy dramática la presencia del *Cysticercus cellulosae* en el SNC ya que produce neurocisticercosis.

Estadios:

Huevo: de forma más o menos esférica, con cápsula gruesa, dentro se localiza el embrión (oncosfera) con tres pares de ganchos.

Larvas: la oncosfera ya libre se localiza en los músculos y cerebro, transformándose en *Cysticercus*.

Adulto: constituido por el escólex y los proglótides o anillos: inmaduros, maduros y grávidos. El anillo grávido con ramificaciones en número de 7 – 13, en promedio 9.

- ❖ **Taenia sanginata:** los adultos parasitan el intestino del hombre (teniasis) y las larvas (*Cysticercus bovis*) los músculos del ganado vacuno.

Estadios:

Huevo: similares a los *T. solium*.

Larvas: la oncosfera libre se fija a los músculos del ganado vacuno y da lugar al cisticerco.

Adulto: con escólex a diferencia del *T. solium*, no presenta rostellum con ganchos solo 4 ventosas. Cuello corto y más delgado que la cabeza. Estróbilo formado por las proglótides: inmaduro, maduro y grávidos. El anillo grávido con 15 – 20 ramificaciones uterinas en promedio 18.

- ❖ **Echinococcus granulosus:** produce en el hombre la hidatidosis o quiste hidatídico, al constituir huésped intermediario. Llamado la "tenia de los perros".

Estadios:

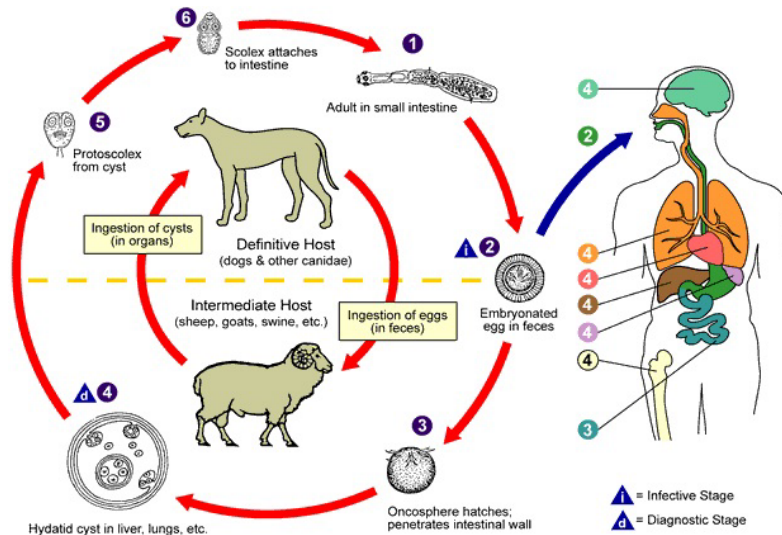
Huevo: morfología similar a las otras tenías, con cápsula gruesa, con la oncosfera interna de 30 – 38 μm .

Larvas: presente en diversos órganos: hígado, pulmones, etc.

Adulto: en perros y otros cánidos (Murray et al., 2021).

Figura 4

Patogenia del *Echinococcus granulosus*



Fuente: Google Imágenes (<https://n9.cl/91mrq>)

IV. Equipos / Materiales

Tabla 22

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo
2	Estereoscopio		1

Tabla 23

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Rotulador		1 por grupo
4	Porta objetos y cubreobjetos		1 por grupo
5	Gradillas		1 por grupo
6	Puente para tinción		1 por grupo
7	Pizetas con agua estéril		1 por grupo

Tabla 24*Reactivos*

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Giemsa		1 por grupo
2	Wright		1 por grupo
3	Leishman		1 por grupo

V. Indicaciones

Tome todas las precauciones de bioseguridad para trabajar.

VI. Clasificación de los parásitos de interés en la cultura médica del odontólogo

Tabla 25

Clasificación de los parásitos que se encuentran en la labor del odontólogo

Protozoos microscópicos, unicelulares			Helmintos Macroscópicos, multicelulares sin simetría bilateral		Artrópodos Macroscópico, multicelulares, con simetría bilateral							
Clase Ciliata	Clase Sarcodina	Clase Mastigophora	Clase Apicomplexa	Clase Plathelmintha Aplanados y monoicos	Clase Nematoda	Clase: Arácnida Capítulo y abdomen (tórax y abdomen unidos)		Clase: Insecta Cabeza, tórax y abdomen, debidamente definidos				
Ciliados	Pseudopodales	Flagelados	Esporozoarios o coccidiodeos	Trematodes	Cestoda	Acaros <2 mm	Garrapatas >2 mm	Orden Hemiptera	Orden Diptero	Orden Anoplura	Orden Siphonaptera	
Balantidium	Entamoeba	Giardia Trichomonas Leishmania Trypanosoma	Plasmodium Toxoplasma Cryptosporium	Fasciola Paragonimus	Taenia Echinococcus Hymenolepis Diphyllobothrium	Ascaris Ancylostoma Enterobius Trichuris	Sarcpotes	Argos	Triatoma	Anopheles Culex	Pediculus Phthirus	Pulex xenopsylla

VII. Resultados (Dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

10.1 Elabore un cuadro para los helmintos con los siguientes datos:

Tabla 26

Helmintos

Nombre del parásito	Mecanismo de infección	Forma infectiva	Forma diagnóstica

- 10.2 ¿Cómo puede la malaria afectar las estructuras orales y la cavidad bucal?
- 10.3 ¿Cuáles podrían ser las manifestaciones orales de una infección por *Enterobius vermicularis* en un paciente dental?
- 10.4 ¿Cómo podría la presencia de *Áscaris lumbricoides* en el tracto gastrointestinal afectar la salud oral?

Tercera Unidad

Microorganismos relacionados con patologías orales



Semana 9: Sesión 2

Aislamiento de *staphylococcus* y *streptococcus*

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

II. Propósito

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Observará las características microscópicas de *Staphylococcus spp*, a partir de cultivos puros.
- Identificará las características microscópicas de los *Streptococcus*.

III. Fundamentos teóricos

2.1 Los *Staphylococcus spp*:

Según Liébana (2002), son cocos G+ que se encuentran aislados en parejas, tétradas, cadenas cortas, o en forma de racimo de uvas. Son inmóviles, no espuralados y no encapsulados. La mayor parte de las especies son anaerobias facultativas. Son bastante resistentes a la acción del calor y de las sales biliares, cloruro de sodio al 9 % y de la octoquina. Los medios de cultivo empleados para su aislamiento son: agar manitol salado, agar Columbia, y agar estafilococo.

Pueden diferenciarse de otros géneros por la producción de la enzima coagulasa, hemólisis, resistencia a la novobiocina, actividad fosfatasa, ureasa, entre otros.

2.2 Los *streptococcus*:

Son cocos G+ inmóviles, y negativos para la catalasa y la oxidasa. Crecen en parejas o en cadenas de diferente longitud. Las células aisladas son esféricas u ovoides y se dividen en un plano perpendicular al eje de la cadena, de modo que

cuando se presentan en forma de diplococos, pueden tener aspecto de bacilos. La mayor parte, crece bien en los medios generales de laboratorio que contienen sangre o derivados, tales como agar Columbia, y agar tripticasa soya, con 5 % de sangre de carnero o agar chocolate (Liébana, 2002).

IV. Equipos / Materiales

Tabla 27

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo
2	Estereoscopio		01
3	Jarra de anaerobiosis		01

Tabla 28

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Espátula de Drigalski		1 por grupo
4	Marcador de vidrio		1 por grupo
5	Porta objetos y cubreobjetos		1 por grupo
6	Gradillas		1 por grupo
7	Puente para tinción		1 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		1 por grupo
9	Papel de trigo		1 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		2 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		1 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		1 por grupo
13	Tubos con caldo BHI		2 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado		1 por grupo
15	Placas Petri con agar Staphylococcus 110		2 por grupo
16	Placas Petri con agar chocolate		

Tabla 29

Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo
2	Azul de metileno		1 por grupo
3	H ₂ O ₂		1 por grupo
4	Plasma sanguíneo o material para obtenerlo		1 por grupo
5	Novobiocina		1 por grupo

V. Indicaciones

Tome todas las precauciones de bioseguridad para trabajar.

VI. Procedimientos

- 6.1 A partir de los cultivos puros, realizar un frotis y teñido con la técnica de Gram y observar al microscopio.
- 6.2 Sembrar los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* en agar sangre y agar estafiloco 110. Incubar a 37 °C durante 24 horas. Observar la hemólisis producida y el viraje de color de medio.
- 6.3 Sembrar las mismas cepas en agar manitol salado, caldo BHI, agar chocolate. Incubar a 37 °C durante 24 horas y observar los cambios.
- 6.4 Prueba de la catalasa: con asa de siembra, recoger del centro del cultivo, y colocar la muestra sobre un portaobjetos limpio, agregar con una pipeta Pasteur, una gota de H₂O₂ al 30 %. Observe los cambios.
- 6.5 A partir del cultivo de estreptococos beta, alfa, y gamma hemolíticos, hacer un frotis y teñirlos con la técnica de Gram. Observar al microscopio.
- 6.6 Sembrar los cultivos de estreptococos en agar sangre. Incubar a 37 °C +/- 2 °C y observar la hemólisis producida.

VII. Resultados (dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

- 10.1 ¿Qué tipo de pigmento producen las cepas de estafilococos y estreptococos?
- 10.2 ¿Cuáles son las infecciones estafilocócicas del tracto respiratorio y de la piel?
- 10.3 ¿Por qué los estafilococos presentan resistencia a la penicilina?
- 10.4 Dependiendo de su acción hemolítica, ¿cómo se clasifican los estreptococos?
- 10.5 Describa la clasificación de Lancefield.

Semana 10: Sesión 2

Prueba de actividad cariogénica

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

II. Propósito

- Desarrollará la cuantificación de especies bacterianas potencialmente cariogénicas.
- Observará la relación del pH salival con la cuantificación de especies cariogénicas.

III. Fundamentos teóricos

La caries dental es un proceso patológico de destrucción de los tejidos dentales, causada por MO. Las bacterias se encuentran normalmente en la boca. Estas bacterias convierten los alimentos, especialmente los azúcares y almidones, en ácidos. Las bacterias, el ácido, los pedazos de comida y la saliva se combinan en la boca para formar una sustancia pegajosa llamada placa. La placa se pega a los dientes. Es más común en los molares posteriores, justo encima de la línea de la encía en todos los dientes y en los bordes de las obturaciones (Liébana, 2002).

La placa que no se elimina de los dientes se convierte en una sustancia llamada sarro o cálculo. La placa y el sarro irritan las encías, produciendo gingivitis y periodontitis.

Los ácidos en la placa dañan el esmalte que cubre los dientes. La placa comienza a acumularse en los dientes al cabo de 20 minutos después de comer. Si ésta no se quita, comenzará a presentar caries. Las caries generalmente no duelen, a menos que se tornen muy grandes y afecten los nervios o causen una fractura del diente. Sin tratamiento, pueden llevar a un absceso dental (Liébana, 2002).

Los alimentos pegajosos son más dañinos que los no pegajosos, ya que permanecen sobre los dientes. Los refrigerios frecuentes aumentan el tiempo en que los ácidos están en contacto con la superficie del diente.

La saliva

La saliva es un fluido que se origina en las glándulas salivales mayores y menores, el cual se produce de manera constante permitiendo una acción limpiadora sobre las superficies de los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal. Se encuentran además en su composición propiedades antibacterianas que se originan de factores inmunes específicos y no específicos que incrementan su poder anticariogénico.

Además, la saliva también posee una capacidad amortiguadora y neutralizadora de los ácidos producidos por los organismos cariogénicos o ingeridos a través de la dieta, permitiendo mantener un pH relativamente constante. Es también una fuente constante de calcio y fosfato, necesarios para la remineralización del esmalte.

Se consideran como pacientes de alto riesgo a aquellos que presentan valores iguales o superiores a 10^5 UFC para *Lactobacillus sp.*, y más de 10^6 UFC para estreptococos del grupo *mutans* en una muestra de saliva (Negróni, 2018).

Principales microorganismos implicados

- *Streptococcus mutans* (más encontrado en cultivos de dientes maltratados)
- *Streptococcus sobrinus*
- *Streptococcus mitis*
- *Streptococcus salivarius*
- *Streptococcus sanguis*
- *Actinomyces viscosus*
- *Actinomyces naeslundii*
- *Streptococcus oralis*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Haemophilus*

IV. Equipos / Materiales

Tabla 30

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo
2	Contador de colonias		01
3	Micropipetas		01
4	Jarra de anaerobiosis		01

Tabla 31

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Espátula de Drigalski		1 por grupo
4	Marcador de vidrio		1 por grupo
5	Portaobjetos y cubreobjetos		1 por grupo
6	Gradillas		1 por grupo
7	Puente para tinción		1 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		1 por grupo
9	Papel de trigo		1 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		1 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		1 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		1 por grupo
13	Placas Petri con agar BHI		1 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado		1 por grupo
16	Placas Petri con agar chocolate		1 por grupo
17	Tubos con caldo BHI		1 por grupo

Tabla 32

Reactivos

Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo
2	Azul de metileno		1 por grupo

V. Indicaciones

Para la toma de muestra, el paciente no debe haber consumido antibióticos por lo menos 3 días antes.

VI. Procedimientos

- 6.1.** Estimular el flujo salival del paciente solicitándole que realice movimientos de masticación.
- 6.2.** Recoger la saliva en un recipiente estéril
- 6.3.** Coger 10 uL de muestra y sembrarla en agar sangre, chocolate, BHI y manitol salado.
- 6.4.** Incubar durante 48 horas a 37 °C
- 6.5.** Finalmente, realizar el recuento de las bacterias para la valoración respectiva.

VII. Resultados (fotos y dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

- 10.1. ¿Qué métodos se emplean para determinar la actividad cariosa?
- 10.2. ¿Cuál es la Teoría de Miller?
- 10.3. ¿Qué características microscópicas tienen los *Lactobacillus* y *Streptococcus mutans* de la boca?
- 10.4. ¿Qué aspecto tienen las colonias de *Lactobacillus* y *Streptococcus mutans*?
- 10.5. ¿Cómo se realiza la cuenta de las colonias de *Lactobacillus* y *Streptococcus mutans*?

Semana 11: Sesión 2

Micología de importancia médica y odontológica

– estudio de *Cándida albicans*

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos Docente:

..... Unidad: 3

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen

II. Propósito

- Identifica, reconoce y relaciona las características diferenciales de los hongos de importancia médica y odontológica.
- Aplica los pasos para el diagnóstico de laboratorio de los principales hongos ambientales.
- Identifica, analiza y relaciona las características de los géneros productores de micosis superficial, subcutáneas, profunda y oportunista por microscopia y cultivo.
- Aplica técnicas de toma de muestra, transporte y procesamiento.
- Identificará las características macroscópicas del género *Cándida* por medio de su cultivo
- Identificará las características microscópicas del género *Cándida* por medio de observación al microscopio y pruebas bioquímicas.

III. Fundamentos teóricos

Micología/ Hongos ambientales

Generalidades

Los hongos son organismos no diferenciados, constituido por un cuerpo indiferenciado llamado talo, que puede ser unicelular o pluricelular, carece de clorofila, son heterótrofos. Se hallan distribuidos ampliamente en la naturaleza, pueden ser saprofitos, algunos de los cuales desempeñan papel importante en la naturaleza y en la industria. Los hongos patógenos pueden atacar a plantas, animales y el hombre, en estos pueden producir infecciones superficiales y sistémica, el curso de la enfermedad es lento y de evolución crónica. El estudio se realiza microscópicamente mediante

coloración de azul de lactofenol y otros, así como mediante cultivos en tubos, láminas (microcultivos) y placa (colonia gigante) (Murray et al., 2021).

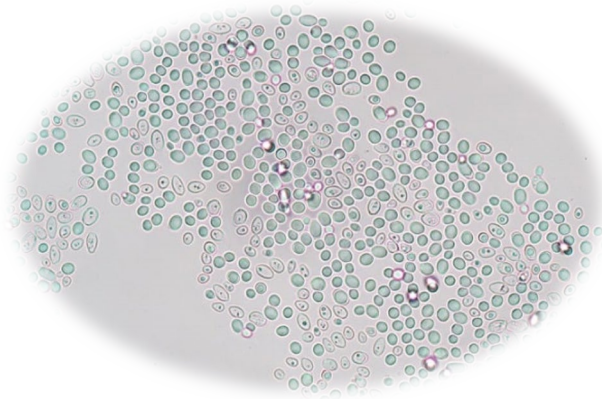
Clasificación:

De acuerdo a las estructuras los hongos pueden ser filamentosos, levaduras y levaduriformes.

- ❖ **Hongo filamentoso:** macroscópicamente pueden presentar micelio de aspecto algodonoso, aterciopelado, polvoriento, puede presentar pigmento o no, microscópicamente se observan hifas septadas o aseptadas y esporas características en cuanto a forma, disposición y origen.
- ❖ **Hongo levaduras:** macroscópicamente, se observan de aspecto cremoso semejante a cultivo bacteriano, microscópicamente son unicelulares, redondeadas u ovals, que se reproducen por gemación.
- ❖ **Hongo levaduriforme:** con características semejantes al anterior, con la diferencia que pueden producir pseudohifas a partir de la germinación de las células de levaduras. Ej. *C. albicans*.

Figura 5

Morfología de los hongos



Fuente: Google Imágenes (<https://n9.cl/n0xb8>)

Las investigaciones pueden hacerse a partir de diversas fuentes (ambientes) y muestras sospechosas como pelo, piel, uñas. Biopsias, exudados, secreciones, alimentos, etc.

Métodos más comunes para el diagnóstico micológico

Microscopia: observación de objetos muy pequeños bajo grandes aumentos.

Examen directo: utilizado para la observación a partir de las muestras de lesiones superficiales con muestras de pelo, piel o uñas u otras.

Coloración con azul de metileno: al 2.5 % en alcohol de 95°.

Coloración de azul de lactofenol: colorante que contiene ácido láctico, fenol, glicerina, agua destilada y azul de algodón.

Hongos ambientales

El estudio de estos hongos es de importancia por su presencia en las muestras, los cultivos, etc. El origen puede ser la contaminación ambiental al momento de sembrar o estar incluidos en las muestras que se procesan, por lo tanto, la interpretación de los hallazgos debe considerar, entre otros, su frecuencia en la lesión y referencia de las condiciones del paciente para ser considerado como posible agente etiológico.

El desarrollo en medios de cultivos artificiales se da entre 3 – 5 días.

Penicillium

Características microscópicas: hifas septadas, conidióforo septado, metula, esterigmas, microconidias en cadenas.

Características del cultivo: al inicio de aspecto algodonoso y color blanquecino, luego verdoso, pulverulento o polvoriento.

Aspergillus

Características microscópicas: hifas septadas, conidióforo no septado, vesícula, esterigmas, microconidias en cadenas.

Características del cultivo: al inicio de aspecto algodonoso y color blanquecino, luego amarillo azufre, negruzco.

Rhizopus

Características microscópicas: hifas cenocíticas (filamento multinucleado), rizoides, esporangióforo no septado, esporângio globoso, esporangiosporas.

Características del cultivo: al inicio de aspecto algodonoso y color blanquecino, luego grisáceo.

Saccharomyces

Características microscópicas: células ovaladas, entre 2 – 8 μm , algunas con presencia de yemas o brotes.

Características del cultivo: crecimiento rápido, aspecto cremoso, olor característico.

Hongos de importancia médica

Hongos de micosis superficial o cutánea o dermatofito

Constituidos por hongos parásitos que producen micosis cutáneas: piel, uñas y pelos. No invaden órganos ni tejidos. Pueden encontrarse en el suelo e infectar animales y de estos pasar al hombre (zoonosis), la enfermedad se denomina dermatomicosis. Las lesiones se caracterizan por máculas eritematosas y pruriginosas, descamativas, bordes definidos. Los géneros involucrados son *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (Murray et al., 2021).

Características:

- ✚ **Trichophyton:** ataca piel, pelo, uñas, produce tiñas, pie de atleta.
 - **Caracteres macroscópicos:** las colonias de tipo algodonoso, aterciopelado, polvoriento, con pigmentación variada que puede difundir en el medio o apreciarse alrededor del crecimiento.
 - **Caracteres microscópicos:** microconidias pequeñas, aisladas o en racimos a lo largo de las hifas, macroconidios de aspecto claviforme, pared lisa que rara vez se aprecia. Pueden formar filamentos en forma de raqueta, cuerpos nodulares, hifas en espiral y clamidosporas.
- ✚ **Microsporum:** ataca piel y pelo, produce tiñas
 - **Caracteres macroscópicos:** las colonias de tipo algodonoso, aterciopelado, polvoriento, con pigmentación de blanco a pardo.
 - **Caracteres microscópicos:** microconidias en forma de clavav. Macroconidias en forma navicular (huso) con paredes gruesas, forma clamidosporas, hifas en raquetas y cuerpos nodulares.
- ✚ **Epidermophyton:** ataca piel y uñas.
 - **Caracteres macroscópicos:** colonias de aspecto aterciopelado, polvoriento, de color verde amarillento, con grietas centrales radiales que muta rápidamente a hifas estériles.
 - **Caracteres microscópicos:** solo se observa macroconidias en forma de mazo, cubierta por membrana lisa, también puede formar clamidosporas e hifas en raqueta.

Estudio de *Cándida albicans*

Las infecciones micóticas producidas por las levaduras del género *Cándida*, especialmente por *Cándida albicans*, son complicaciones importantes en los pacientes inmunosuprimidos. Las tasas de morbilidad y mortalidad de estas infecciones se han incrementado considerablemente durante las últimas dos décadas.

Frecuentemente, la candidiasis de las mucosas (oral, gastrointestinal y vaginal), es el primer signo del deterioro de la función inmunológica. La severidad de las infecciones micóticas aumenta proporcionalmente con el aumento de la disfuncionalidad del sistema inmune; por lo tanto, los episodios de candidiasis en las superficies mucosas son muy frecuentes y difíciles de tratar.

El desarrollo de nuevos procedimientos terapéuticos, asociados al deterioro de la respuesta inmune y a los factores de virulencia que posee *Cándida*, como la propiedad de adherencia, la habilidad de competir con otros microorganismos por nutrientes y la capacidad de evadir las defensas del hospedero, interactúan entre sí, aumentando la frecuencia de la candidiasis en el paciente inmunosuprimido.

Otro factor determinante de patogenicidad que influye en la boca para que *Cándida albicans*, como residente habitual de la misma, pase de saprofito a patógeno, son las prótesis odontológicas. En referencia a hábitos de uso e higiene de las prótesis, se refiere el hallazgo de *Cándida albicans* en mucosa y superficie de las prótesis (Negroni, 2018).

IV. Equipos, Materiales y Reactivos

Tabla 33

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo
2	Contador de colonias		01
3	Micropipetas		01
4	Jarra de anaerobiosis		01

Tabla 34*Materiales*

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Espátula de Drigalski		1 por grupo
4	Marcador de vidrio		1 por grupo
5	Porta objetos y cubreobjetos		5 por grupo
6	Gradillas		1 por grupo
7	Puente para tinción		1 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		1 por grupo
9	Papel de trigo		1 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		1 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		2 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		1 por grupo
13	Placas Petri con agar BHI		1 por grupo
14	Placa Petri descartable		1 por grupo
15	Bajalengua estéril		1 por grupo
16	Hisopo estéril		1 por grupo
15	Algodón		1

Tabla 35*Reactivos*

Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo
2	Batería de tinción ácido alcohol resistente		1 por grupo
3	KOH 10 %		1 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		1 por grupo
5	Azul de metileno/lactofenol/algodón		1 por grupo

V. Indicaciones

- Informa al paciente sobre el procedimiento y la importancia de seguir las instrucciones.
- Asegúrate de que el paciente no haya comido ni bebido nada durante al menos 30 minutos antes de la toma de muestra.

VI. Procedimientos**6.1. Raspado bucal:**

- Se realizará en dos estudiantes de cada grupo.
- Raspar la zona a estudiar con un bajalenguas o con un hisopo.
- El material obtenido pasarlo a un portaobjetos.
- Colorear
- Observar al microscopio.

6.2. Examen directo:

- Colocar 1 gota de KOH al 20 % a cada muestra tomada. Cubrirla con el cubreobjetos.
- Cada muestra se debe calentar ligeramente al mechero, para acelerar el aclarado.
- Observar al microscopio con el objetivo de 40X
- Interpretar el resultado: Será positivo (+) si se observa presencia de blastoconidias y pseudomicelios. Será negativo (-), si solo se observa blastoconidias.

6.3. Cultivo de cepas:

- Resembrar la cepa proporcionada por el laboratorio, en agar Sabouraud. Usar el método de estría cruzada.
- Revisar los cultivos y observar las características propias de las colonias. Registrar los hallazgos.

6.4. Formación del tubo germinativo

- Incubar en baño maría a 37 °C por 30 minutos, las cepas obtenidas en los cultivos anteriores.
- Usar como medio de cultivo, 1 mL de suero o plasma en un tubo con tapa rosca.
- Al finalizar el tiempo indicado, colocar 1 gota de la suspensión obtenida, en un portaobjetos y observar al microscopio.

VII. Resultados (fotos y dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

- 10.1.** ¿Por qué el agar Sabouraud se emplea en el diagnóstico microbiológico de laboratorio?
- 10.2.** ¿En qué difieren las paredes celulares de hongos y bacterias?
- 10.3.** Explique por qué no se puede usar la técnica de Gram para observar los hongos.
- 10.4.** Describa qué es el pleomorfismo y en qué hongos se presenta.
- 10.5.** Explique qué es el dimorfismo y qué especie de hongos lo presentan.
- 10.6.** Mencione las especies de *Cándida* que pueden estar implicadas en la candidiasis oral.
- 10.7.** ¿Cuáles son los hongos más comúnmente asociados con infecciones orales en pacientes dentales?
- 10.8.** ¿Cómo se manifiestan las infecciones fúngicas en la cavidad oral y qué síntomas pueden observarse?

Semana 12: Sesión 2

Estudio de microorganismos del surco gingival

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

II. Propósito

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Obtendrá muestras de placa dentobacteriana subgingival y realizará el cultivo de MO anaerobiosis.
- Observará la diversidad de MO que habitan en el surco gingival.

III. Fundamentos teóricos

Las enfermedades periodontales son infecciones que se caracterizan por la pérdida progresiva de los tejidos de soporte del diente. Son causadas por grupos específicos de MO que colonizan la superficie dental y el surco gingival. Los dos cuadros patológicos principales que las caracterizan son la gingivitis y la periodontitis.

El primer evento para que comience la formación de una biopelícula, es la adhesión bacteriana. Las bacterias poseen mecanismos específicos para adherirse a los tejidos o superficies. Muchas bacterias poseen componentes proteínicos en su superficie llamados "adhesinas", los que se unen de manera específica a moléculas complementarias o receptores que se encuentran en la superficie de los tejidos. Pocos minutos después de realizar una limpieza dental profesional, los primeros colonizadores, cocos y bacilos G+, principalmente de los géneros *streptococcus* y *actinomyces* se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana (Negroni, 2018).

IV. Equipos / Materiales

Tabla 36

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo
2	Jarra de anaerobiosis		1

Tabla 37

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Espátula de Drigalski		1 por grupo
4	Marcador de vidrio		1 por grupo
5	Portaobjetos y cubreobjetos		1 por grupo
6	Gradillas		1 por grupo
7	Puente para tinción		1 por grupo
8	Pizzetas con agua estéril		1 por grupo
9	Papel de trigo		1 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		1 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		1 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		1 por grupo
13	Placas Petri con agar BHI		1 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado		1 por grupo
15	Placas Petri con agar chocolate		1 por grupo
16	Tubos con caldo BHI		

Tabla 38

Reactivos

Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo
2	Batería de tinción ácido alcohol resistente		1 por grupo
3	KOH 10 %		1 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		1 por grupo
5	Azul de metileno/lactofenol/algodón		1 por grupo

V. Indicaciones

Realizar investigación sobre la formación de una biopelícula dental, composición de la placa bacteriana.

VI. Procedimientos

- 5.1. En la mesa del laboratorio limpia. Con todos los materiales que se van a utilizar.
- 5.2. Sentar al paciente cerca del campo de trabajo.
- 5.3. Aislar la zona de los primeros o segundos molares inferiores y eliminar con una de las puntas de la cureta, la placa supragingival.
- 5.4. Tomar la muestra de la placa subgingival de la zona mesiovestibular del molar seleccionado, raspando suavemente el surco gingival con la otra punta de la cureta.
- 5.5. Colocar la muestra dentro del tubo que contiene el caldo BHI.
- 5.6. Posteriormente se realizará el replicado –por duplicado– a partir del caldo a los siguientes medios: agar sangre, agar chocolate, y agar tripticasa soya. El primer grupo de placas, se incubará en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 7 días. El segundo grupo, se incubará en condiciones aerobias a 37 °C por 3 a 5 días.
- 5.7. Al finalizar el tiempo de incubación, comparar las diferencias morfológicas de cada colonia bacteriana.
- 5.8. Dibujar y describir sus observaciones.

VII. Resultados (fotos y dibujos)

VIII. Conclusiones

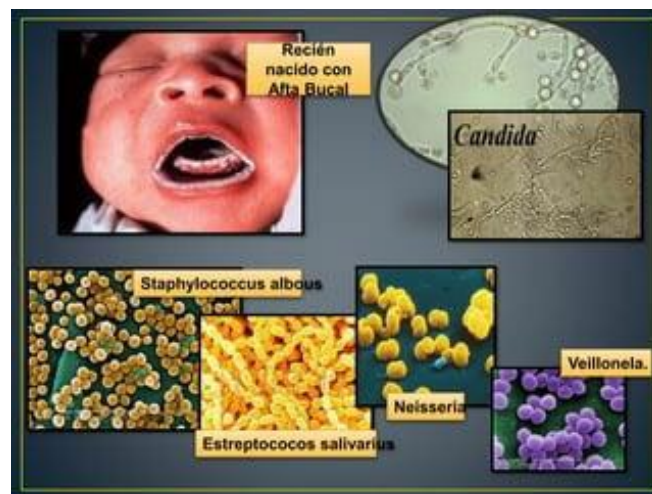
IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

- 10.1. ¿Cuál es la importancia de la microflora bucal?
- 10.2. ¿Qué son las enfermedades periodontales y cómo se clasifican?
- 10.3. ¿Qué es la placa dentobacteriana?
- 10.4. ¿Qué son las biopelículas?
- 10.5. Mencione 5 especies de MO que componen la microflora normal en la placa subgingival y supragingival.
- 10.6. Mencione tres MO relacionados con las enfermedades periodontales.

Cuarta Unidad

Ecología bucal. Microbiología de las patologías infecciosas bucodentales



Semana 13: Sesión 2

Exudado faríngeo

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 2

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

II. Propósito

- El estudiante aplicará las técnicas de toma de muestra.
- Realizará la citología exfoliativa y siembra en medio de cultivo, del raspado del exudado faríngeo.
- Identificará, por las características morfológicas de las colonias y las reacciones bioquímicas, en los medios de cultivo, los géneros bacterianos aislados.

III. Fundamentos teóricos

El cultivo del exudado faríngeo es el principal procedimiento para demostrar la etiología estreptocócica de procesos infecciosos como: faringoamigdalitis, impétigo, erisipela, fiebre escarlatina, fiebre reumática, o la glomerulonefritis (Liébana, 2002; Negroni, 2018).

Figura 6

Toma de muestra de exudado faríngeo



Fuente: Google Imágenes

IV. Equipos / Materiales

Tabla 39

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo
2	Estereoscopio		1
3	Jarra de anaerobiosis		1

Tabla 40

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Espátula de Drigalski		1 por grupo
4	Marcador de vidrio		1 por grupo
5	Portaobjetos y cubreobjetos		1 por grupo
6	Gradillas		1 por grupo
7	Puente para tinción		1 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		1 por grupo
9	Papel de trigo		1 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		1 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		1 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		1 por grupo

13	Tubos con caldo BHI	1 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado	1 por grupo
15	Placas Petri con agar Staphylococcus 110	1 por grupo
16	Placas Petri con agar chocolate	
17	Tubos con caldo BHI	
18	Tubos con medio de transporte Cary Blair	

Tabla 41

Reactivos

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo
2	Batería de tinción ácido alcohol resistente		1 por grupo
3	KOH 10 %		1 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		1 por grupo
5	Azul de metileno/lactofenol/algodón		1 por grupo

V. Indicaciones

Toda muestra biológica debe ser considerada como potencialmente reserva de MO patógenos.

VI. Procedimientos

- 6.1. El estudiante seleccionado para la toma de muestra del exudado faríngeo, deberá encontrarse con 4 horas de ayuno. Sin beber agua y sin haber realizado la higiene bucal.
- 6.2. Con un hisopo estéril, se realizará un raspado enérgico de la región faríngea evitando contaminar la muestra con la saliva.
- 6.3. Una vez tomada la muestra con el hisopo, se depositará en un extremo de los medios de cultivo y se realizará la citología exfoliativa, extendiendo la muestra sobre el portaobjeto.
- 6.4. El extendido se teñirá con la técnica de Gram y se observará al microscopio.
- 6.5. Con el asa bacteriológica estéril se realizará el extendido, sobre los medios de cultivo, para el aislamiento apropiado de las bacterias.
- 6.6. Los medios de cultivo se incuban a 35 °C con una tolerancia de +/- 2 °C, durante 24 a 72 horas.
- 6.7. Al término, se estudiarán las características morfológicas de las colonias y la reacción bioquímica respectiva.

VII. Resultados (fotos y dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

10.1. ¿Qué se observa en la citología exfoliativa del exudado faríngeo teñido con Gram?

10.2. ¿Cuál es la función y el fundamento de los diversos medios de cultivo utilizados en esta práctica?

Semana 14: Sesión 2

Virología – Virus de importancia estomatológica

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 4

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen.

II. Propósito

- Identifica las características diferenciales de los virus.
- Conoce e investiga algunas técnicas para su diagnóstico en el laboratorio.
- Observa los efectos citopáticos de los virus en cultivos celulares.
- Identifica las características generales y diferenciales que permiten el diagnóstico de los virus de importancia estomatológica.

III. Fundamentos teóricos

Generalidades

Los virus son agentes infecciosos muy pequeños, miden de 20 a 400 nm; son parásitos genéticos intracelulares obligados; carecen de organelos y metabolismo propio; de allí que ningún medio químico por complejo que sea, permite su reproducción. Se replican solo en células vivas y su parasitismo es obligado. Los virus parasitan microorganismos unicelulares tales como micoplasma, bacterias, algas, plantas y animales superiores e incluso al hombre.

Existen tres sistemas que pueden ser empleados para intentar la reproducción de un virus: Animales susceptibles, huevos embrionados y células cultivadas *in vitro*. No todos los sistemas sirven para todos los virus, por tanto, hay que seleccionar el sistema por el que el virus tiene afinidad.

- ✓ **Animales susceptibles:** la inoculación en animales es un método de gran valor para estudio de respuesta inmune, así como el aislamiento primario. Las vías de inoculación son intracerebral, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, etc. Solo se

realiza en laboratorios especializados y las observaciones se realizan en función de los signos de la enfermedad y del examen de los tejidos luego del sacrificio de los animales. Del mismo modo permite determinar la dosis infectante.

- ✓ **Huevos embrionados:** muchos de los virus patógenos para el hombre y los animales pueden desarrollarse en la cavidad amniótica, cavidad alantoidea, saco vitelino, membrana criolantoidea (herpes, viruela), o embrión (encefalitis). Luego de la incubación adecuada, se examina para la observación de la proliferación viral o las alteraciones producidas.
- ✓ **Cultivo celular *in vitro*:** esta técnica de gran utilidad actualmente nació en el siglo XIX y que con el descubrimiento de los antibióticos y el uso de encimas como la tripsina, es la más popular por su facilidad de obtención, menos onerosa, requiere de menos cuidados y permite evitar la contaminación bacteriana.

Principales características de los virus relacionados con la cavidad bucal

✚ Citomegalovirus (CMV)

Virus ampliamente distribuido, cuya infección es asintomática en personas inmunocompetentes, su importancia se eleva por su participación en casos de pacientes inmunocomprometidos. Se adquiere por vía oral, sexual y parenteral. Son excretados por secreciones orofaríngeas, saliva, orina, esperma, leche materna, sangre, secreciones vaginales. Se puede adquirir por el contacto materno, si la infección es congénita puede producir secuelas, es persistente reactivándose espontáneamente.

✚ Hepatitis

Comprende el virus hepatitis A (infecciosa), B (sérica), C (sexual), D (delta, parental, sexual) E (entérica).

✚ Rabia

El diagnóstico patológico definitivo lo constituye el hallazgo de los corpúsculos de Negri en el examen microscópico del cerebro o en la medula espinal del animal mordedor.

✚ Herpes

Comprende dos tipos: tipo 1 (oral) y el tipo 2 (genital, neonatal). Ingresa por la piel y mucosas donde se replica y se localizan posteriormente en las neuronas del ganglio sensitivo como el trigémino y de la región sacra, constituyéndose en infección latente, que cuando son estimulados por el estrés, radiaciones solares, fiebre, inmunosupresión, traumatismos, etc., pueden reactivarse.

✚ VIH / SIDA

Es un retrovirus por la presencia de la enzima transcriptasa inversa, que le permite

integrarse al genoma como provirus, infecta diversas células con receptores CD4: monocitos, macrófagos, en especial los linfocitos T4, produciéndose efecto citopático, formación de sincicios (células gigantes multinucleadas) y muerte por apoptosis (programada).

IV. Equipos / Materiales

Tabla 42

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1			

Tabla 43

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1			
2			
3			

V. Indicaciones

VI. Procedimientos

VII. Resultados

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

- 10.1.** ¿Cuáles son los virus más comúnmente asociados con infecciones orales en pacientes dentales?
- 10.2.** ¿Cómo se manifiestan las infecciones virales en la cavidad oral y qué síntomas pueden presentarse?
- 10.3.** ¿Cuáles son las manifestaciones orales más comunes asociadas con el virus del herpes simple?
- 10.4.** ¿Cuál es el riesgo de transmisión del virus de la hepatitis B y C en la práctica odontológica?
- 10.5.** ¿Cuáles son las manifestaciones orales asociadas con las infecciones por citomegalovirus?
- 10.6.** ¿Cómo se relaciona el VIH con la gingivitis necrotizante aguda y cuáles son los signos clínicos característicos?

Semana 15: Sesión 2

Antibiograma

Sección: Fecha:/...../..... Duración: 60 minutos

Docente: Unidad: 4

Apellidos y nombres:

I. Instrucciones

Cada equipo de prácticas tiene la responsabilidad de utilizar de manera adecuada los equipos, materiales y reactivos proporcionados. Antes de utilizarlos, los estudiantes de cada grupo deben asegurarse de que estén en buen estado y notificar de inmediato cualquier daño que observen

II. Propósito

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Comprenderá la importancia del antibiograma en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.
- Observará los efectos de los diferentes antibióticos sobre bacterias G+ y G-

III. Fundamentos teóricos

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.

El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Su resultado, la farmacología del antimicrobiano, en particular en el lugar de la infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, sustentan la elección de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Asimismo, ofrece, en su conjunto, elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos.

El panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que

la sensibilidad se considera universal y no se han descrito, por el momento, mecanismos de resistencia. Los ensayos de sensibilidad han de estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad. En el presente procedimiento se recogen los métodos básicos más utilizados y aceptados para el estudio de la sensibilidad, así como los criterios para su interpretación y control.

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la 5.ª zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición.

Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada

antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS.

Indicaciones y limitaciones:

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. Estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico de que se dispone. El método de disco-placa es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.* Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a *Haemophilus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus spp.*

IV. Equipos, Materiales y Reactivos

Tabla 44

Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		2 por grupo
2	Agitador "vortex"		01
3	Estereoscopio		01
4	Baño María		01
5	Estufa de incubación		01
6	Jarra de anaerobiosis		01

Tabla 45

Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		1 por grupo
2	Asas bacteriológicas		1 por grupo
3	Espátula de Drigalski		1 por grupo
4	Marcador de vidrio		1 por grupo
5	Portaobjetos y cubreobjetos		1 por grupo
6	Gradillas		1 por grupo
7	Puente para tinción		1 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		1 por grupo
9	Papel de trigo		1 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		1 por grupo

11	Placas Petri con medio Mueller Hinton	3 por grupo
12	Tubos de ensayo 13 x 100 con tapa rosca estériles	1 por grupo

Tabla 46

Reactivos

Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		1 por grupo
2	Discos de sensibilidad para G (+) y G (-)		Todos
3	Escala Mac Farland – escala de turbidez		1

V. Indicaciones

Dibujar cada uno de los materiales y equipos de uso en el laboratorio para realizar el antibiograma.

VI. Procedimientos

Para la determinación del antibiograma disco-placa en estafilococos, enterococos, enterobacterias y bacilos gram negativos no fermentadores:

6.1. Preparación del inóculo

a) Método del medio de cultivo líquido:

Coger de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembrarlas en 5 ml de un medio líquido (BHI, Trypticase soja, etc.) e incubar en la estufa a 35°C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0.5 de la escala de McFarland. Si la turbidez es superior se realiza el ajuste necesario con suero salino estéril. (Preparación de la suspensión McFarland).

b) Método de suspensión directa de colonias:

A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas coger varias colonias con un asa y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de McFarland 0.5 en suero fisiológico. Agitar en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos. Se recomienda utilizar el primer método si el cultivo tiene más de 24 horas de incubación. Este método es el más adecuado para microorganismos de crecimiento difícil en medios líquidos (*Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, estreptococos no enterococos, *Listeria*, *Moraxella* y *Corynebacterium* spp.) y para estafilococos en los que se quiera detectar la resistencia a oxacilina.

6.2. Inoculación de las placas.

- a) Antes que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un escobillón dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

- c) Inocular las placas de Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos.

6.3. Dispensación de los discos.

- a) Colocar los discos con los dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionar ligeramente sobre la superficie del agar. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm no se emplearán más de 12 discos y para las de 100 mm no más de 6.

- b) Incubar las placas invertidas (agar en la parte superior), en grupos no superiores a 5 placas, a 35 °C en atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos. Las placas se incubarán 1618 horas (con estafilococos sensibles a meticilina debe prolongarse la incubación hasta 24 horas para confirmar la ausencia de resistencia a la meticilina).

6.4. Lectura de los resultados.

Después de 18 horas de incubación leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con una regla. Si el microorganismo es un estafilococo o un enterococo debemos esperar 24 horas para asegurar la sensibilidad a la oxacilina y vancomicina. Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar.

En las pruebas de sensibilidad a meticilina en estafilococos el halo alrededor de la oxacilina debe observarse utilizando luz transmitida para visualizar las colonias diminutas. Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Como regla general, no debe considerarse aquellas colonias diminutas

que aparecen en el halo de inhibición y que han sido visualizadas mediante luz transmitida o con ayuda de una lupa, a excepción de estafilococos resistentes a oxacilina o enterococos resistentes a vancomicina. La interpretación de los resultados puede realizarse en función de las normas del NCCLS (ver figuras).

6.5. Antimicrobianos seleccionados

Es evidente la imposibilidad de ensayar un gran número de antimicrobianos frente a un microorganismo determinado. La selección final de qué antibióticos deben ser estudiados dependerá del Laboratorio de Microbiología en sintonía con las decisiones del Comité de Infecciones de cada hospital.

En las tablas se muestran los antimicrobianos recomendados por la NCCLS, agrupados en cuatro grupos según el trabajo de Washington. En el grupo "A" se encuentran aquellos antimicrobianos que se han de ensayar y que deben ser informados de forma rutinaria. El grupo "B" está constituido por antimicrobianos que pueden ser valorados de forma rutinaria, pero cuya información se efectuará de forma selectiva; es decir, solamente se informarán si los del grupo "A" no son activos, no son apropiados para un lugar determinado de la infección, o si se constata un fallo terapéutico con el grupo "A". En el grupo "C" están incluidos los antibióticos que serán estudiados cuando aparezcan problemas específicos de resistencia, por ejemplo, brotes epidémicos, en pacientes con alergia a otros antibióticos o en infecciones inusuales. Finalmente, el grupo "D", se destina a antimicrobianos utilizados en infecciones del tracto urinario.

6.6. Control de calidad

Es necesario emplear cepas control para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología, debido también al gran número de variables que pueden afectar los resultados y que se han descrito anteriormente. Las cepas que se utilizan para el control de calidad son las mencionadas en las Tablas 1-4. El NCCLS ha establecido unos límites en los diámetros de las zonas de inhibición que son aceptables para las cepas utilizadas en el control de calidad. Los problemas que podamos encontrar en la determinación del halo de inhibición de las cepas de control de calidad y su resolución se detallan en la figura 13.

Las cepas de control se mantienen en el congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alguno de los medios descritos para la conservación de cepas, con el fin de preservar su viabilidad y minimizar posibles modificaciones. Para resembrarlas debe utilizarse un escobillón o asa con el que se rascarán la superficie del material congelado (no hace falta descongelar)

y sembrará en una placa de agar sangre. Incubar a 35 °C, de 18 a 20 horas, realizar una nueva resiembra que ya podrá emplearse para el ensayo. Debe realizarse controles cada nuevo lote de medio de cultivo y cada nuevo lote de antibióticos.

La cepa ATCC 29212 sirve para detectar que el Mueller-Hinton contiene los niveles correctos de inhibidores al ensayar el trimetoprim o sulfametoxazol.

Los resultados normalmente quedan registrados en una libreta de Control de Calidad. Control del inóculo: Se utiliza un McFarland 0.5. Para prepararlo se emplea 0.5 ml de 0.048 M de BaCl₂ (1,175 % BaCl₂+2H₂O) en 99,5 ml de 0.18 M H₂SO₄ (1 % v/v) con agitación constante. La absorción a 625 nm ha de estar entre 0.08 y 0.10 (comprobar cada mes). Alícuotas de 4 a 6 ml se distribuyen en tubos con tapón de rosca y se guardan en la oscuridad a temperatura ambiente.

VII. Resultados (fotos y dibujos)

VIII. Conclusiones

IX. Sugerencias / recomendaciones

X. Cuestionario previo a la práctica

- 10.1.** Explique en qué consiste un antibiograma
- 10.2.** Describa la técnica de difusión.
- 10.3.** Describa la técnica de microdilución.
- 10.4.** Describa la técnica de disco-difusión agar.
- 10.5.** Describa la técnica de Épsilon-Test.
- 10.6.** Defina los términos: antimicrobianos, antibióticos y quimioterápicos.
- 10.7.** ¿Cuáles son las sustancias que interfieren en la actividad antimicrobiana?

Figura 7

Patrones estándar del halo de inhibición

Tabla 1. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias ^a y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>E. coli</i> ATCC25922 empleada como control de calidad								
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Ampicilina ^{a,c}	10	<13	14-16	≥17	≥32	≤8	16-22
	Cefalotina ^{c,d}	30	<14	15-17	≥18	≥32	≤8	15-21
	Cefazolina ^{c,d}	30	<14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Gentamicina ^c	10	<12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-26
B	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	≤13	14-17	≥18	≥16/8	≤8/4	19-25
	Ampicilina/sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	20-24
	Piperacilina/tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	24-30
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	25-29
	Mezlocilina	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤64	23-29
	Ticarcilina	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16	24-30
	Piperacilina	100	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	24-30
	Cefamandol	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	26-32
	Cefonicid	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-29
	Cefuroxima (oral)	30	≤14	15-22	≥23	≥32	≤4	20-26
	Cefpodoxima	10	≤17	18-20	≥21	≥8	≤2	23-28
	Cefixima	5	≤15	16-18	≥19	≥4	≤1	23-27
	Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	28-34
	Cefmetazol	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	26-32
	Cefoperazona ^a	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	28-34
	Cefotaxima ^{a,d}	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	29-35
	Ceftizoxima ^a	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	30-36
	Ceftriaxona ^{a,d}	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	29-35
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	29-35
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	26-32
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	28-34
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	19-26
	Ciprofloxacino ^{a,c}	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	30-40
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	29-37
	Trimetoprim/sulfametoxazol ^{a,c}	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32

Fuente: Laboratorio de la UC

Figura 8

Patrones estándar del halo de inhibición (2)

Tabla 1. (continuación). Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias ^a y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>E. coli</i> ATCC25922 empleada como control de calidad								
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
C	Ceftazidima ^a	30	<14	15-17	>18	>32	<8	25-32
	Aztreonam ^a	30	<15	16-21	>22	>32	<8	28-36
	Kanamicina	30	<13	14-17	>18	>25	<6	17-25
	Netilmicina	30	<12	13-14	>15	>32	<12	22-30
	Tobramicina	10	<12	13-14	>15	>8	<4	18-26
	Tetraciclina ^c	30	<14	15-18	>19	>16	<4	18-25
D	Cloranfenicol ^a	30	<12	13-17	>18	>32	<8	21-27
	Carbenicilina	100	<19	20-22	>23	>64	<16	23-29
	Cinoxacino	100	<14	15-18	>19	>64	<16	26-32
	Lomefloxacino	10	<18	19-21	>22	>8	<2	—
	Norfloxacino	10	<12	13-16	>17	>16	<4	28-35
	Ofloxacino	5	<12	13-15	>16	>8	<2	29-33
	Loracarbef ^f	30	<14	15-17	>18	>32	<8	23-29
	Nitrofurantoina	300	<14	15-16	>17	>128	<32	20-25
	Sulfisoxazol	250 o 300	<12	13-16	>17	>350	<100	15-23
	Trimetoprim	5	<10	11-15	>16	>16	<4	21-28
	Fosfomicina	200	<12	13-15	>16	>256	<64	22-30

Elaborado con datos del NCCLS, 2000

a) Para aislamientos de *Salmonella* y *Shigella* spp. debemos ensayar e informar rutinariamente solo ampicilina, una quinolona, y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, el cloranfenicol y cefalosporinas de tercera generación deben ser estudiadas e informadas para *Salmonella* aisladas como causa de infecciones extraintestinales.

b) Además de *E. coli* ATCC25922, estudiar *E. coli* ATCC 35218 cuando se ensayan combinaciones con inhibidores de β-lactamasa. Los intervalos aceptables para *E. coli* ATCC 35218 son los siguientes: amoxicilina/ácido clavulánico de 18 a 22 mm; ampicilina/sulbactam, de 13 a 19 mm; ticarcilina/ácido clavulánico de 21 a 25 mm y piperacilina/tazobactam, de 24 a 30 mm.

c) Puede además ser apropiado para obtener información sobre cepas aisladas del tracto urinario, junto con antimicrobianos del grupo D.

d) Cefalotina representa a cefapirina, cefradine, cefalexina, cefaclor y cefadroxilo. Cefazolina, cefuroxima, cefpodoxima, cefprozil y loracarbef deben ser ensayados individualmente ya que pueden ser activos aunque la cefalotina no lo sea.

e) Cepas de *Klebsiella* spp. y *E. coli* pueden ser resistentes a cefalosporinas y aztreonam mediante producción de β-lactamasas de espectro extendido: a pesar de la aparente sensibilidad "in vitro", algunas cepas pueden ser reconocidas por resultados intermedios o resistentes a ceftazidima y aztreonam (o cefotaxima, cefpodoxima, ceftriaxona y ceftizoxima) y frecuentemente son resistentes a otros antimicrobianos como aminoglicósidos y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas con β-lactamasas de espectro-extendido deben ser informadas como resistentes a las cefalosporinas y al aztreonam.

f) Ciertas cepas de *Citrobacter*, *Providencia* y *Enterobacter* spp. pueden presentar resultados falsamente sensibles con discos de loracarbef, por lo que los aislamientos de estos géneros no deben ser ensayados frente a este antimicrobiano.

Fuente: Laboratorio de la UC

Figura 9

Patrones estándar del halo de inhibición para *Pseudomonas*

Tabla 2. Patrones estándar del halo de inhibición para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter</i> spp. ^a , puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 empleada como control de calidad								
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI(µg/ml)		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Intervalo
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Mezlocilina ^b <i>Pseudomonas</i> spp	75	<17	18-20	≥21	>128	≤16	--
	Mezlocilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	<15	--	≥16	>128	≤64	19-25
	Ticarcilina ^b <i>Pseudomonas</i> spp.	75	<14	--	≥15	>128	≤64	22-28
	Ticarcilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	<14	15-19	≥20	>128	≤16	--
	Piperacilina ^b <i>Pseudomonas</i> spp.	100	<17	--	≥18	>128	≤64	25-33
	Piperacilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	<17	18-20	≥21	>128	≤16	--
	Ceftazidima	30	<14	15-17	≥18	>32	≤8	22-29
	Gentamicina	10	<12	13-14	≥15	>8	≤4	16-21
B	Amp./sulbact. <i>Acinetobacter</i> spp.	10/10	<11	12-14	≥15	>32/16	≤8/4	--
	Ticar./clav. <i>Pseudomonas</i> spp.	75/10	<14	--	≥15	>128/2	≤64/2	20-28
	Ticar./clav. <i>Acinetobacter</i> spp.	75/10	<14	15-19	≥20	>128/2	≤16/2	---
	Piper./tazob. <i>Pseudomonas</i> spp.	100/10	<17	--	≥18	>128/4	≤64/4	25-33
	Piper./tazob. <i>Acinetobacter</i> spp.	100/10	<17	18-20	≥21	>128/4	≤16/4	---
	Cefepima	30	<14	15-17	≥18	>32	≤8	24-30
	Cefoperazona	75	<15	16-20	≥21	>64	≤16	23-29
	Aztreonam	30	<15	16-21	≥22	>32	≤8	23-29
	Imipenem	10	<13	14-15	≥16	>16	≤4	27-33
	Meropenem	10	<13	14-15	≥16	>16	≤4	20-28
	Amikacina	30	<14	15-16	≥17	>32	≤16	18-26
	Tobramicina	10	<12	13-14	≥15	>8	≤4	19-25
	Ciprofloxacino	5	<15	16-20	≥21	>4	≤1	25-33

Fuente: Laboratorio de la UC

Figura 10

Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos

Tabla 3. Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleada como control de calidad.

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>S. aureus</i> ATCC 25923 intervalo ^a
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G ^{b,c}	10 U	<28	--	>29	β-lactamasa ^d	<0.1	26-37
	Oxacilina ^b (<i>S. aureus</i>)	1	<10	11-12	>13	>4	<2	18-24
	(<i>Estafilococcus coagulasa</i> -)	1	<17	--	>18	>0.5	<0.25	--
B	Vancomicina ^d	30	--	--	>15	>32	<4	17-21
	Teicoplanina	30	<11	11-13	>14	>32	<8	15-21
	Eritromicina ^e	15	<13	14-22	>23	>8	<0.5	22-30
	Claritromicina ^e	15	<13	14-17	>18	>8	<2	26-32
	Azitromicina ^e	15	<13	14-17	>18	>8	<2	21-26
	Clindamicina ^e	2	<14	15-20	>21	>4	<0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	<10	11-15	>16	>8/152	<2/38	24-32
C	Gentamicina	10	<12	13-14	>15	>8	<4	19-27
	Ciprofloxacino	5	<15	16-20	>21	>4	<1	22-30
	Ofloxacino	5	<12	13-15	>16	>8	<2	24-28
	Levofloxacino	5	<13	14-16	>17	>8	<2	25-30
	Cloranfenicol ^f	30	<12	13-17	>18	>32	<8	19-26
	Rifampicina ^{e,t}	5	<16	17-19	>20	>4	<1	26-34
	Tetraciclina ^g	30	<14	15-18	>19	>16	<4	24-30
D	Norfloxacino	10	<12	13-16	>17	>16	<4	17-28
	Lomefloxacino	10	<18	19-21	>22	>8	<2	23-29
	Nitrofurantoina	300	<14	15-16	>17	>128	<32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	<12	13-16	>17	>350	<100	24-34
	Trimetoprim	5	<10	11-15	>16	>16	<4	19-26

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

a) Además de *S. aureus* ATCC 25923, ensayar *E. coli* ATCC 35218 con: amoxicilina/clavulánico de 18 a 22 mm.; ampicilina/sulbactam de 13 a 19 mm.

b) Las cepas resistentes de *S. aureus* producen β-lactamasa, y para estas pruebas es preferible el empleo de discos de penicilina G de 10 U. Utilizar penicilina G para estudiar la sensibilidad de todos los estafilococos a todas las penicilinas sensibles a la penicilinas.

c) Estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los β-lactámicos (la sensibilidad a β-lactámicos puede deducir estudiando solo penicilina y oxacilina).

d) Todos los estafilococos con un diámetro del halo de inhibición igual o menor de 14mm deben ser estidados para determinar la CMI de la vancomicina.

e) No para microorganismos aislados del tracto urinario.

f) No utilizar rifampicina sola para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

g) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

Fuente: Laboratorio de la UC

Figura 11

Patrones estándar de inhibición y punto de corte

Tabla 4. Patrones estándar de inhibición y punto de corte equivalente a la CMI para enterococos ^a							
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)	
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible
A	Penicilina ^b	10 U	≤14	--	≥15	≥16	≤8
	Ampicilina ^b	10	<16	--	>17	>16	<8
B	Vancomicina ^c	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤4
	Teicoplanina	30	<10	11-13	>14	>32	<8
C	Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5
	Gentamicina ^d	120	6	7-9 ^e	>10	>500	<500
	Estreptomicina ^d	300	6	7-9 ^e	>10	-	-
D	Ciprofloxacino	5	<15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Norfloxacino	10	<12	13-16	>17	>16	<4
	Nitrofurantoina	300	<14	15-16	>17	>128	<32
	Tetraciclina	30	<14	15-18	>19	>16	<4
	Fosfomicina	200	<12	13-15	>16	>256	<64

Elaborado con datos del NCCLS, 2000 .

a) Puede usarse *S. aureus* ATCC 25923 como control de calidad de los antimicrobianos de la tabla.

b) La sensibilidad a penicilina G puede servir para predecir la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina, acilampicilinas, ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico, a los cuales los enterococos no productores de β-lactamasa son moderadamente sensibles. La terapia combinada con penicilina G o ampicilina más un aminoglicósido habitualmente está indicada para infecciones enterocócicas graves, tales como endocarditis. Para cepas aisladas de sangre y LCR se recomienda además una prueba de β-lactamasa.

c) Frecuentemente se utiliza vancomicina para infecciones enterocócicas graves en alérgicos a penicilina y debe informarse de forma selectiva sólo en tales pacientes. La terapia combinada con vancomicina más un aminoglicósido está habitualmente indicada en infecciones enterocócicas graves, como endocarditis. Cuando se valore vancomicina frente a enterococos, las placas deben mantenerse durante 24 h. y examinarse por luz transmitida; la presencia de una fina película o de algún crecimiento dentro de la zona de inhibición indica resistencia. Si la vancomicina se considera para el tratamiento de enfermedades enterocócicas graves, los microorganismos con zonas intermedias deben estudiarse por un método de CMI.

d) Se utilizan sólo para ensayar un nivel de resistencia a aminoglicósidos elevado.

e) Si el halo de inhibición es de 7 a 9 mm, el resultado de la prueba no es concluyente y se debe utilizar un método de microdilución en caldo o de dilución en agar para confirmar la resistencia.

f) La CMI que se correlaciona para la estreptomicina es: ausencia de sinergia si >1000µg/ml para microdilución y >2000 µg/ml para dilución en agar.

Fuente: Laboratorio de la UC

Figura 12

Problemas que pueden surgir en la determinación de los halos de inhibición

Tabla 5. Problemas que pueden surgir en la determinación de los halos de inhibición de las cepas utilizadas como control de calidad		
Observación	Diagnóstico	Solución
Halos de inhibición demasiado pequeños	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inóculo demasiado denso. 2. Deterioro del antibiótico. 3. Cambio en la cepa control. 4. Agar demasiado profundo. 5. Lectura incorrecta de los resultados 6. Aislamiento resistente 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Comprobar potencia . Utilizar un disco nuevo. 3. Utilizar una cepa nueva. 4. Comprobar profundidad del agar. 5. Repetir con varios observadores.
Halos de inhibición demasiado grandes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inóculo poco denso. 2. Antibiótico demasiado potente. 3. Cambio en la cepa control. 4. Agar demasiado delgado. 5. Lectura incorrecta de los resultados. 6. Aislamiento sensible 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Comprobar potencia. Utilizar un disco nuevo. 3. Utilizar una cepa nueva. 4. Comprobar la profundidad del agar. 5. Repetir con varios observadores.
Resultados para <i>Pseudomonas</i> y aminoglicósidos fuera de control	<ol style="list-style-type: none"> 1. Contenido catiónico incorrecto. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizar nuevo medio suplementado con cationes.
Resultados anómalos para <i>Pseudomonas</i> spp. y carbenicilina	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mutación en la cepa control. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizar cepa control nueva.
Aminoglicósidos y macrólidos demasiado resistentes, tetraciclina demasiado sensible.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Medio demasiado ácido. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comprobar pH del medio.
Aminoglicósidos y macrólidos demasiado sensibles, tetraciclina demasiado resistente.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Medio demasiado alcalino. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comprobar pH del medio.
Halo de inhibición del trimetoprim demasiado pequeña.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Exceso de timidina en el medio. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Probar el medio con <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186.

Fuente: Laboratorio de la UC

Referencias

- Acosta, S., y Andrade, V.(2008). *Manual de esterilización para centros de salud*. Organización Panamericana de la Salud. https://www1.paho.org/PAHO-USAID/dmdocuments/AMR-Manual_Esterilizacion_Centros_Salud_2008.pdf
- Castañeda Guillot, C., Pacheco Consuegra, Y., y Cuesta Guerra, R. E. (2021). Implicaciones de la microbiota oral en la salud del sistema digestivo. *Dilemas contemporáneos: educación, política y valores*, 8(SPE3).
- Hernández-Ruiz, P., González-Pacheco, H., Amezcua-Guerra, L. M., & Aguirre-García, M. M. (2022). Relación entre la disbiosis de la microbiota oral y la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. *Archivos de cardiología de México*, 92(3), 371-376.
- Kazumichi, A., Atsushi, T., Masashi, F., Hiromichi, I., Manabu, H., Ken, O., Hiromasa, O. (2018). Dysbiosis of oral microbiota and its association with salivary immunological biomarkers in autoimmune liver disease. *Rev. PLOS ONE*. <https://pwebbsco.continental.elogim.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=24&sid=eae1a005-ace9-423b-93ca-56e887286007%40redis>
- Liébana, J. (2002). *Microbiología oral (2º ed.)*. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2021). *Microbiología médica*. (9.ª ed.). Elsevier Saunders. blob: <https://web.tel.onl/6005c905-f905-43ef-a240-a3e3cf5c82a1>
- Negrón, M. (2018). *Microbiología estomatológica*. (3.ª ed.). Médica Panamericana. <https://bit.ly/41jITgj>
- Organización Mundial de la Salud-OMS (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. (3.ª ed.). Ginebra.
- Valarezo Farias, S. I. (2021). *Relación de patógenos periodontales con enfermedades sistémicas* (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad Piloto de Odontología).

Recursos digitales

- Gómez. (2020). *Historia de la microbiología* [Vídeo]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=7v6WrlsOyPk>
- Microbiología y bacteriología. (2021). *Nutrición Bacteriana* <https://youtu.be/B3LKy6IHVOA?si=LwAX7p2N7GMa8YTB>
- Savunisevilla. (2012). *Técnicas Básicas en el laboratorio de Microbiología. Preparación de Medios de cultivo*. <https://youtu.be/miga09gVMyY>
- Tu laboratorio. (2021). *Reacción antígeno anticuerpo*. <https://youtu.be/2qll0fF1Co8?si=zlrqxpmtUHZXMY>