



Universidad
Continental

Microbiología General y Oral

Guías de

Laboratorio



Visión

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

Misión

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

Universidad Continental

Material publicado con fines de estudio

ASUC00596



Índice

VISIÓN	2
MISIÓN	2
NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO	4
ÍNDICE	54
Guía de práctica N° 1	
Bioseguridad, técnicas de desinfección y esterilización	6
Guía de práctica N° 2	
Descripción, manejo de equipo y material de laboratorio	10
Guía de práctica N° 3	
Tinción y morfología de bacterias y hongos	14
Guía de práctica N° 4	
Medios de cultivo, técnicas de siembra y morfología de bacterias y hongos	19
Guía de práctica N° 5	
Aislamiento de staphylococcus y steptococcus	23
Guía de práctica N° 6	
Exudado faríngeo	26
Guía de práctica N° 7	
Prueba de actividad cariogénica	28
Guía de práctica N° 8	
Estudio de microorganismos del surco gingival	31
Guía de práctica N° 9	
Estudio de candida albicans	34
Guía de práctica N° 10	
Antibiograma	37



NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO

Para desarrollar las prácticas los estudiantes, profesores y personal del laboratorio, deberá conocer y seguir las siguientes normas:

1. Sólo ingresan al laboratorio los estudiantes matriculados en el curso y grupo en el horario preestablecido.
2. Los estudiantes se organizarán por equipos como el profesor a cargo se los indique.
3. Al recibir el material, el estudiante deberá revisar que se encuentre limpio y en buen estado.
4. El estudiante deberá presentarse completamente uniformados con bata larga blanca y limpia, guantes, mascarilla o cubrebocas, gorro o cofia, calzado de puntera cerrada y material requerido en cada una de las prácticas.
5. Antes de realizar cada práctica, los estudiantes deberán leerla y conocer su objetivo, fundamento y técnica. Deberán traer desarrollado el cuestionario de la misma.
6. Es deber de todos los integrantes de equipo, tener conocimiento de la práctica, ya que se les evaluará de manera activa sobre el contenido de la misma.
7. Las inasistencias a las prácticas se calificarán con cero y no se podrán recuperar.
8. Cuando se abandone el laboratorio sin autorización del docente, se considerará como inasistencia.
9. Está prohibido fumar, comer o ingerir líquidos dentro del laboratorio.
10. Cada grupo de prácticas se responsabilizará de la limpieza de su meza de trabajo y del equipo y material solicitado.
11. El orden y la limpieza deben perdurar durante el procedimiento de las prácticas. Antes y después de cada práctica deberán limpiar la mesa de trabajo con desinfectante al inicio y al término de la práctica.
12. Está prohibida la utilización de teléfonos celulares para fines ajenos de la práctica.
13. Si los estudiantes utilizan dispositivos digitales para la toma de fotos o videos durante la realización de la práctica, deberá ser por el estudiante asignado por equipo y sin guantes de trabajo.
14. Los estudiantes deberán colocar sus mochilas y cajas en la estantería destinada para ellas, nunca en la mesa de trabajo.
15. Antes de ponerse los guantes, deberán quitarse todo tipo de anillos y/o joyas de manos y brazos. Los cabellos deben estar totalmente recogidos y cubiertos con cofia o gorra limpia.
16. El material que se rompa, deteriore o extravíe deberá reponerse por los alumnos responsables.
17. Etiquetar sus trabajos con número de equipo, fecha, microorganismo sembrado o teñido y en caso de ser la muestra de un compañero o paciente escribir las iniciales o nombre del donante.
18. Cuando se utilice el microscopio se tendrá especial cuidado en su manejo, el cual será demostrado en la segunda práctica.
19. Todas las muestras y cepas que se utilizarán en el desarrollo de las prácticas son potencialmente patógenas, por lo cual deberán manejarse estrictamente con guantes, cubrebocas, cofia y el procedimiento que indique el docente.
20. La tolerancia máxima para la entrada al laboratorio es de 10 minutos.
21. Para la calificación de las prácticas de laboratorio, se tomarán en cuenta los siguientes elementos:
 - Reporte o informe de la práctica.
 - Resolución de los cuestionarios de la práctica.
 - Evaluación de la práctica.
 - Examen escrito y práctico parcial y final del laboratorio.

ACUSE DE ENTERADO DE LAS NORMAS DE LA GUIA DE LABORATORIO

He leído minuciosamente las normas del presente manual, aceptando los términos establecidos, de no cumplirlos aceptaré responsablemente mi expulsión del laboratorio.

Nombre del estudiante:

Grupo:

Fecha:

Firma del estudiante:



TABLA DE COTEJO PARA EVALUACIÓN

PRÁCTICA	USO DE BARRERAS DE PROTECCIÓN	CORRECTO USO DE MATERIAL Y EQUIPO	TRABAJO DE LABORATORIO (cultivo, tinción, microscopía)	RESULTADOS Y OBSERVACIONES	CUESTIONARIO Y/O EVALUACIÓN	PROMEDIO TOTAL
Bioseguridad y Técnicas de esterilización y Desinfección						
Descripción y manejo de equipo y material de laboratorio						
Tinción y morfología de bacterias y hongos						
Medios de cultivo, técnicas de siembra y morfología de bacterias y hongos						
Aislamiento de Staphylococcus y Streptococcus	5					
Exudado faríngeo	6					
Prueba de actividad cariogénica	7					
Estudio de MO del surco gingival	8					
Estudio de <i>Candida albicans</i>	9					
Antibiograma	10					
	11					



Guía de práctica N° 1

Bioseguridad, técnicas de desinfección y esterilización

Sección : Docente:

Fecha :/...../.....

Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones:

Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía. Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivos:

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Conocerá los conceptos básicos sobre bioseguridad, que le permita reconocer los riesgos y métodos de prevención para los mismos en la práctica del laboratorio.
- Iniciará actividades prácticas de refuerzo a la parte teórica del programa de microbiología.
- Conocerá las normas de bioseguridad que rigen a los laboratorios de microbiología, y de esa manera poder aplicarlas.
- Describirá y tomará en cuenta los diversos procedimientos de desinfección y esterilización utilizados en un laboratorio de microbiología clínica

2. Fundamento Teórico

BIOSEGURIDAD

Es un conjunto de medidas preventivas destinadas a mantener la vigilancia para proteger la salud y la seguridad de las personas frente a riesgo laborales.

También es decisión, responsabilidad, cuidado y dirección del mismo así como la participación consciente de todos los estudiantes y profesores involucrados en cada práctica o actividad dentro del laboratorio.

A. AGENTES DE RIESGO

El conocimiento de la procedencia y características de los potenciales agentes causales de accidentes es un factor de gran valoración en las medidas y actuaciones para la bioseguridad en el Laboratorio de Biología. Estos son:

a) AGENTES BIOLÓGICOS

Los agentes microbianos penetran al organismo por:

1. Ingestión de alimentos o aguas contaminadas con:
 - 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. Por inhalación:
 - *Mycobacterium tuberculosis*, virus influenza, virus del sarampión, etc.
3. Por la inoculación directa de sangre o líquidos corporales:
 - Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
 - Hepatitis, etc.



4. Por contacto directo o indirecto con el paciente (piel, lesiones conjuntivales):
 - Conjuntivitis
 - Micosis cutánea
 - Escabiosis, etc.

b) AGENTES FÍSICOS Y MECÁNICOS

Entre los agentes físicos como son las temperaturas extremas, contactos eléctricos o conexiones defectuosas que pueden ocasionar quemaduras, lesiones ocasionadas en la piel por el calor seco (fuego) y húmedo (por agua hervida o vapor de agua).

Los agentes mecánicos pueden producir heridas, por ejemplo los vidrios resquebrajados o recipientes dañados.

c) AGENTES QUÍMICOS

Por sus propiedades diversas constituyen riesgos con características particulares, desde los que indican fases iniciales de enfermedad clínica hasta los que indican importantes alteraciones metabólicas y bioquímicas; la exposición a diferentes dosis puede producir efectos agudos o crónicos de acuerdo a la distribución y la frecuencia de exposición, éstos son:

1. Corrosivos: Causan destrucción o alteración a los tejidos, los más utilizados son: ácido acético, fenol e hidróxidos de sodio, potasio o bario.
2. Tóxicos: La elección y efectos se manifiestan según la vía de exposición: por inhalación, los gases tóxicos. Por ingestión, los medicamentos como barbitúricos, atropina y drogas sedantes.
3. Por productos caseros y alimentos contaminados: ej. gasolina, kerosene, lejía e intoxicación alimentaria, respectivamente.
4. Por contacto directo con la piel o mucosas: acetona, ácido clorhídrico, éter, alcohol etílico,
5. Carcinogénicos: Bencina, beta propiolactano, etc.
6. Inflamables - explosivos: Como acetona, dietil-éter metanol y tolueno.

B.. NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Es importante que los docentes y estudiantes adopten normas de bioseguridad por encontrarse expuestos a riesgos de contagio si no se guardan las mismas.

- El laboratorio debe estar ordenado y limpio; sin otro material que no sea pertinente a los trabajos.
- Las mesas de trabajo deben ser descontaminadas por lo menos una vez al día e inmediatamente después de haberse derramado sobre ellas, material contaminado.
- Los estudiantes y profesores deben lavarse las manos antes y después de manipular material biológico y también al salir del laboratorio.
- Se deben descontaminar todos los desechos líquidos o sólidos contaminados, antes de su eliminación o de darles otro destino.
- Los estudiantes y docentes deben llevar mandiles durante su permanencia en el laboratorio.
- No se debe pipetear material infeccioso con la boca.
- Mientras se llevan a cabo los trabajos las puertas del laboratorio deben permanecer cerradas.
- Cualquier derrame peligroso, accidente o exposición manifiesta o potencial a materiales infecciosos, se debe notificar de inmediato al profesor.
- No permitir la entrada al laboratorio de las personas expuestas al riesgo de adquirir una infección, entre ellos los niños o individuos afectados por inmunodeficiencia o inmunosupresión.
- No se permitirá comer, beber, fumar, almacenar alimentos, ni aplicarse productos de tocador en el sector de los trabajos de laboratorio.

C. ESTRATEGIAS DE PROTECCIÓN EN TRABAJADORES DE SALUD:

1. Profilaxis Pre-Exposición

- Vacunas: hepatitis, rubéola, TBC, sarampión, parotiditis, etc

2. Profilaxis Post Exposición

- Vacunas



TÉCNICAS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN

Los microorganismos en la naturaleza requieren de diversas condiciones ambientales para su subsistencia. Para evitar su sobrevivencia y eliminación necesitamos identificar los factores físicos y químicos que les será desfavorables, los que utilizaremos **como técnicas de desinfección y esterilización**.

DESINFECCIÓN:

Procedimiento que tiene por objeto, destruir a todos los microorganismos, especialmente a los patógenos que existan en algún tejido de los humanos, animales, ambiente, superficies o cualquier objeto o instrumento usado en microbiología o en procedimientos médicos. Los desinfectantes son sustancias químicas capaces de destruir en pocos minutos los gérmenes que se encuentran sobre material inerte o vivo, alterando lo menos posible el sustrato donde residen.

Generalmente los desinfectantes son potentes microbicidas, tóxicos e irritantes para los tejidos vivos, razón por la cual sólo es aplicable a superficies.

ESTERILIZACIÓN:

Procedimientos basado en métodos físicos, por la cual se destruye toda forma de vida macro o microscópica, patógena o saprofita. Sólo se aplica a objetos inanimados.

Existen equipos como autoclave, horno Pasteur entre otros, y también existen sustancias químicas enérgicas como el formol, óxido de etileno, usados adecuadamente.

Los factores que influyen en la velocidad de esterilización son: concentración del de la sustancia, temperatura, pH, la especie microbiana, etc. Los microorganismos mueren en proporción geométrica en relación al tiempo de exposición.

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN:

a) Agentes Físicos:

Temperatura, humedad, radiaciones, agentes mecánicos.

Existen bacteria psicrófilas (0-20°C), mesófilas (20-45°C) y termófilas (por encima de 45°C)

o Esterilización por medio del calor:

Calor Húmedo: ebullición, pasteurización (30 min. A 63°C, 15 seg. A 72-75°C), tyndalización (3 días sucesivos a 56 y 100°C -65°C- durante media hora), vapor fluente (100°C por 30 a 60 min.), vapor a presión (autoclave).

Calor Seco: flameado, incineración, por aire caliente (1 hora a 160°C, 40 min a 170°C, 20 min. A 180°C.

o Esterilización por filtración:

Filtros con porosidades de 0,005 a 1 mm.

o Esterilización por humedad y desecación: en medios hipertónicos (plasmólisis)

o Esterilización por radiaciones: rayos infrarrojos, ultravioletas, radiaciones ionizantes (cobalto 60).

b) Agentes químicos:

o Bactericidas, fungicidas o viricidas.

o Bacteriostáticos, fungistáticos o virustáticos.



3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1			
2			

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1			
2			

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			
2			

4. Indicaciones:

Cada estudiante identificará, describirá y expondrá el uso adecuado de los materiales, reactivos y/o equipos del laboratorio que se le asigne, tomando en cuenta estrictamente las medidas de bioseguridad.

5. Procedimientos:

5.1 Identifique y describa cada uno de los equipos, materiales y reactivos con que se cuenta en el laboratorio.

5.2 Describa el uso correcto de los equipos, materiales y reactivos usados en ésta práctica tomando en cuenta cada una de las medidas de bioseguridad apropiada.

6. Resultados

7. Conclusiones

8. Sugerencias y /o recomendaciones

9. Cuestionario previo a la práctica:

- 9.1 Elabore una relación de los principales agentes físicos utilizados en microbiología
- 9.2 Enumere las características y propiedades de los agentes químicos más usados que actúan sobre las bacterias.
- 9.3 Detalle los mecanismos de acción de cada uno de los agentes físicos y químicos, sobre las células procariontas y eucariotas.
- 9.4 Elabore un cuadro comparativo de los diferentes niveles de bioseguridad de los laboratorios de microbiología.
- 9.5 ¿Cuál es el nivel de bioseguridad al que pertenece nuestro laboratorio?
- 9.6 Mencione 5 reglas básicas de higiene y seguridad en el laboratorio
- 9.7 Mencione 5 elementos de protección personal
- 9.8 Mencione 3 de los procedimientos ante emergencias

10. Referencias bibliográficas bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados:

- Organización Mundial de la Salud-OMS (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (3ª ed.). Ginebra.



Guía de práctica N° 2

Descripción, manejo de equipo y material de laboratorio

Sección : Docente:
Fecha :/...../..... Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivos:

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.

2. Fundamento Teórico

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 mencionará 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
- Porta objetos 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: adecuado traslado, 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 ultra estructura celular. A continuación se mencionan las partes del microscopio que cada estudiante deberá identificar y describir cada uno de ellos:

Partes del sistema óptico:

- i. Ocular
- ii. Tubo del ocular
- iii. Revolver o disco giratorio
- iv. Objetivo
- v. Condensador
- vi. Diafragma
- vii. Foco

Partes del sistema mecánico:

- i. Soporte
- ii. Platina
- iii. Carro
- iv. Cabezal
- v. 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 la 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 uso aceite de inmersión.
- Bajar la intensidad de la luz de la lámpara.
- Apagar el microscopio.
- Desenchufar y enrollar y enrollar el cable para no pisarlo al transportarlo, colocar una mano en la base y la otra en el brazo para su devolución.



3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
2	Autoclave		01
3	Estereoscopio		01
4	Baño María		01
5	Estufa de incubación		01
6	Jarra de anaerobiosis		01
7	Refrigerador		01
8	Centrífuga		01
9	Balanza gramera		01
10	Horno eléctrico		01
11	Contador de colonias		01
12	Micropipetas		01
13	Estereoscopio		01

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		01 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Pinzas		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Tubos de ensayo		01 por grupo
10	Cajas petri		01 por grupo
11	Puente para tinción		01 por grupo
12	Mechero de alcohol		01 por grupo
13	Pipeta Pasteur		01 por grupo
14	Punta para micropipeta		01 por grupo
15	Papel de trigo/graft		01 por grupo
16	Gotero		01 por grupo
17	Aceite de inmersión		01 por grupo
18	Papel lente		01 por grupo
19	Éter (Solución para limpieza de las lentes del microscopio)		01 por grupo
20	Xilol (Solución para limpieza de las lentes del microscopio)		01 por grupo

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Batería de tinción Ácido Alcohol resistente		01 por grupo
3	KOH 10%		01 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		01 por grupo
5	Azul de metileno		01 por grupo
6	Medio de cultivo en polvo		01 por grupo
7	Azul de algodón		01 por grupo
8	Azul de lactofenol		01 por grupo

4. Indicaciones:

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 y/o equipos en el cual tenga duda de su uso.



5. Procedimientos:

- 5.1 Identifique cada uno de los materiales, reactivos y equipos a usar en el laboratorio de microbiología.
- 5.2 Describa el uso adecuado de cada uno de los materiales, reactivos y equipos a usar en el laboratorio.
- 5.3 Grafique cada uno de los materiales y equipos indicando detalladamente sus partes.
- 5.4 Con un gotero ubique una gota de agua estancada en un porta objetos, una gota de chicha de jora en otra lámina porta objetos, cubra con un cubre objetos y siga paso a paso el manejo del microscopio para lograr observar adecuadamente el preparado.
- 5.5 Se les entregaran una lámina fijada y coloreadas para observarlos 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.

6. Resultados y observaciones:

Las observaciones y resultados de esta práctica se califican después de observar cómo trabajan los estudiantes en equipo durante el desarrollo del resto de sus prácticas.

7. Conclusiones

8. Sugerencias y/o recomendaciones

9. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 ¿Qué utilidad tiene la incubadora?
- 9.2 ¿Qué utilidad tiene la jarra anaeróbica?
- 9.3 Explique el funcionamiento del autoclave.
- 9.4 ¿Para qué se utiliza el sistema de refrigeración en microbiología?
- 9.5 ¿De cuántos sistemas se compone el microscopio?
- 9.6 ¿Qué es poder de resolución?
- 9.7 ¿Cuáles son los objetivos más utilizados en la práctica microbiológica?
- 9.8 ¿Por qué se llama objetivo de inmersión y en que difiere el objetivo de inmersión de los otros objetivos?

10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- <http://www.olympusmicro.com/primer/java/microassembly/index.html>
- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Murray, P. (2009). *Microbiología médica* (6ª ed.). España: Edit. Elsevier.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- <http://es.slideshare.net/AndresNeiraQuezada7/jawetz-microbiologia-medica-ed-25>
- <http://booksmedicos.org/>
- American Society for Microbiology.- <http://www.asm.org/>



Guía de práctica N° 3

Tinción y morfología de bacterias y hongos

Sección : Docente:

Fecha :/...../.....

Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones:

Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivo:

El estudiante conocerá las diferentes técnicas de tinción para diferenciar las características microscópicas de bacterias y hongos.

Realizará la tinción más utilizada para la observación de bacterias y hongos.

2. Fundamento Teórico

Los microorganismos vivos o activos son por lo general incoloros (excepto algas y cianobacterias), por lo que no se observarán con facilidad en un microscopio óptico de campo claro por la falta de contraste entre las células y el medio circundante, por lo que es necesario fijarlos y teñirlos en un frotis.

Un frotis se prepara distribuyendo una pequeña suspensión de los microorganismos sobre una superficie transparente que, posteriormente, se fija a la superficie con calor o solventes orgánicos; lo que causará la inactivación o muerte celular y algunas modificaciones de sus características.

Existen diferentes tipos de tinciones: simple, diferencial y selectiva, de acuerdo con el número y tipo de colorantes utilizados y de los objetivos de estudio. La tinción que hace uso de un solo colorante es la simple.

Las tinciones diferenciales permiten diferenciar microorganismos con características superficiales distintas, por lo que requieren más de un colorante. La más utilizada en bacteriología es la propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884, que clasifica los cultivos bacterianos de menos de 24 horas en Gram positivas y Gram negativas. Las tinciones selectivas permiten observar estructuras especializadas que son útiles para la clasificación taxonómica de bacterias. Por ejemplo, la tinción de endosporas permite identificar bacterias de tipo Bacillus y Clostridium.

La tinción de azul de lactofenol se emplea para observar hongos. Es una tinción simple, y como tal está basada en la afinidad del colorante por componentes de la célula., en este caso por las estructuras fúngicas. El azul de lactofenol tiene tres características que lo hacen especial para observar dichas estructura en los hongos del tipo moho obtenidos en los cultivos por aislamiento. El fenol destruye la flora acompañante. El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al crear una película que las protege, provocado por un cambio de gradiente osmótico entre el interior y el exterior de dicha estructura. El azul de algodón, tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos.



3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
2	Estereoscopio		01
3			

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		05 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Puente para tinción		01 por grupo
8	Cinta adhesiva en dispensador		01 por grupo
9	Papel lente		01 por grupo
10	Pinza metálica		01 por grupo

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Batería de tinción Ziehl Neelsen		01 por grupo
3	KOH 10%		01 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		01 por grupo
5	Azul de metileno		01 por grupo
6	Azul de lactofenol		01 por grupo
7	Azul de algodón		01 por grupo
8	Éter y xilol		01
9	Hipoclorito de sodio al 13% en frasco con boca ancha con tapa rosca.		01
10	Alcohol isopropílico o etílico 70% en frasco con boca ancha con tapa		01
11	Aceite de inmersión		01 por grupo

4. Indicaciones:

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.

5. Procedimientos:

1. ETAPAS A SEGUIR:

1.1 Extensión o frotis:

- o La lámina debe estar transparente, desengrasada y limpia.
- o 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.
- o 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 Recoloración:

- 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:

- Cultivo de 24 horas, en caldo.
- Batería 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.

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 éste 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 mero.
- 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:

- Espudo positivo de enfermos tuberculosos.
- Batería de coloración: fucsina fenicada, azul de metileno al 0.3%, alcohol-ácido nítrico al 33% o ácido clorhídrico al 3%.
- Batería 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 espufo 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.
- Re-colorear 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%)

3.2 PROCEDIMIENTO:

- Sobre porta objeto limpio y seco depositaremos 2 gotas de azul de lactofenol.
- Cortar un trozo de cinta adhesiva transparente y la pegar 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 porta objetos 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 porta objeto ubique una gota de chicha de jora, agregue una gota de azul de metileno y observe al microscopio.

6. Resultados

7. Conclusiones

8. Sugerencias y /o recomendaciones

9. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 Describa ¿Cuáles son las técnicas para preparar un frotis?
- 9.2 Describa la técnica de Gram y su fundamento
- 9.3 Describa la técnica que debe utilizarse cuando las bacterias son ácido-alcohol resistentes.
- 9.4 ¿Qué es una bacteria ácido alcohol resistente? Mencione dos nombres de bacterias y que enfermedades ocasionan.
- 9.5 ¿Cuáles son las tinciones que se utilizan para observar hongos?
- 9.6 ¿Cuál es la técnica de tinción para observar *Candida albicans*?

10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). Manual de microbiología bucal. Lima, Perú: Editorial UIGV.
<http://es.slideshare.net/AndresNeiraQuezada7/jawetz-microbiologia-medica-ed-25>
- <http://booksmedicos.org/>
- American Society for Microbiology.- <http://www.asm.org/>



Guía de práctica N° 4

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

Sección : Docente:
Fecha :/...../..... Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivos:

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.

2. Fundamento Teórico

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. Éstas son autosuficientes, ya que se proveen ellas mismas de los nutrientes que necesitan para crecer; un ejemplo de éstas, son las bacterias fotosintéticas.

2.1 MEDIOS DE CULTIVO

Todo material en el que los microorganismos encuentran nutrientes y en el que pueden 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
- Hidratos de carbono
- Extracto de carne
- 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)



- 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 co-factores. 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

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

2.2 TÉCNICAS DE SIEMBRA

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

2.2 TÉCNICAS DE CULTIVO

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

2.3 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
- Lisas
- Mucosas
- Filamentosas
- Planoconvexas
- Umbilicadas
- Redondeadas
- Onduladas
- Lobuladas
- Rizoides
- Convexas
- Papilladas, etc.

3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
3	Estereoscopio		01
4	Baño María		01
6	Jarra de anaerobiosis		01
10	Horno eléctrico		01
11	Contador de colonias		01
12	Micropipetas		01
13	Estereoscopio		01

**3.2. Materiales**

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asa bacteriológica		01 por grupo
	Asa recta de siembra		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		05 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Puente para tinción		01 en c/labat
10	Papel de trigo/graff		01 por grupo
11	Encendedor o caja con palillos de fósforo		01

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Batería de tinción Ácido Alcohol resistente		01 por grupo
3	KOH 10%		01 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		01 por grupo
5	Azul de metileno		01 por grupo
6	Placas Petri con agar Sangre		01 por grupo
7	Placas Petri con agar Sabouraud		01 por grupo
8	Placas Petri con agar Tripticas de soya		01 por grupo
9	Placas Petri con agar Manitol salado		01 por grupo
10	Placas Petri con agar MacConkey		01 por grupo
11	Placas Petri con agar EMB		01 por grupo
12	Placas Petri con agar TCBS		01 por grupo
13	Placas Petri con agar SS/XLD		01 por grupo
14	Placas Petri con agar Chocolate		01 por grupo
15	Tubos con caldo Selenito/Tetratonato		01 por grupo
16	Tubos con caldo BHI		01 por grupo
17	Tubos con medio SIM		01 por grupo
18	Tubos con medio de transporte Cary Blair		01 por grupo
19	Agua Peptonada		01 por grupo

4. INDICACIONES:

- 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,

5. 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 alboratorio.

6. RESULTADOS Y OBSERVACIONES:**7. CONCLUSIONES**



8. SUGERENCIAS Y /O RECOMENDACIONES

9. 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.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS Y/O ENLACES RECOMENDADOS

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). *Manual de microbiología bucal*. Lima, Perú: Editorial UIGV.
- American Society for Microbiology.- <http://www.asm.org/>



Guía de práctica N° 5

Aislamiento de staphylococcus y streptococcus

Sección : Docente:

Fecha :/...../.....

Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. OBJETIVOS:

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

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

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Los *Staphylococcus sp*:

Son cocos G⁺ que se encuentran aislados en parejas, tétradas, cadenas cortas, o en forma de racimo de uvas. Son inmóviles, no esporulados 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 tripticosa soya, con 5% de sangre de carnero o agar chocolate.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
3	Estereoscopio		01
4	Jarra de anaerobiosis		01

**3.2. Materiales**

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		01 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Puente para tinción		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Papel de trigo		01 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		02 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		01 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		01 por grupo
13	Tubos con caldo BHI		02 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado		01 por grupo
15	Placas Petri con agar Staphylococcus 110		02 por grupo
16	Placas Petri con agar chocolate		

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Azul de metileno		01 por grupo
3	H ₂ O ₂		01 por grupo
4	Plasma sanguíneo o material para obtenerlo		01 por grupo
5	Novobiocina		01 por grupo

4. Indicaciones:

Tome todas las precauciones de bioseguridad por trabajar

5. Procedimientos:

- 5.1 A partir de los cultivos puros, realizar un frotis y teñido con la técnica de Gram y observar al microscopio.
- 5.2 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.
- 5.3 Sembrar las mismas cepas en agar manitol salado, caldo BHI, agar chocolate. Incubar a 37°C durante 24 horas y observar los cambios.
- 5.4 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.
- 5.5 A partir del cultivo de estreptococos beta, alfa, y gamma hemolíticos, hacer un frotis y teñirlos con la técnica de Gram. Observar al microscopio.
- 5.6 Sembrar los cultivos de estreptococos en agar sangre. Incubar a 37°C +/- 2°C y observar la hemólisis producida.

6. Resultados y observaciones:**7. Conclusiones****8. Sugerencias y /o recomendaciones****9. Cuestionario previo a la práctica**

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



10. Referencias bibliográficas

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). *Manual de microbiología bucal*. Lima, Perú: Editorial UIGV.
- Murray, P. (2009). *Microbiología médica* (6ª ed.). España: Editorial Elsevier.



Guía de práctica N° 6

Exudado faríngeo

Sección : Docente:

Fecha :/...../.....

Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. OBJETIVO:

- 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.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

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.

La selección de los procedimientos de aislamiento identificación de microorganismos, se lleva a cabo de acuerdo con las necesidades y la orientación proporcionada por el clínico, de manera que permita un examen amplio de la flora faríngea. El exudado faríngeo se hace para aislar e identificar MO causantes de una infección en la garganta con implicaciones en cavidad bucal.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
2	Estereoscopio		01
3	Jarra de anaerobiosis		01

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		01 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Puente para tinción		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Papel de trigo		01 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		01 por grupo



11	Placas Petri con agar Sabouraud		01 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		01 por grupo
13	Tubos con caldo BHI		01 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado		01 por grupo
15	Placas Petri con agar Staphylococcus 110		01 por grupo
16	Placas Petri con agar chocolate		
17	Tubos con caldo BHI		
18	Tubos con medio de trasporte Cary Blair		

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Batería de tinción Ácido Alcohol resistente		01 por grupo
3	KOH 10%		01 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		01 por grupo
5	Azul de metileno/lactofenol/algodón		01 por grupo

4. Indicaciones:

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

5. Procedimientos:

- 5.1 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.
- 5.2 Con un hisopo estéril, se realizará un raspado enérgico de la región faríngea evitando contaminar la muestra con la saliva.
- 5.3 Una vez tomada la muestra con el hisopo, se depositará ésta en un extremo de los medios de cultivo y se realizará con el mismo la citología exfoliativa, extendiendo la muestra sobre el portaobjeto.
- 5.4 El extendido se teñirá con la técnica de Gram y se observará al microscopio.
- 5.5 Con el asa bacteriológica estéril se realizará el extendido, sobre los medios de cultivo, para el aislamiento apropiado de las bacterias.
- 5.6 Los medios de cultivo se incuban a 35°C con una tolerancia de +/- 2°C, durante 24 a 72 horas.
- 5.7 Al término, se estudiará las características morfológicas de las colonias y la reacción bioquímica respectiva.

6. Resultados y observaciones:

7. Conclusiones

8. Sugerencias y/o recomendaciones

9. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 ¿Qué se observa en la citología exfoliativa del exudado faríngeo teñido con Gram?
- 9.2 ¿Cuál es la función y el fundamento de los diversos medios de cultivo utilizados en esta práctica?

10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). *Manual de microbiología bucal*. Lima, Perú: Editorial UIGV.
- Murray, P. (2009). *Microbiología médica* (6ª ed.). España: Editorial Elsevier.
- <http://es.slideshare.net/AndresNeiraQuezada7/jawetz-microbiologia-medica-ed-25>



Guía de práctica N° 7

Prueba de actividad cariogénica

Sección :Docente:

Fecha :/...../.....

Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivos:

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

2. Fundamento Teórico

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.

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.

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, permitiéndole 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.



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*

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
2	Contador de colonias		01
3	Micropipetas		01
4	Jarra de anaerobiosis		01

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		01 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Puente para tinción		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Papel de trigo		01 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		01 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		01 por grupo
12	Placas Petri con agar Trypticase de soya		01 por grupo
13	Placas Petri con agar BHI		01 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado		01 por grupo
16	Placas Petri con agar chocolate		01 por grupo
17	Tubos con caldo BHI		01 por grupo

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
5	Azul de metileno		01 por grupo

4. Indicaciones:

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

5. Procedimientos:

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



6. Resultados y observaciones:

7. Conclusiones

8. Sugerencias y /o recomendaciones

9. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 ¿Qué métodos se emplean para determinar la actividad cariosa?
- 9.2 ¿Cuál es la Teoría de Miller?
- 9.3 ¿Qué características microscópicas tienen los *Lactobacillus* y *Streptococcus mutans* de la boca?
- 9.4 ¿Qué aspecto tienen las colonias de *Lactobacillus* y *Streptococcus mutans*?
- 9.5 ¿Cómo se realiza la cuenta de las colonias de *Lactobacillus* y *Streptococcus mutans*?

10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). *Manual de microbiología bucal*. Lima, Perú: Editorial UIGV.
- Murray, P. (2009). *Microbiología médica* (6ª ed.). España: Editorial Elsevier.
- <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001055.htm>
- American Society For Microbiology.- <http://www.asm.org/>



Guía de práctica N° 8

Estudio de microorganismos del surco gingival

Sección :Docente:

Fecha :/...../.....

Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivos:

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

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

2. Fundamento Teórico

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 estreptococos y actinomicos se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
2	Jarra de anaerobiosis		01

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		01 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Puente para tinción		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Papel de trigo		01 por grupo



10	Placas Petri con agar Sangre		01 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		01 por grupo
12	Placas Petri con agar Trypticase de soya		01 por grupo
13	Placas Petri con agar BHI		01 por grupo
14	Placas Petri con agar Manitol salado		01 por grupo
15	Placas Petri con agar chocolate		01 por grupo
16	Tubos con caldo BHI		

3.3 Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Batería de tinción Ácido Alcohol resistente		01 por grupo
3	KOH 10%		01 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		01 por grupo
5	Azul de metileno/lactofenol/algodón		01 por grupo

4. Indicaciones:

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

5. Procedimientos:

- 5.1 En la mesa de 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, rapando 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 tripticase 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.

6. Resultados y observaciones

7. Conclusiones

8. Sugerencias y / o recomendaciones

9. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 ¿Cuál es la importancia de la microflora bucal?
- 9.2 ¿Qué son las enfermedades periodontales y cómo se clasifican?
- 9.3 ¿Qué es la placa dentobacteriana?
- 9.4 ¿Qué son las biopelículas?
- 9.5 Mencione 5 especies de MO que componen la microflora normal en la placa subgingival y supragingival.
- 9.6 Mencione tres MO relacionados con las enfermedades periodontales.



10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). Manual de microbiología bucal. Lima, Perú: Editorial UIGV.
- American Society For Microbiology.- <http://www.asm.org/>
- <http://es.slideshare.net/AndresNeiraQuezada7/jawetz-microbiologia-medica-ed-25>
- <http://booksmedicos.org/>



Guía de práctica N° 9

Estudio de candida albicans

Sección	:	Docente:
Fecha	:/...../.....	Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivos:

Durante el desarrollo de esta práctica, el estudiante:

- Identificará las características macroscópicas del género *Candida* por medio de su cultivo
- Identificará las características microscópicas del género *Candida* por medio de observación al microscopio y pruebas bioquímicas.

2. Fundamento Teórico

Las infecciones micóticas producidas por las levaduras del género *Candida*, especialmente por *Candida 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 candidosis 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 candidosis 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 *Candida*, 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 candidosis en el paciente inmunosuprimido.

Otro factor determinante de patoagenicidad que influye en la boca para que *Candida 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 *Candida albicans* en mucosa y superficie de las prótesis.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
2	Contador de colonias		01
3	Micropipetas		01
4	Jarra de anaerobiosis		01

**3.2. Materiales**

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		05 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Puente para tinción		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Papel de trigo		01 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		01 por grupo
11	Placas Petri con agar Sabouraud		02 por grupo
12	Placas Petri con agar Tripticasa de soya		01 por grupo
13	Placas Petri con agar BHI		01 por grupo
14	Placa Petri descartable		02 por grupo
15	Algodón		01

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Batería de tinción Ácido Alcohol resistente		01 por grupo
3	KOH 10%		01 por grupo
4	Nigrosina o tinta china		01 por grupo
5	Azul de metileno/lactofenol/algodón		01 por grupo

4. Indicaciones:**5. Procedimientos:**

- 5.1 Raspado bucal:
 - Se realizará en dos estudiantes de cada grupo.
 - Raspar la zona a estudiar con un abatelenguas.
 - El material obtenido pasarlo a un portaobjetos. Colorear
 - Observar al microscopio.
- 5.2 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.
- 5.3 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.
- 5.4 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.



6. Resultados y observaciones:

7. Conclusiones

8. Sugerencias y /o recomendaciones

9. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 ¿Por qué el agar Sabouraud se emplea en el diagnóstico microbiológico de laboratorio?
- 9.2 ¿En qué difieren las paredes celulares de hongos y bacterias?
- 9.3 Explique por qué no se puede usar la técnica de Gram para observar los hongos.
- 9.4 Describa qué es el pleomorfismo y en qué hongos se presenta.
- 9.5 Explique qué es el dimorfismo y qué especie de hongos lo presentan
- 9.6 Mencione las especies de *Candida* que pueden estar implicadas en la candidiasis oral.

10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). *Manual de microbiología bucal*. Lima, Perú: Editorial UIGV.
- American Society For Microbiology.- <http://www.asm.org/>



Guía de práctica N° 10

Antibiograma

Sección :Docente:

Fecha :/...../.....

Duración: 1 hora, 30 minutos

Instrucciones: Antes de iniciar la práctica el estudiante debe tener conocimiento detallado del contenido de la guía.

Cada grupo de prácticas se responsabilizará del uso apropiado de los equipos, materiales y reactivos entregados.

Antes de coger los equipos, materiales y reactivos, los estudiantes del grupo deben de cerciorarse de su adecuado estado, informar inmediatamente al percibir cualquier daño.

1. Objetivos:

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-

2. Fundamento Teórico

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 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.*

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto		02 por grupo
2	Agitador "vortex"		01
3	Estereoscopio		01
4	Baño María		01
5	Estufa de incubación		01
6	Jarra de anaerobiosis		01

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mechero de Bunsen		01 por grupo
2	Asas bacteriológicas		01 por grupo
3	Espátula de Drigalski		01 por grupo
4	Marcador de vidrio		01 por grupo
5	Porta objetos y cubre objetos		01 por grupo
6	Gradillas		01 por grupo
7	Puente para tinción		01 por grupo
8	Pizetas con agua estéril		01 por grupo
9	Papel de trigo		01 por grupo
10	Placas Petri con agar Sangre		01 por grupo
11	Placas Petri con medio Mueller Hinton		03 por grupo
12	Tubos de ensayo 13x100 con tapa rosca estériles		01 por grupo

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Batería de tinción Gram		01 por grupo
2	Discos de sensibilidad para G(+) y G(-)		todos
3	Escala Mac Farland – escala de turbidez		01



4. Indicaciones:

Grafique cada uno de los materiales y equipos de uso en el laboratorio.

5. Procedimientos:

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

5.1 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, Tripticasa 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 MacFarland. Si la turbidez es superior se realiza el ajuste necesario con suero salino estéril. (Preparación de la suspensión MacFarland).

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 MacFarland 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.

5.2 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.

b) 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.

5.3 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 presionarse 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 16-18 horas (con estafilococos sensibles a meticilina debe prolongarse la incubación hasta 24 horas para confirmar la ausencia de resistencia a la meticilina).

5.4 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 Tablas 1-5).

5.5 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 1 a 5 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.

5.6 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 Tabla 5.

Las cepas de control se mantienen en el congelador a -70°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 rasca 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 MuellerHinton contiene los niveles correctos de inhibidores al ensayar el trimetoprim y/o sulfametoxazol.

Los resultados normalmente quedan registrados en una libreta de Control de Calidad. Control del inóculo: Se utiliza un MacFarland 0.5. Para prepararlo se emplea 0.5 ml de 0.048 M de BaCl_2 (1,175% $\text{BaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$) en 99,5 ml de 0.18 M H_2SO_4 (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

6. Resultados y observaciones:

7. Conclusiones

8. Sugerencias y/o recomendaciones



9. Cuestionario previo a la práctica

- 9.1 Explique en qué consiste un antibiograma
- 9.2 Describa la técnica de difusión.
- 9.3 Describa la técnica de microdilución.
- 9.4 Describa la técnica de disco-difusión agar.
- 9.5 Describa la técnica de Epsilon-Test.
- 9.6 Defina los términos: antimicrobianos, antibióticos y quimioterápicos.
- 9.7 ¿Cuáles son las sustancias que interfieren en la actividad antimicrobiana?

10. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Koneman, E.W. y Allen, S.D. (2004). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Fundamentos y guía práctica (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos J., R. (2004). *Manual de microbiología bucal*. Lima, Perú: Editorial UIGV.

11. Anexo:

Tablas antimicrobianos



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 *E. coli* 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



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 *E. coli* 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
	Cloranfenicol ^a	30	<12	13-17	>18	>32	<8	21-27
D	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.



Tabla 2. Patrones estándar del halo de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.^a, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 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



Tabla 2. (continuación). Patrones estándar del halo de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.^a, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 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	
C	Cefotaxima	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	18-22
	Ceftriaxona	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	17-23
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15	≥32	≤12	17-23
	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	--
	Trimetoprim/ sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	--
D	Carbenicilina <i>Pseudomonas</i> spp.	100	≤13	14-16	≥17	≥512	≤128	18-24
	Carbenicilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	≤19	20-22	≥23	≥64	≤16	--
	Ceftizoxima	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	12-17
	Tetraciclina ^c	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	--
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	22-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	19-26
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	22-29
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	17-21
	Sulfisoxazol ^d	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	--

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

a) Otras bacterias no pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* deben ser ensayadas por un método de dilución.

b) Tratar las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes granulocitopénicos y las infecciones graves en otros pacientes con dosis máximas de penicilinas antipseudomonas (ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina), o ceftazidima en combinación con un **aminoglicósido**.

c) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

d) Puede utilizarse sulfisoxazol para cualquiera de las sulfamidas disponibles.



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 ^b	≤0.1	26-37
	Oxacilina ^d (<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 ^e	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina ^{e,f}	5	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina ^{f,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.



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 estreptomina es: ausencia de sinergia sí >1000µg/ml para microdilución y >2000 µg/ml para dilución en agar.



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 resultados6. 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.