



PROGRAMA DE PRÁCTICAS DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

1. IDENTIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE APRENDIZAJE							
ESPACIO ACADÉMICO : Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia							
PROGRAMA EDUCATIVO: Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista					Área de docencia: Salud Pública		
Aprobación por los H.H. Consejos Académico y de Gobierno		Fecha: 17/07/2013			Programa elaborado por: M. en C. Pomposo Fernández Rosas MVZ. Salvador Lagunas Bernabé M. en C. Celene Salgado Miranda Dr. Martín Talavera Rojas M. en C. Luis Fernando Vega Castillo M. en C. Ada Elia Díaz González Borja		
Nombre de la Unidad de Aprendizaje: BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA					Fecha de elaboración: 2 de Julio de 2010		
					Fecha de revisión: 18 de junio de 2013		
Clave	Horas de teoría	Horas de práctica	Total de horas	Créditos	Tipo de Unidad de Aprendizaje	Carácter de la Unidad de Aprendizaje	Núcleo de formación
L43725	64	32	96	10	CURSO	OBLIGATORIA	SUSTANTIVA
Prerrequisitos Biología celular, Bioquímica, Compresión de textos, principio básicos del manejo de materiales, reactivos y equipo de laboratorio.			Unidad de Aprendizaje Antecedente NINGUNA		Unidad de Aprendizaje Consecuente NINGUNA		
Programas académicos en los que se imparte: Programas educativos en los que se imparte: Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista							



PRÁCTICAS DE LA UNIDAD DE APRENDIZAJE DE BACTERIOLOGIA Y MICOLOGIA

UNIDAD DE COMPETENCIA I

PRÁCTICA No. 1 TINCIONES DE RUTINA PARA BACTERIAS Y HONGOS

INTRODUCCIÓN: En el diagnóstico microbiológico, la visualización del agente patógeno o su efecto en el material biológico remitido al laboratorio de diagnóstico constituye el primer paso hacia su identificación. Esto puede realizarse mediante el examen directo de una preparación húmeda o bien de un frotis fijo teñido con colorantes específicos.

La observación de microorganismos vivos con o sin motilidad utilizando preparaciones húmedas es fácil de realizar y requieren de un mínimo de material. En una preparación húmeda se pueden observar diferentes tipos de movimiento, como son:

- El movimiento browniano de partículas pequeñas debido al bombardeo por moléculas del medio líquido.
- El movimiento de microcorrientes debido frecuentemente al calor generado por el foco microscópico.
- Movimiento flagelar o real de las bacterias cuyas características pueden variar en los diversos microorganismos.

Para los estudios bacteriológicos y micológicos además se han ensayado y propuesto gran variedad de métodos de tinción, los que apoyan en proporcionar contraste entre el microorganismo y el medio que la rodea, permitiendo llevar a cabo la diferenciación entre los distintos tipos morfológicos; además permite el estudio de estructuras u organelos propios de la célula bacteriana y micótica. Dentro de las tinciones importantes para bacterias y hongos son las siguientes:

OBJETIVO: Conocer e identificar la morfología bacteriana y fungal, así como sus principios metabólicos, genéticos y taxonómicos.

LUGAR DE REALIZACIÓN: laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UEAM

MATERIAL GENERAL: Portaobjetos, cubreobjetos, lápiz graso, asas bacteriológicas graduadas, papel secante, aceite de inmersión, mechero, tren de tinción de Gram, tinción de lactofenol azul de algodón, solución desinfectante, KOH al 3%, Microscopio óptico binocular de campo claro (con objetivos de 4X, 10X, 40X, 100X)



Equipo de trabajo:

- Vaselina o plastilina
- 1 cultivo en agar de *E. coli*
- 1 cultivo en agar de *Staphylococcus spp*
- 1 cultivo en agar de una levadura
- 1 cultivo en agar de *Aspergillus spp*

METODO

PREPARACIONES HUMEDAS:

1. Deposite ya sea una capa delgada de vaselina alrededor del borde del cubreobjetos o un pedazo pequeño de plastilina en las 4 esquinas del cubreobjetos, SIN TOCAR las caras del mismo con los dedos.
2. En el centro del cubreobjetos preparado con vaselina ó plastilina, coloque con el asa microbiológica varias gotas del cultivo bacteriano (un cubreobjetos por muestra)
3. Tome una laminilla y colóquela sobre el cubreobjetos, presionando suavemente.
4. Invierta la preparación y obsérvala al microscopio con los objetivos de 40X y 100X si se utilizó vaselina, o con el de 10X en el caso de haberse utilizado plastilina.

PREPARACIÓN DE LOS FROTIS FIJOS PARA TINCIONES:

1. Realice un frotis fijo de cada uno de los cultivos proporcionados.
2. Utilice laminillas limpias y marcadas para su identificación, con el lápiz graso marque el área donde se va a colocar la muestra.
3. La técnica para realizar el frotis bacteriano es variable dependiendo si el cultivo se encuentra en medio sólido o líquido.
 - A) Cultivo en líquido: Con un asa bacteriológica previamente flameada, se coloca una pequeña gota de cultivo que se va a teñir en un portaobjetos limpio.
 - B) Cultivo en medio sólido: Se coloca una gota de agua destilada en el portaobjetos, se recolecta una colonia de medio sólido y se mezcla, realizando un extendido uniforme.
4. Extienda la gota sobre la laminilla formando una capa fina. Debe evitarse preparar un frotis demasiado grueso.
5. Deje secar las laminillas a temperatura ambiente.
6. Cuando se haya secado el frotis pasa la laminilla 3 veces por la llama del mechero con la capa del frotis hacia arriba, no aplicar calor en forma excesiva ya que estropearía la morfología normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir.



REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN DE GRAM:

Procedimiento (modificación de Hucker para tinción de bacterias y levaduras):

1. Preparar frotis fijos a partir de cada uno de los cultivos bacterianos
2. Agregar sobre la preparación cristal violeta durante 30 segundos.
3. Lavar con agua destilada
4. Añadir lugol durante 30 segundos.
5. Lavar con agua destilada
6. Decolorar con alcohol-cetona por 5 a 10 segundos.
7. Lavar
8. Agregar safranina durante 30 segundos.
9. Lavar, secar y observar al microscopio con aceite de inmersión y con el objetivo de 100X

REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE KOH AL 3%:

Para ratificar los resultados de la tinción de Gram se utiliza la prueba de KOH al 3%. Esta prueba consiste en colocar sobre una laminilla una gota de KOH AL 3%, después recolectar con el asa muestra de las colonias bacterianas en estudio, mezclar con la gota de KOH, con movimientos giratorios durante 1 a 3 minutos.

Interpretación: Si al separar el asa de la mezcla se forma una hebra viscosa, la prueba es positiva e indica que se trata de bacterias Gram negativas. Si al separar el asa no se forma hebra, la prueba es negativa, e indica que las bacterias son Gram positivas

REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN DE LACTOFENOL AZUL DE ALGODÓN:

1. Sobre un portaobjetos limpio coloque una gota de lactofenol azul de algodón.
2. Con el asa en forma de "L" tome una pequeña cantidad de la colonia y colóquela sobre la gota del colorante.
3. Coloque un cubreobjetos sobre la preparación, la cual puede ser ligeramente calentada (esto ayuda a extender el hongo en toda la preparación y a remover las burbujas)
4. Observe al microscopio con el objetivo seco fuerte (40 X).



RESULTADOS

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el docente, entregara un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.

CUESTIONARIO

1. ¿ De qué color se tiñen las bacterias Gram positivas y por qué?.
2. ¿ De qué color se tiñen las bacterias Gram negativas y por qué?.
3. ¿Qué es un frotis?
4. ¿Con que finalidad se fija la muestra de microorganismos en el porta objetos?
5. ¿Cuál es la razón de teñir las muestras bacterianas?
6. ¿Por qué es necesario emplear aceite de inmersión para la observación de los microorganismos.
7. ¿Qué función tiene el Yodo en la tinción de Gram?
8. Menciona tres bacterias que tiñen Gram positivas y escribe la enfermedad que causa cada una de ellas
9. Menciona tres bacterias que tiñen Gram negativas y escribe la enfermedad que causa cada una de ellas.
10. ¿Para qué sirve la tinción de Ziehl-Neelsen?



UNIDAD DE COMPETENCIA II

PRACTICA No. 2: METODOS DE INOCULACIÓN Y SEMBRADO DE BACTERIAS EN MEDIOS DE CULTIVO

INTRODUCCIÓN:

Para realizar el estudio de las bacterias es necesario recuperarlas del hábitat natural donde se encuentran y hacer que proliferen en medios artificiales que proporcionen sus requerimientos nutricionales. A este procedimiento se le conoce como cultivo bacteriano *in vitro*.

Las bacterias para su metabolismo necesitan: donadores y aceptores de hidrógeno, fuentes de carbono, fuentes de N y minerales. Además del uso de un medio nutritivamente adecuado para el cultivo bacteriano, es necesario considerar factores ambientales tales como la temperatura, pH, humedad relativa y atmósfera de incubación.

Los métodos de siembra de bacterias en medios de cultivo están directamente relacionados con la consistencia de los mismos. Estos pueden ser líquidos (pruebas bioquímicas y medios de enriquecimiento), semisólidos (pruebas de motilidad de cepas), sólidos (pruebas bioquímicas, conservación de cepas, pruebas de susceptibilidad a quimio-terapéuticos o realizar aislamientos en cultivo puro).

MEDIOS SÓLIDOS PARA CONSERVACIÓN DE CEPAS: En este caso el medio es envasado en tubos y se permite su solidificación de tal manera que se logre una superficie (fig. 1). El uso de tubos con tapón de baquelita prolonga el tiempo de deshidratación del medio.

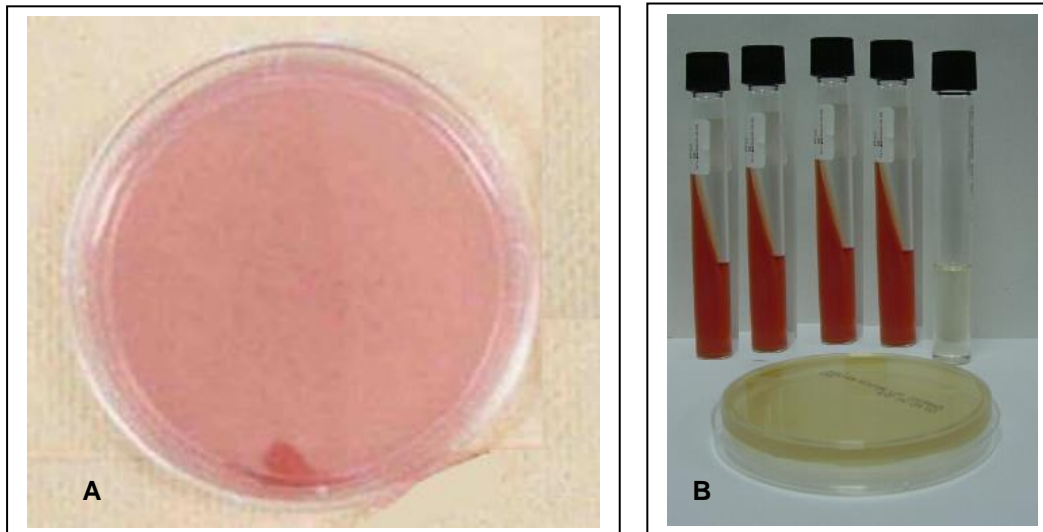


Fig. 1. A) Medio solido en caja, B) Medio solido en tubo



MEDIOS SÓLIDOS PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A QUIMIOTERAPÉUTICOS: En este caso el medio es envasado en cajas de Petrí y la inoculación se hace por medio de estrías continuas en toda la superficie por medio del asa o por medio de un hisopo (fig. 2).

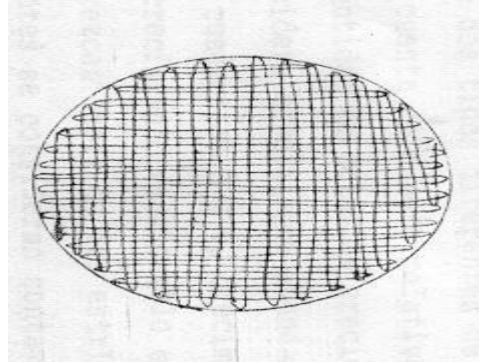
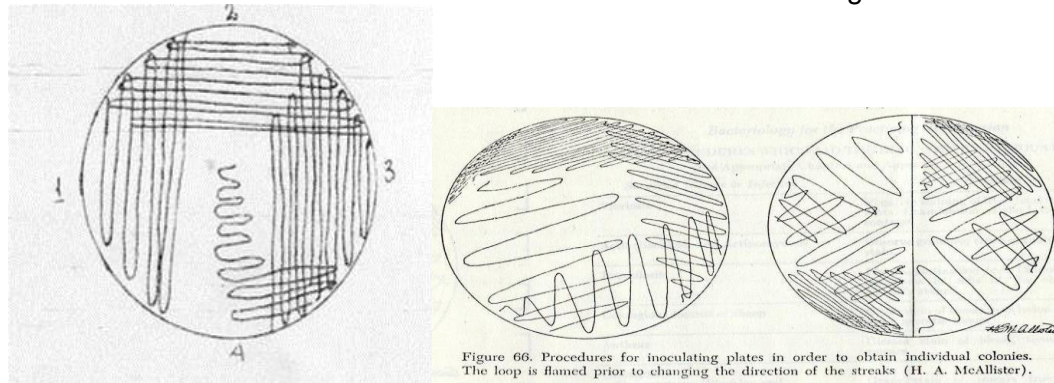


Fig. 2

MEDIOS SÓLIDOS PARA EL AISLAMIENTO EN CULTIVO PURO: En este caso los medios se envasan en cajas de Petrí, y el objetivo es obtener el crecimiento aislando colonias bacterianas, es decir, “colonias pura”, libres de otros gérmenes contaminantes, con el fin de estudiar e identificar a una especie bacteriana. La inoculación se realiza con el asa como se ilustra en la fig. 3.



(FIG. 3.)



El estudio de la morfología de las colonias es de gran importancia debido a que gracias a ésta puede iniciarse una identificación preeliminar de los microorganismos aislados. Las colonias bacterianas presentan características morfológicas muy variadas, mismas que son constantes para cada especie de bacterias en idénticas condiciones de cultivo. Estas características pueden modificarse cuando factores tales como la humedad relativa, medio de cultivo, temperatura, atmósfera de incubación varían.

La descripción de las colonias bacterianas debe realizarse cuando éstas se encuentran separadas unas de otras en el medio de cultivo, tomando en cuenta las siguientes características: tamaño, color, superficie, borde, opacidad, elevación, estructura interna.

Las características de la superficie, borde, opacidad, elevación y estructura interna, están sujetas a la interpretación del observador. Para describirlas es necesario el uso de un microscopio estereoscópico, por lo que su valor descriptivo es menos relevante. De acuerdo a estos criterios, las colonias pueden clasificarse de la siguiente forma:

- Superficie: Lisas, Rugosas.
- Estructura interna: Mucoide, Granular, Filamentosa.
- Opacidad: Translúcidas, Opacas, Brillantes.
- Borde: Enteras, Onduladas, Lobuladas, Erizadas, Filamentosas.
- Elevación: Umbilicales, Difusas, Planas, Convexas.

Otro dato útil en la identificación preeliminar de colonias bacterianas es la producción de hemolisinas. Estas se ponen de manifiesto en medios de cultivo adicionados con sangre, tales como el agar sangre y el caldo sangre. En el agar sangre la producción de hemolisinas conduce a la formación de un halo de lisis de eritrocitos alrededor de las colonias. Si dicho halo es transparente se interpreta como hemólisis completa (hemólisis β) mientras que si el halo es de color gris verdoso se trata entonces de hemólisis incompleta (hemólisis α).

Al hacer la identificación de las colonias bacterianas aisladas no siempre será necesario detallar todas las características morfológicas mencionadas; generalmente se toman en cuenta aquellas que son relevantes.

OBJETIVO: Conocer e identificar la morfología bacteriana y fungal, así como sus principios metabólicos, genéticos y taxonómicos.

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UEAM



MATERIAL:

GENERAL: Asas bacteriológicas graduadas, asas bacteriológicas rectas, papel secante, solución desinfectante, marcador permanente, Mechero, Estufa Bacteriológica a 37 °C (temperatura constante).

SECCIÓN:

- 1 cultivo en agar de *E. coli*
- 1 cultivo en agar de *Staphylococcus spp*
- 1 cultivo en agar de una levadura
- 1 cultivo en agar de *Aspergillus spp*
- Medio Agar sangre
- Medio MacConkey
- Medio Verde Brillante
- Medio Agar Sal y manitol
- Medio Agar Sabouraud
- Medio TSI
- Medio SIM
- Caldo Rojo de Fenol
- Caldo nutritivo

METODO:

PROCESO DE INOCULACIÓN Y SIEMBRA EN PLACA:

1. Desinfectar la mesa de trabajo.
2. Seleccionar una colonia del medio que contiene un cultivo puro, sosteniendo la placa a una distancia no mayor de 20 cm. del mechero.
3. Esterilizar el asa y dejarla enfriar en el agar.
4. Tomar únicamente la colonia seleccionada
5. Descargar el asa en uno de los extremos de la placa (ver esquema anexo).
6. Realizar la siembra con la misma asa.
7. Esterilizar el asa y dejarla enfriar,
8. Cerrar la caja y rotularla con el número o nombre de muestra, número de equipo y fecha.
9. Incubar placas a 37 °C por 24 horas.
10. Transcurridas las 24 hrs., observa cuidadosamente el crecimiento en las cajas de Petrí, sin abrirlas.



11. Observar las colonias obtenidas y describirlas teniendo en cuenta las siguientes características
12. Identificar y mencionar las formas y características de las colonias, utiliza el esquema anexo.
13. Guarda las cajas en el refrigerador, hasta la próxima clase (OPCIONAL).

PROCESO DE INOCULACIÓN Y SIEMBRA EN TUBO (Medio sólido):

1. Destapar el tubo y flamear la parte superior.
2. Esterilizar el asa recta y enfriarla.
3. Tomar una colonia del medio que contiene el cultivo puro con el asa recta estéril.
4. Siembre en los tubos con agar inclinado de acuerdo al método que se utilice de siembra, a una distancia aproximada de 20 cm. del mechero.
5. Rotular los tubos de la misma manera que las placas.
6. Incubar placas a 37 °C por 24 horas.
7. Transcurridas las 24 hrs., observa cuidadosamente el crecimiento en los tubos, sin abrirlos, y anotar lo observado.
8. Guarda las cajas en el refrigerador, hasta la próxima clase.

PROCESO DE INOCULACIÓN EN TUBO (Medio líquido):

- a. Seleccionar una colonia del medio a una distancia aproximada de 20 cm. del mechero
- b. Esterilizar el asa recta y enfriarla
- c. Destapar el tubo y flamear la parte superior.
- d. Introducir el asa con el inóculo a sembrar, agitar el asa hasta que la muestra sea homogénea.
- e. Esterilizar el asa y dejarla enfriar
- f. Flamear el tubo y tapanlo.
- g. Rotular los tubos de la misma manera que las placas.
- h. Desinfectar la mesa de trabajo
- i. Incubar tubos a 37 °C por 24 horas.
- j. Transcurridas las 24 hrs., observa cuidadosamente el crecimiento en los tubos, sin abrirlos, y anota lo observado.
- k. Guarda los tubos en el refrigerador, hasta la próxima clase (OPCIONAL).



RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregará un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.

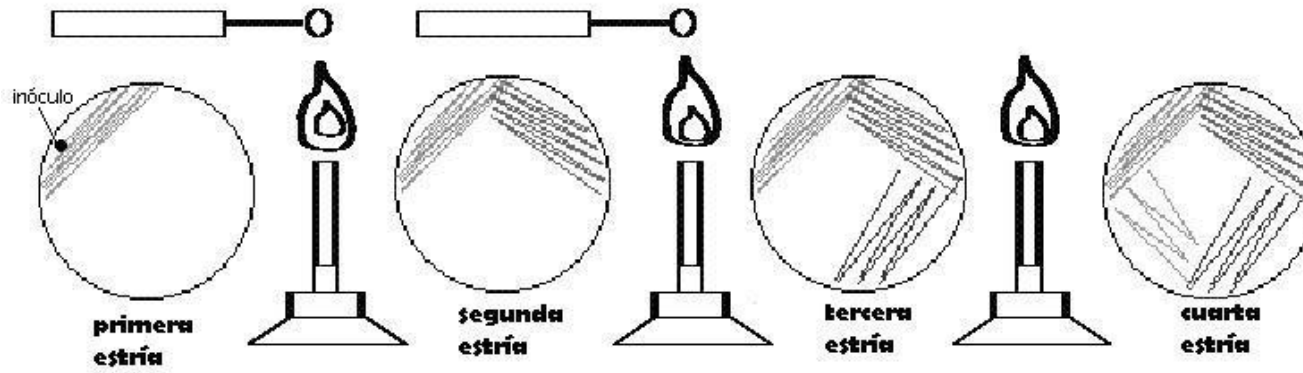
CUESTIONARIO:

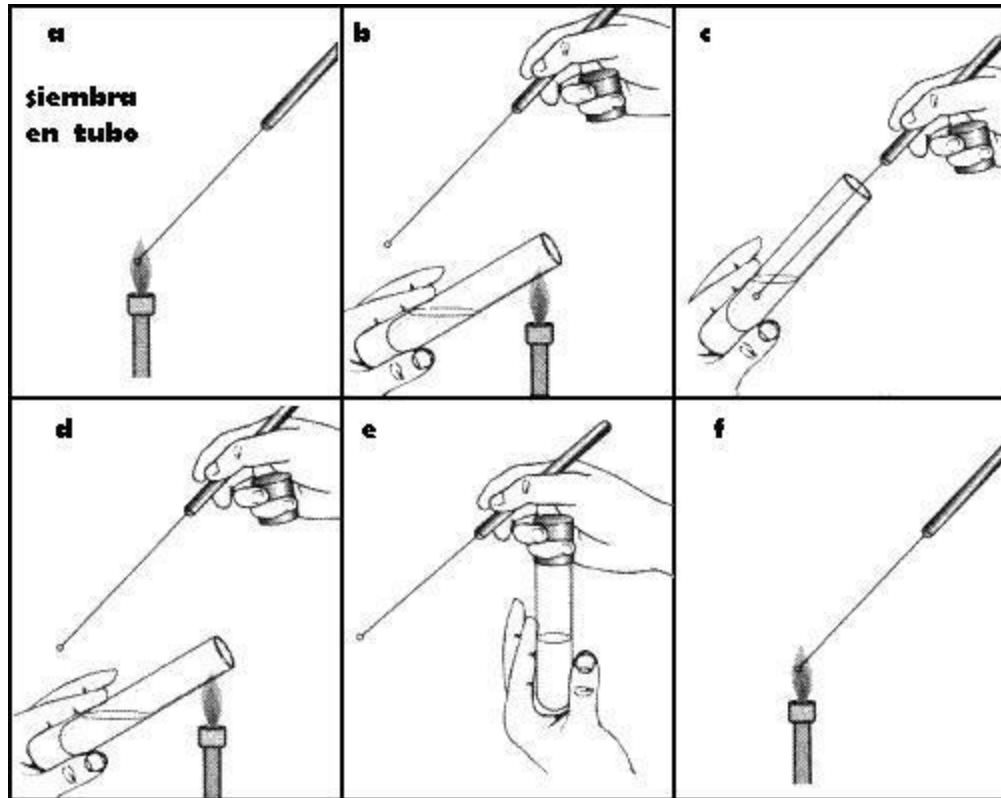
1. ¿Por qué se debe trabajar cerca del mechero?
2. ¿Qué es un cultivo puro?
3. ¿Qué estudios podemos realizar aislando un microorganismo?
4. ¿Qué sucede si tomamos una colonia con el asa caliente?



ANEXOS

Técnica de siembra en estría por agotamiento




















Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme 	Entero 	Plana 	Lisa o rugosa
Circular 	Ondulado 	Elevada 	Mate o brillante
Rizoide 	Lobulado 	Convexa 	Seca o cremosa
Irregular 	Filamentoso 	Crateriforme 	Invasiva o superficial
Filamentosa		Acuminada 	

Figura 5.6.
Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas aisladas sobre medio sólido.



UNIDAD DE COMPETENCIA III

PRÁCTICA No. 3: TOMA, CONSERVACIÓN Y ENVIO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO Y MICÓLOGICO

INTRODUCCIÓN:

La bacteriología y micología diagnóstica es el estudio de las muestras tomadas a partir de pacientes de los cuales se sospecha de una infección que involucre a estos agentes. El laboratorio puede apoyar al clínico de la siguiente manera:

- Confirmando el diagnóstico presuntivo.
- Sugiriendo la quimioterapia de la enfermedad.
- Colaborando en el conocimiento epidemiológico de las enfermedades.
- Permitiendo la elaboración de autobacterinas.

Los resultados del examen bacteriológico y micológico, así con la rapidez con que éstos sean obtenidos, no dependen sólo de los métodos de laboratorio empleados, sino también de la forma en que sean colectadas y enviadas las muestras clínicas. Dichos resultados pueden verse influenciados por la presencia de microorganismos que son parte de la microflora normal, por la migración bacteriana pos-mortem o por la aplicación de antimicrobianos antes del envío de la muestra. El clínico debe tener en mente estos factores para realizar la interpretación de los resultados emitidos por el laboratorio.

1. COLECCIÓN Y ENVIO DE MUESTRAS:

A continuación se mencionan algunas normas generales:

- Tomar la muestra del sitio más representativo del problema, de preferencia en la etapa aguda de la enfermedad.
- Las muestras obtenidas a partir de animales muertos deberán tomarse dentro de las primeras 3 horas de ocurrida la muerte o el sacrificio.
- Las muestras deben colectarse bajo estrictas condiciones de antisepsia. Tanto el material de colección como el recipiente en el que la muestra sea transportada deberán ser estériles. Este último preferentemente debe tener un tapón de rosca.
- Las muestras colectadas no deben entrar en contacto con desinfectantes.
- Las muestras deben identificarse con los siguientes datos: especie, raza, edad, sexo, arete o nombre del animal, así como dirección teléfono y nombre del propietario del animal (etiqueta de identificación).
- Una vez colectadas las muestras deben enviarse dentro de las siguientes 24 horas al laboratorio en condiciones de refrigeración.
- Cuando sea necesario el uso de hisopos para la colección de las muestras hay peligro de desecación, por ello deben enviarse en medios de transporte (Stuart, Carry-Blair, etc.) que ayudan a la preservación de la bacteria pero no a la multiplicación.



- Debe anexarse una historia clínica pertinente que incluya la hora de la muerte del animal, número de animales afectados, si el animal del que provienen la muestra fue tratado con antimicrobianos, cuáles y durante cuánto tiempo y un diagnóstico presuntivo con base en signos clínicos y epidemiológicos.
- Es importante hacer notar que el manejo de las muestras clínicas deben realizarse con precaución debido a que algunos agentes involucrados en las enfermedades infecciosas de animales constituyen un riesgo de zoonosis para la salud del clínico y del bacteriólogo.

Los problemas más frecuentes para la identificación bacteriana y micológica en el laboratorio son:

- Envío de muestras no representativas de la lesión en cuestión.
- Toma de muestras sin antisepsia.
- Envío de muestras en condiciones inadecuadas.
- Falta de historia clínica completa y de un diagnóstico presuntivo.

Por lo anterior, es indispensable que el clínico tenga un conocimiento sobre la correcta obtención y envío de muestras al laboratorio.

OBJETIVO: El alumno aplicará los procedimientos generales para la colección, conservación y envío de muestras clínicas al laboratorio para el diagnóstico bacteriológico y micológico.

LUGAR DE REALIZACIÓN: LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UEAM

MATERIAL

GRUPO:

- Una nevera con refrigerantes
- Torundas de alcohol al 70%
- Torundas de yodo al 2%

POR EQUIPO:

- Material para sujeción del animal
- Medio de transporte Stuart
- Hisopos estériles
- Frascos tipo Gerber estériles
- Bolsa de plástico nuevas.
- Estuche de disecciones



POR PERSONA:

- Equipo de protección personal (dependiendo si se decide realizar en laboratorio o explotación pecuaria)

METODO:

1. Obtener muestras de exudado, leche, sangre, heces, orina, órgano y pelos de animales que presenten problemas clínicos, así como de agua y alimento si amerita.
2. Recopilar los datos más importantes para realizar la historia clínica
3. Conservar y enviar las muestras al laboratorio de diagnóstico para su análisis bacteriológico o micológico.

RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregara un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.



ANEXOS:

Recomendaciones para la Toma y Envío de Muestras de Acuerdo a Condiciones Patológicas Específicas

Condición Patológica	Tipo de Muestra y Cantidad Recomendada	Forma de Colección y Envío	Observaciones
Abortos	<ul style="list-style-type: none"> Feto Completo o Contenido Abomasal (1 mL) Pulmón, Bazo, Hígado, Riñón Fetal (6 cm por lado) Placenta y Placentomas. Secreción Vaginal (1 mL) Leche (15 mL) Alimento (100 g.) 	Frascos, Bolsas de Plástico, Hisopos, Jeringas.	El feto y los órganos pueden enviarse en congelación, cuando se sospecha de candidiasis enviar hígado en medio de transporte especial. Alimento en caso de aflatoxicosis.
Abscesos, Granulomas y Exudados	<ul style="list-style-type: none"> Exudado Purulento (1 mL) Absceso Completo Biopsia 	Jeringa, Hisopo, Frasco, Bolsa de Plástico.	En caso de granulomas sospechosos de tuberculosis deben extremarse precauciones.
Artritis	<ul style="list-style-type: none"> Líquido Sinovial (1 mL) Articulación Completa 	Jeringa, Hisopo, Bolsa de Plástico.	Desinfectarse piel antes de la artrocentesis.
Clostridiasis Invasivas (Miositis Necróticas, Hepatitis Necrótica)	<ul style="list-style-type: none"> Músculo Necrótico (6 cm. por lado) Tejido Subcutáneo Edematoso (6 cm. por lado) Hígado (6 cm. por lado) 	Frasco, Bolsa de Plástico	Enviar rápidamente al laboratorio en atmósfera anaerobia, en este caso no es recomendable refrigeración.
Enterotoxemia	<ul style="list-style-type: none"> Intestino y Órganos Afectados 	Segmento Ligado de Intestino en Frasco.	Enviar en refrigeración.
Dermatomicosis	<ul style="list-style-type: none"> Pelos y Escamas 	Frascos, Sobres de Papel Nuevos, Portaobjetos	No es necesario que los recipientes estén estériles. Las muestras deben tomarse de la periferia de la lesión.
Diarreas	<ul style="list-style-type: none"> Intestino Heces (1 g.) Nodulos Linfaticos Mesentericos, Vesícula Biliar. Alimento (100 g.) Agua (100 mL) 	Segmento Ligado del Intestino en Frasco. Guantes de Palpación. Frascos, Bolsas, Hisopos.	En grandes especies tomar las heces directamente del recto y en pequeñas especies con hisopos. En caso sospechoso de paratuberculosis enviar raspado y mucosa intestinal.



Infecciones Genitales	<ul style="list-style-type: none"> Exudados (1 mL) Lavados Prepucciales o Vaginales (10 mL) Órganos: Testículos, Epididimo, Útero. (Completo o 6 cm. por lado) 	Hisopos, Jeringas, Frascos o Bolsas de Plástico.	Si se sospecha de <i>Campylobacter</i> , <i>Leptospira</i> o <i>mycoplasma</i> , las muestras deben enviarse dentro de las siguientes 3 horas de su colección en refrigeración.
Infecciones Urinarias	<ul style="list-style-type: none"> Orina (6 mL) Riñón (6 cm. por lado) 	Cateter, Jeringa, Frasco, Bolsa de Plástico.	Las muestras deben enviarse dentro de las siguientes 2 horas de su colección.
Mastitis	<ul style="list-style-type: none"> Leche (15 mL) Glándula Mamaria (6 cm. por lado) 	Frascos, Bolsas de Plástico	Lavar y desinfectar el pezón previo a la obtención de la muestra, cuidar de no tocar la piel con el frasco, sólo el chorro de leche tendrá contacto con el frasco.
Neumonías	<ul style="list-style-type: none"> Lavado Traqueobronquial (5 mL) Pulmón (6 cm. por lado) Nódulos Linfáticos Mediastínicos 	Jeringas, Frascos, Bolsas de Plástico	Si se sospeche de micoplasmosis o clamidiasis, las muestras deben enviarse dentro de las siguientes 4 horas a su colección.
Otitis Media Aguda o Crónica	<ul style="list-style-type: none"> Exudado (1 mL) 	Hisopos, Jeringas	Limpiar el canal externo con un antiséptico y tomar la muestra en el oído medio.
Problemas Nerviosos	<ul style="list-style-type: none"> Encéfalo (Completo o 6 cm. por lado) Exudados (1 mL) Líquidos Cefalorraquídeo (2 mL) 	Bolsas de Plástico, Frascos, Jeringa, Hisopos.	El líquido cefalorraquídeo debe ser procesado de inmediato
Septicemias	<ul style="list-style-type: none"> Sangre (10 mL) Bazo, Hígado, Pulmón, Nódulos Linfáticos Riñones, Cerebro (6 cm. por lado) Médula Ósea (Una Costilla) 	Jeringas, Frascos, Bolsas de Plástico	Si el animal tiene más de 3 horas de muerto debe enviarse médula ósea.



UNIDAD DE COMPETENCIA IV

PRÁCTICA No. 4 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

INTRODUCCIÓN:

Como indica el nombre de la familia *Enterobacteriaceae*, muchos miembros de este grupo son naturales del tracto gastrointestinal. Antes del advenimiento de los antibióticos, quimioterapéuticos e inmunodepresores, los miembros de este grupo estaban limitados a causar enfermedades de los tractos gastrointestinal y urinario. Hoy las enterobacterias se pueden recuperar en infecciones de virtualmente todos los sitios anatómicos.

Las enterobacterias se eliminan en las heces y contaminan el medio externo donde pueden permanecer viables por mucho tiempo, en condiciones favorables, por lo cual estos gérmenes son indicadores del grado de contaminación fecal de los alimentos y del agua. Algunos microorganismos intestinales como *E. coli* son parte de la flora normal producen enfermedades de manera accidental en tanto que otros como *Salmonella* son patógenos para el hombre y los animales domésticos de manera regular.

Las enterobacterias se eliminan en las heces y contaminan el medio externo donde pueden permanecer viables por mucho tiempo en condiciones favorables, por lo cual estos gérmenes son indicadores del grado de contaminación fecal de los alimentos y del agua

Todas las enterobacterias son bacilos Gram negativos, sin agrupación definida. Ninguna enterobacteria forma esporas. Son aerobias o anaerobias facultativas. Este grupo es amplio y frecuentemente de publican cambios en su clasificación taxonómica.

La *E. coli* causa diarrea y enteritis en distintas especies animales, además puede actuar como un patógeno oportunista de procesos misceláneos como mastitis, onfalitis, infecciones de vías urinarias y respiratorias. Además existen serotipos enteropatógenos que se asocian a la producción de diarreas en cerdos, bovinos, caprinos y equinos; y serotipos asociados a septicemia en bovinos y aves.

El *Citrobacter freundii* es un patógeno oportunista que se asocia a infecciones misceláneas como las descritas para *E. coli*. Se puede aislar de mamíferos, aves, reptiles y anfibios.

La *Salmonella enteritidis* causa diarreas, septicemia y aborto en distintas especies animales. La *Salmonella choleraesuis* causa septicemia y neumonía en cerdos. La *Salmonella gallinarum* causa la tifoidea aviar. La *Salmonella arizonae* se aísla frecuentemente de reptiles clínicamente sanos y bajo ciertas condiciones causa problemas digestivos, tegumentarios y sistémicos en estos animales.

El *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris* son patógenos oportunistas ampliamente distribuidos en la naturaleza.

El *Enterobacter aerogenes* se asocia a mastitis bovina, se comporta como patógenos oportunista. La *Serratia marcescens* causa mastitis en bovinos. La *Klebsiella pneumoniae* actúa como oportunista en vías respiratorias y en tracto genital principalmente; es causa común de mastitis aguda en bovinos y metritis, cervicitis y abortos en yeguas.



OBJETIVO: El alumno describirá las características de cultivo, morfológicas y bioquímicas más relevantes de las enterobacterias de mayor importancia en Medicina Veterinaria.

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UEAM

MATERIAL

GENERAL: Asas bacteriológicas graduadas, asas bacteriológicas rectas, portaobjetos, papel secante, solución desinfectante, marcador permanente, Mechero, Estufa Bacteriológica a 37 °C (temperatura constante). Microscopio óptico binocular de campo claro (con objetivos de 4X, 10X, 40X, 100X), tiras de papel filtro.

SECCIÓN:

- 1 cultivo en agar de *E. coli*
- 1 cultivo en agar de *Salmonella typhimurium*
- 1 cultivo en agar de *Enterobacter cloacae*
- 1 cultivo en agar de *Citrobacter freundii*
- 1 cultivo en agar de *Proteus vulgaris* o *Proteus mirabilis*
- 1 cultivo en agar de *Pseudomonas aeruginosa*

POR EQUIPO:

- Agar Sangre
- Agares selectivos diferenciales: MacConkey, Verde Brillante, XLD, *Salmonella-Shigella*, Bismuto sulfito.
- Agar de Triple Hierro y Azúcar (TSI)
- Medio Sim
- Citrato de Simmons
- Urea
- Lisina Descarboxilasa
- Agar de Fenilalanina
- Base de rojo de Fenol con Lactosa, glucosa, manitol y maltosa.
- Medio MIO.
- Reactivo de Cloruro ferrico.
- Reactivo de Oxidasa
- Reactivo de Indol
- Tren de tinción de Gram
- Reactivo de KOH al 3%



METODO:

1. Inocule y siembre en cada medio de cultivo, la cepa bacteriana asignada por equipo
2. Realice la tinción de Gram y compruebe con la prueba de KOH al 3%
3. Realice la prueba de Oxidasa, utilizando el papel filtro.
4. Siembre las bioquímicas con la cepa bacteriana asignada por equipo
5. Incube los medios de cultivo y las pruebas bioquímicas a 37 °C por 24 horas, concluya la identificación del microorganismo con base en la tabla de pruebas bioquímicas
6. Observe la morfología colonia y las reacciones que se observan en cada medio de cultivo.

RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregara un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.

CUESTIONARIO:

1. ¿Menciona las principales enterobacterias de importancia Medicina Veterinaria?
2. ¿Cuáles son las enfermedades que produce y que especie afecta las enterobacterias que mencionaste anteriormente?
3. ¿Qué medios de cultivo y pruebas complementarias necesitarías para confirmar el género y especie de las enterobacterias antes mencionadas?



UNIDAD DE COMPETENCIA V

PRÁCTICA No. 5: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NO ENTERICAS

(

INTRODUCCIÓN:

Las pasterelas son facultativas, inmóviles y poseen cápsula. No forman esporas. Son oxidasa positiva. Habitantes normales de las mucosas de las vías respiratorias altas y del tracto digestivo de animales y hombre. Generalmente se presentan como invasores secundarios produciendo infecciones del tracto respiratorio, mastitis y ocasionalmente septicémicas.

La *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* se asocian al proceso multietiológico denominado “fiebre de embarque de los bovinos”. La *Pasteurella multocida* se asocia a procesos neumónicos en bovinos y cerdos. Es uno de los agentes etiológicos de la rinitis atrófica del cerdo (junto con *B. bronchiseptica*) y el agente etiológico del cólera aviar.

La *Mannheimia haemolytica* se asocia a procesos neumónicos en ovinos y caprinos, a septicemias en corderos y a problemas de mastitis en ovinos.

La *Pasteurella pneumotropica* es causa de neumonías y abscesos en cuyos, ratas y hámsters. La *Pasteurella gallinarum* es parte de la microflora normal de la cavidad nasal de pollos y pavos y se comporta como oportunista en problemas respiratorios.

La *Bordetella bronchiseptica* son microorganismos aerobios estrictos, pueden presentar motilidad y generalmente producen cápsulas. No forman esporas. Es una bacteria del epitelio ciliado del tracto respiratorio de diferentes especies animales. Ocasiona la rinitis atrófica del cerdo en asociación con *P. multocida*. También se ha aislado a partir de neumonías en roedores, gatos, equinos y perros.

OBJETIVO: El alumno describirá las características de cultivo, morfológicas y bioquímicas más relevantes de los géneros *Pasteurella*, *Mannheimia* y *Bordetella* de mayor importancia en Medicina Veterinaria.

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UEAM



MATERIAL GENERAL: Asas bacteriológicas graduadas, asas bacteriológicas rectas, portaobjetos, papel secante, solución desinfectante, marcador permanente, Mechero, Estufa Bacteriológica a 37 °C (temperatura constante). Microscopio óptico binocular de campo claro (con objetivos de 4X, 10X, 40X, 100X), tiras de papel filtro.

SECCIÓN:

- 1 cultivo en agar de *Pasteurella multocida*
- 1 cultivo en agar de *Mannheimia haemolytica*
- 1 cultivo en agar de *Bordetella Bronchiseptica*

POR EQUIPO:

- Agar Sangre
- Agar MacConkey.
- Agar de Triple Hierro y Azúcar (TSI)
- Medio Sim
- Urea
- Base de rojo de Fenol con Lactosa, glucosa, manitol y maltosa.
- Medio MIO.
- Reactivo de Oxidasa
- Reactivo de Indol
- Tren de tinción de Gram
- Reactivo de KOH al 3%



METODOLOGÍA:

Inocule y siembre en cada medio de cultivo, la cepa bacteriana asignada por equipo

Realice la tinción de Gram y compruebe con la prueba de KOH al 3%

1. Realice la prueba de Oxidasa, utilizando el papel filtro.
2. Siembre las bioquímicas con la cepa bacteriana asignada por equipo
3. Incube los medios de cultivo y las pruebas bioquímicas a 37 °C por 24 horas, concluya la identificación del microorganismo con base en la tabla de pruebas bioquímicas
4. Observe la morfología colonia y las reacciones que se observan en cada medio de cultivo.

RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregará un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.

CUESTIONARIO:

1. ¿Menciona las principales diferencias morfológicas de entre las enterobacterias y bacterias Gram negativas que afectan el tracto respiratorio?
2. ¿Qué medios de cultivo y pruebas complementarias necesitarías para confirmar el género y especie de los agentes bacterianos antes mencionados?



UNIDAD DE COMPETENCIA V

PRÁCTICA No. 6: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

INTRODUCCIÓN:

Los estafilococos son microorganismos facultativos, inmóviles, generalmente no poseen cápsula y no formas esporas. Algunas cepas producen pigmento cuando se cultivan a 37 °C en medios enriquecidos. Son catalasa positiva. Los estafilococos son microorganismos ubicuos que con frecuencia pueden ser comensales de la piel y mucosas de los animales. Son organismos esféricos que se agrupan en racimos, aunque algunas células pueden encontrarse solas, en pares o en cadenas muy cortas. Son fuertemente Gram positivos.

El *Staphylococcus aureus* produce una gran variedad de infecciones supurativas en heridas, endometritis, cistitis, piodermas en corderos, perros, gatos y en aves se produce también en abscesos. El *Staphylococcus hyicus*, se asocia a la entidad clínica específica del cerdo conocida como epidermitis exudativa. El *Staphylococcus intermedius* se asocia a piodermas, otitis, conjuntivitis, osteomielitis y rara vez mastitis en perros. El *Staphylococcus saprophyticus* es un patógeno oportunista.

Los estreptococos son microorganismos facultativos, generalmente inmóviles, algunas especies poseen cápsula y no formas esporas. Con excepción de algunas especies de los grupos B y D, no producen pigmento. Son catalasa negativo. Los estreptococos son parásitos de las mucosas de los animales y el hombre. Dadas las condiciones apropiadas, pueden convertirse en gérmenes oportunistas, asociándose a una gran variedad de procesos piógenos.

Las colonias de los estreptococos a las 24 hrs de incubación a 37 °C en aerobiosis son de 1 a 2 mm de diámetro, circulares convexas, grisáceas o translúcidas en forma de gotas de rocío. La mayoría de las cepas patógenas producen hemólisis α o β , lo cual se ve incrementado cuando se cultivan en atmósfera con 10% de CO₂. Son organismos esféricos u ovoides que se agrupan en cadenas cuando son cultivados en medios líquidos. Son Gram positivos.

El *Streptococcus zooepidemicus* y *Str. equisimilis* producen cervicitis, metritis, abortos, poliartritis y mastitis en equinos; también producen procesos piógenos en bovinos y cerdos. El *Streptococcus zooepidemicus* y *Str. equi* producen la gurma o papera de los potros. El *Streptococcus zooepidemicus*, *Str. faecalis* y *Str. faecium* se involucran en diferentes procesos patológicos de las aves. El *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae* y *Str. uberis* son importantes agentes etiológicos de mastitis bovina. El *Streptococcus canis* es agente etiológico de diferentes procesos purulentos en perros. El *Streptococcus suis* es el agente etiológico de la linfadenitis estreptococcica del cerdo.



OBJETIVO: El alumno describirá las características de cultivo, morfológicas y bioquímicas más relevantes de los géneros *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp de mayor importancia en Medicina Veterinaria.

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UEAM

MATERIAL

GENERAL: Asas bacteriológicas graduadas, asas bacteriológicas rectas, portaobjetos, papel secante, solución desinfectante, marcador permanente, Mechero, Estufa Bacteriológica a 37 °C (temperatura constante). Microscopio óptico binocular de campo claro (con objetivos de 4X, 10X, 40X, 100X).

SECCIÓN:

- 1 cultivo en agar de *Staphylococcus aureus*
- 1 cultivo en agar de *Staphylococcus epidermidis*
- 1 cultivo en agar de *Streptococcus agalactiae*
- 1 cultivo en agar de *Streptococcus dysgalactiae*
- 1 cultivo en agar de *Streptococcus* β-hemolítico
- 1 cultivo en agar de *Enterococcus faecalis*

POR EQUIPO:

1. Plasma de Conejo.
2. Agar sangre.
3. Medio selectivo (*Staphylococcus*): Agar sal y manitol, Agar *staphylococcus* 110 ó Agar Chapman stone.
4. Agar sangre con azida de sodio
5. Agar MacConkey
6. Agua Oxigenada (reactivo de catalasa).
7. Agar de Triple Hierro y Azúcar (TSI)
8. Urea
9. Base de rojo de Fenol con Lactosa, glucosa, manitol, trehalosa, sorbitol y maltosa.
10. Medio MR-VP.
11. Tren de tinción de Gram
12. Reactivo de KOH al 3%



METODO:

- Inocule y siembre en cada medio de cultivo, la cepa bacteriana asignada por equipo
- Realice la tinción de Gram y compruebe con la prueba de KOH al 3%
- Realice la prueba de catalasa, y se realizara la prueba de coagulasa en portaobjetos.
- Siembre las bioquímicas con la cepa bacteriana asignada por equipo
- Incube los medios de cultivo y las pruebas bioquímicas a 37 °C por 24 horas, concluya la identificación del microorganismo con base en la tabla de pruebas bioquímicas
- Observe la morfología colonia y las reacciones que se observan en cada medio de cultivo.

RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregara un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.

CUESTIONARIO:

1. ¿Menciona las principales diferencial morfológica de entre las bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas?
2. ¿Cuáles son los las diferencias más características entre *Staphylococcus* y *Streptococcus*?
3. ¿Qué medios de cultivo y pruebas complementarias necesitarías para confirmar el género y especie de los agentes bacterianos antes mencionados?



UNIDAD DE COMPETENCIA VII

PRÁCTICA No. 7: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AGENTES MICÓTICOS

INTRODUCCIÓN:

Los dermatofitos forman un grupo de hongos relacionados taxonómicamente, que muestran afinidad por tejidos queratinizados tales como piel, pelo, plumas, uñas, y cuernos. Dentro de este grupo de hongos se incluyen tres géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, de los cuales únicamente los dos últimos tienen importancia en Medicina Veterinaria.

La mayoría de los dermatofitos son habitantes del suelo. Algunas especies que se han adaptado al huésped son parásitos de los animales. Las infecciones por dermatofitos se conocen como dermatofitosis y se caracterizan por producir lesiones superficiales. En los animales domésticos no existe diferencia clínica notoria en cuanto a tipo y forma de las lesiones. Estas son generalmente circulares, con descamación, alopecia y prurito, con o sin formación de costras.

OBJETIVO: Identificar los principales agentes micóticos de importancia veterinaria.

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UEAM

MATERIAL

GENERAL: Asas bacteriológicas graduadas, asas bacteriológicas rectas, portaobjetos, cubreobjetos, papel secante, solución desinfectante, marcador permanente, Mechero, Estufa Bacteriológica a 30 °C (temperatura constante). Microscopio óptico binocular de campo claro (con objetivos de 4X, 10X, 40X, 100X), Hojas y mangos de Bisturí, pinzas sin dientes de uso clínico.

POR EQUIPO:

- Agar sangre.
- Medio selectivo: Agar sabouread, agar para hongos o agar tripticasa de soya.
- Agar MacConkey
- Base de rojo de Fenol con Lactosa, glucosa, manitol, trehalosa, sorbitol y maltosa.
- Tren de tinción lactofenol azul de algodón



METODO:

PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA:

La muestra ha utilizar para el aislamiento e identificación micológica debe ser característica, y debe ser tomada bajo las debidas medidas de bioseguridad exigidas para este género y del tamaño adecuado, y procesarse inmediatamente.

PROCEDIMIENTO:

1. Con un Hisopo estéril se toma la muestra y se siembra en una caja de Agar Sabouread o agar para hongos y sembrar en forma de cultivo puro a 30 °C por lo mínimo 24 hrs.
2. Sembrado en el microcultivo:
 - Dentro de una caja petrí estéril agregar entre 2 a 4 ml de agua destilada esteril.
 - Colocar un soporte y poner un portaobjetos con un cuadro de Agar Sabouread o Agar para hongos de aproximadamente 1 cm².
 - Con el asa tomar la muestra y sembrar por picadura en cada lado del agar, posteriormente colocar el cubreobjetos, tapan la caja e incubar de 25 a 30 °C de entre 24 a 120 hrs aprox.
 - Una vez observado crecimiento se procede a la realización del frotis.
3. Preparación del frotis.
 - a) Introduce un algodón impregnado con formol al 10 % en la caja y déjalo actuar durante 30 minutos con el fin de inactivar al hongo.
 - b) En un portaobjetos coloca dos gotas separadas de lactofenol azul de algodón. Con las pinzas toma cada uno de los cubreobjetos y colócalos sobre cada una de las gotas del colorante.
 - c) Obsérvese las preparaciones en el microscopio de campo claro con los objetivos 10 X y 40 X
 - d) Observa las estructuras fungales y sus características morfológicas.



INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La identificación se lleva a cabo mediante la observación de las colonias fungales y la preparación de frotis húmedos a partir de estas o a partir de microcultivos con el fin de determinar la morfología microscópica.

1. Identificación en medio de cultivo:

Las cajas de estos medios deben ser revisadas periódicamente hasta por 190-200 hrs a 30 °C y observar la textura, tamaño y pigmento de la superficie y base de las colonias desarrolladas. La mayoría de los dermatofitos producen colonias con micelio de aspecto algodonoso o polvoso.

2. Tinción de Azul de Algodón:

Los dermatofitos producen dos tipos de aleuriosporas; las macroaleuriosporas (multicelulares, septadas) y las microaleuriosporas (unicelulares, no septadas) la morfología característica de dichas estructuras permite la identificación de cada una de las especies.

El *Epidermophyton* produce abundantes macroaleuriosporas de pared gruesa y lisas, en forma de raqueta y no produce microaleuriosporas.

El *Trichophyton* produce pocas macroaleuriosporas con forma alargada (forma de “basto”), de pared lisa y delgada, y produce abundantes microaleuriosporas.

El *Microsporum* produce abundantes macroaleuriosporas en forma de huso, con pared gruesa y áspera (a menudo descritas como “ornamentadas”) y produce pocas microaleuriosporas. Otras estructuras microscópicas que ocasionalmente son útiles para la identificación de los dermatofitos son la presencia de hifas espirales o en forma de “peine” (hifas pectinadas); la presencia de clamidosporas terminales; de artrosporas, etc.

RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregara un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.



CUESTIONARIO:

1. ¿Menciona las principales diferencias morfológicas de entre las bacterias y los hongos microscópicos?
2. ¿Qué diferencia hay entre la tinción de Gram y la diferencia de la tinción Lactofenol azul de algodón?
3. ¿Qué medidas de bioseguridad realizarías para manejar y trabajar en enfermedades micóticas?

ANEXOS:

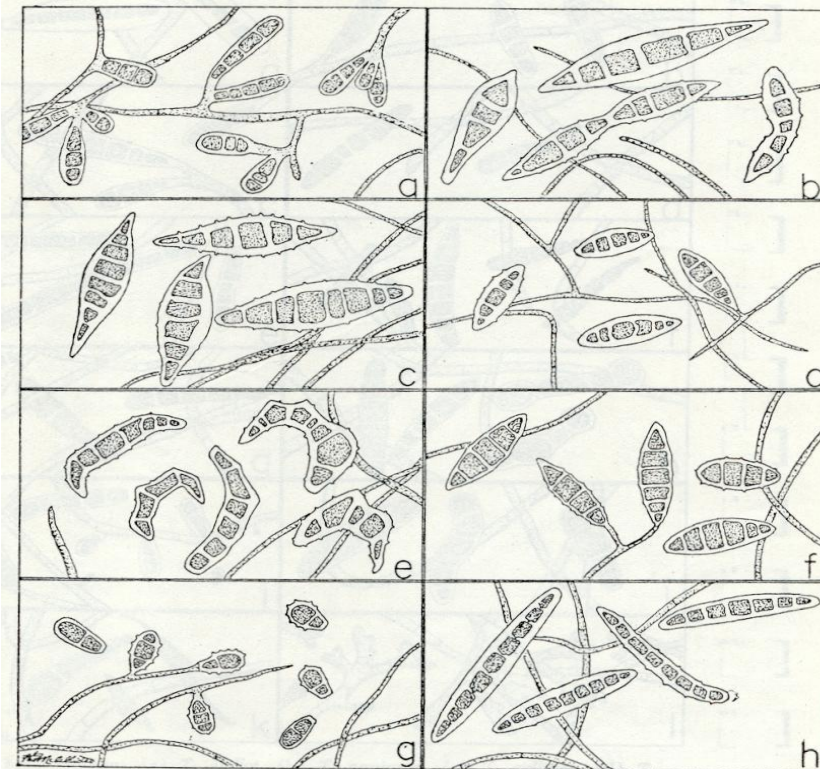


Figure 39. Macroconidia: (a) *E. floccosum*, (b) *M. audouinii*, (c) *M. canis*, (d) *M. cookei*, (e) *M. distortum*, (f) *M. gypseum*, (g) *M. nanum*, (h) *M. vanbreuseghemii* (H. A. McAllister).

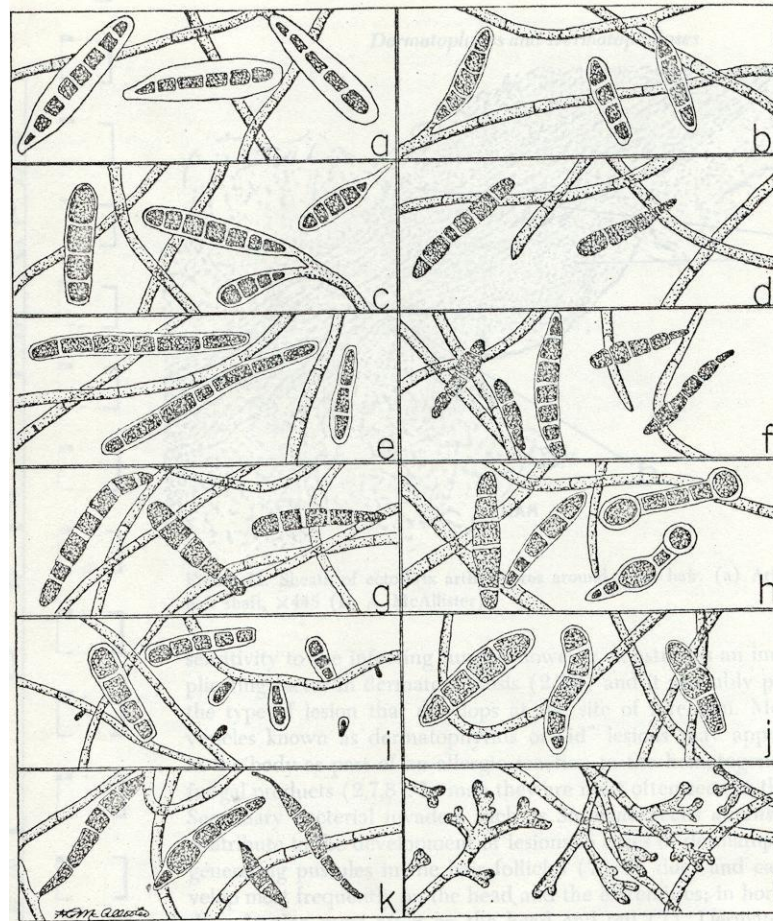


Figure 40. Macroconidia: (a) *T. ajelloi*, (b) *T. equinum*, (c) *T. gallinae*, (d) *T. gourcillii*, (e) *T. megninii*, (f) *T. mentagrophytes*, (g) *T. rubrum*, (h) *T. simii*, (i) *T. terrestre*, (j) *T. tonsurans*, (k) *T. verrucosum*; Favic chandeliers: (l) *T. schoenleinii* (H. A. McAllister).



UNIDAD DE COMPETENCIA VIII

PRÁCTICA No.8: DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD *in vitro* A LOS ANTIMICROBIANOS

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad se encuentra una gran cantidad de antibióticos en el mercado, algunos solamente son específicos para determinadas bacterias, otros únicamente las inhiben y otros actúan solo sobre las Gram positivas.

Debido al abuso de los antibióticos, las bacterias han adquirido resistencia a ellos, de ahí que cuando se presenta un paciente resistente a ellos, de ahí que cuando se presenta un paciente en el que no surten efectos los antibióticos, se debe considerar que el microorganismo que lo está infectando se ha hecho resistente.

En la selección del antibiótico más adecuado para el tratamiento de una infección bacteriana se deben tomar en cuenta diversos factores que dependen tanto del tipo de antibiótico elegido y de su efecto sobre el agente causal que se aisló del proceso infeccioso.

Se han propuesto diversos para medir *in vitro* la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos, de los cuales el más popular es el llamado "sensibilidad con discos".

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana por el método de difusión en Agar son pruebas cualitativas en las que se utilizan discos de papel filtro impregnado con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. Estos discos se colocan sobre la superficie de las cajas de Agar previamente inoculadas con la cepa problema.

Después de la incubación se observan halos de inhibición de desarrollo bacteriano alrededor de los discos con antibióticos a los cuales el microorganismo es susceptible. Por el contrario, si la bacteria es resistente hay crecimiento alrededor del disco.

OBJETIVO: Identificar los mecanismos de acción y resistencia de los antimicrobianos utilizados en medicina veterinaria

LUGAR DE REALIZACIÓN: Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UEAM



MATERIAL

MATERIAL:

GENERAL: Asas bacteriológicas graduadas, pinzas sin dientes de uso clínico, Compás de calibración, Vernier, regla o platilla diseñada para este propósito, hisopos estériles, papel secante, solución desinfectante, marcador permanente, Mechero, Estufa Bacteriológica a 37 °C (temperatura constante).

SECCIÓN:

- 1 cultivo en agar de *E. coli*
- 1 cultivo en agar de *Staphylococcus spp*
- Medio Agar Muller-Hinton
- Caldo Muller-Hinton
- Multidiscos de 12 antibióticos para bacterias Gram positivos (Sanofi Diagnostics Pasteur, S. A.)
- Multidiscos de 12 antibióticos para bacterias Gram negativos (Sanofi Diagnostic Pasteur, S. A.)

METODO:

PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA:

Preparar el medio de Agar de Mueller-Hinton de acuerdo a las instrucciones del fabricante, el pH final a temperatura ambiente deberá estar entre 7.2 y 7.4, este medio favorece el crecimiento de casi todos los microorganismos para los que son más importantes las pruebas de susceptibilidad.

Tomar con una asa bacteriológica de 4 o 5 colonias aisladas del mismo tipo morfológico e inocular en 4 o 5 ml de Caldo Mueller-Hinton, se incuba a 35 °C hasta que aparece una turbidez ligera (generalmente 2 a 5 horas), la turbidez se ajusta con solución salina estéril o caldo estéril hasta tener una densidad comparable, con un estándar de sulfato de bario [El estándar se prepara mezclando 0.5 ml de BaCl₂ 0.048 M (1.175 % peso/volumen de BaCl₂·2H₂O) con 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36N)].

La suspensión ajustada del inóculo no debe permanecer más de 15 a 20 minutos antes de proceder a sembrarla en la caja de Petri.



PROCEDIMIENTO:

1. Para inocular el Agar se utiliza un hisopo estéril de algodón, el cual se humedece con la suspensión, se quita el exceso de caldo presionado y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo, por arriba del nivel del caldo, se estría el medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de Agar, para obtener un inóculo uniforme, se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el Agar. Cuando el inóculo ha secado (de 3 a 5 minutos) se procede a colocar los discos.
2. Los discos se toman con pinza estéril y se colocan en el medio en un tiempo menor de 15 minutos después de haber inoculado la placa, los discos deberán presionarse ligeramente para asegurar un contacto con la superficie, deberá prevenirse una sobreposición de las zonas de inhibición con la distribución adecuada de los discos y con un límite no menor de 15 mm de los bordes de la placa.
3. Después de 15 minutos de haber colocado los discos, invertir la caja de Petri e incubar a 35 °C. El tiempo de incubación es de 18 a 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

La medición de los halos de inhibición se hace con compás de calibración, Vernier, regla o platilla diseñada para este propósito, por el fondo de la caja la cual se ilumina con luz reflejada. El punto final de todos los sistemas de lectura será hasta la completa inhibición del crecimiento determinada visualmente, ignorando colonias tenues o muy pequeñas que pueden ser observadas con minuciosidad (Ver nexos).

RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregara un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.

EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.

CUESTIONARIO:

1. ¿Qué otros medios de cultivo se pueden utilizar para preparar el inóculo?
2. ¿Cómo sabemos que el tubo con el inóculo ya está listo para ser sembrado?
3. ¿Qué otros medios de cultivo se pueden utilizar en lugar de Mueller-Hinton?



ANEXOS:

Clasificación de la susceptibilidad antimicrobiana con base al diámetro de los halos de inhibición en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN (MICROGRAMOS/mL)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN EN mm (***)		
		Resistente (≤)	Intermedio	Susceptible (≥)
AMIKACINA	30	14	15-16	17
AMPICILINA	10			
Enterobacteriaceae		11	12-13	14
<i>Staphylococcus</i> spp.		28		29
<i>Enterococcus</i> spp.		16		17
<i>Streptococcus</i> spp.		21	22-29	30
CARBENICILINA	100			
Enterobacteriaceae		17	18-22	23
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		13	14-16	17
CEFALOTINA	30	14	15-17	18
CEFOTAXIMA	30	14	15-22	23
CEFTAZIDIMA	30	14	15-17	18
CETRIAXONA	30	13	14-20	21
CEFUROXIMA	30	14	15-17	18
CLORANFENICOL	30	12	13-17	18
DICLOXACILINA	1			
<i>Estafilococcus</i> spp.		10	11-12	13
ENOXACIMA	10			
Enterobacteriaceae		14	15-17	18
ERITROMICINA	15			
<i>Enterococcus</i> spp.		13	14-17	18
GENTAMICINA	10			
Enterobacteriaceae		12	13-14	15
NETILMICINA	30	12	13-14	15
NITROFURANTOINA	300	14	15-16	17
PEFLOXACINA	5	14	15-22	23



PENICILINA	10 UI			
<i>Etaphylococcus</i> spp		28		29
<i>N. gonorrhoeae</i>		19		20
<i>Enterococcus</i> spp.		14		
<i>Streptococcus</i> spp.		19		20
TETRACICLINA	30			
<i>Enterobacteriaceae</i>		14	15-18	19
TRIMETROPRIM-SULFAMETOXAZOL	25			
		10	11-15	16



UNIDAD DE COMPETENCIAS I, III, IV, V, VI, VIII

PRÁCTICA No. 9: PROCESAMIENTO DE MUESTRA ENVIADAS AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

INTRODUCCIÓN:

Un adecuado diagnóstico y tratamiento de las diversas enfermedades producidas por bacterias y hongos, generalmente requiere de la detección e identificación del agente etiológico. Esto se logra en el laboratorio a través del examen microscópico, aislamiento e identificación del agente y la prueba de susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

Una vez que la muestra han sido debidamente registradas e identificadas, lo ideal es que sean trabajadas de inmediato, pero cuando esto no sea posible será necesario mantenerlas en refrigeración hasta que puedan ser procesadas.

Sin embargo, es conveniente considerar que existen muestras que deben ser trabajadas de inmediato ya que el proceso de refrigeración no puede lograr que se conservan sin presentar alteraciones y multiplicaciones bacterianas, aunque sea a ritmo más lento, por ejemplo: orina, semen, agua, material fecal y leche.

OBJETIVO:

El alumno aplicará los conocimientos para la realización del diagnóstico bacteriológico y micológico de muestras clínicas como son: observación directa, aislamiento e identificación de los microorganismos aislados en leche, heces y procesos piogenos.

LUGAR DE REALIZACIÓN: LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UEAM

MATERIAL:

GENERAL: Asas bacteriológicas graduadas, asas bacteriológicas rectas, portaobjetos, papel secante, solución desinfectante, marcador permanente, Mechero, Estufa Bacteriológica a 37 °C (temperatura constante). Microscopio óptico binocular de campo claro (con objetivos de 4X, 10X, 40X, 100X), tiras de papel filtro.

POR EQUIPO:

- Agar Sangre
- Agares selectivos: MacConkey, Sal y manitol, Agar dextrosa y papa
- Agar de Triple Hierro y Azúcar (TSI)
- Medio Sim
- Citrato de Simmons
- Urea



- Lisina Descarboxilasa
- Agar de Fenilalanina
- Base de rojo de Fenol con Lactosa, glucosa, manitol y maltosa.
- Medio MIO.
- Reactivo de Cloruro ferrico.
- Reactivo de Oxidasa
- Reactivo de Indol
- Tren de tinción de Gram
- Reactivo de KOH al 3%

METODO:

LECHE:

La siguiente metodología es la sugerida por el “Consejo Nacional de la Mastitis” de los Estados Unidos de América, en su publicación “procedimientos de diagnóstico de la mastitis bovina”

- a) Las muestras refrigeradas deben ser calentadas a 25 °C durante 15 minutos con el fin de liberar los microorganismos atrapados en la grasa de la leche.
- b) La muestra debe agitarse vigorosamente para homogenizarla.
- c) Inmediatamente proceda a realizar dos frotis fijo, teñir con Gram, obsérvalos y anota los resultados.
- d) Inocula 3 asadas de la muestra (son necesarias por los menos 0.025 ml) en la caja de agar sangre, agar MacConkey, agar Sal y Manitol y a partir de este inóculo realiza la primera estría y completa la técnica para aislamiento en cultivo puro. Incuba 24 horas a 37 °C, en algunos casos será necesario incubar hasta 48 hrs.
- e) De las colonias aisladas describe números relativos y morfología macroscópica.
- f) Realiza un frotis a partir de las colonias representativas del aislamiento y describe forma, agrupación y reacción al Gram.
- g) Realiza las pruebas de identificación necesarias para determinar género y especie.
- h) Realizar un antibiograma y determinado la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados.
- i) Emite un resultado definitivo y de acuerdo a este señalando los comentarios y/o recomendaciones útiles para el clínico.



HECES:

a) Realiza un frotis fijo a partir de la muestra y teñir con Gram, observarlo y anotar los resultados.

NOTA: Debido a que las heces contiene una microflora normal abundante el valor diagnóstico del frotis tiene un valor relativo salvo algunas excepciones importantes.

b) Inocular una asada de la muestra en la caja de agar sangre, agar MacConkey, agar Sal y Manitol y realizar la técnica para aislamiento en cultivo puro. Incuba a 37 °C durante 24 horas.

c) Inocular aproximadamente 0.500 grs de la muestra en el tubo con caldo selenito. Incuba a 37 °C durante 6-18 hrs y subcultivar en el medio de verde brillante con la técnica para aislamiento en cultivo puro. Incuba a 37 °C durante 24 hrs.

d) Observar el desarrollo bacteriano en los medios de verde brillante y MacConkey y describir números relativos y morfología de las colonias aisladas.

e) Realizar un frotis fijo a partir de las colonias representativas del aislamiento, teñir con Gram y describir agrupación y reacción tintorial.

f) Realizar las pruebas bioquímicas necesarias para determinar el género y especie del microorganismo aislado.

g) Realizar un antibiograma y determinado la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados.

h) Emitir un resultado definitivo y de acuerdo con este, señalar los comentarios y/o recomendaciones útiles para el clínico.

PROCESOS PIOGENOS:

a) Con uno de los hisopos siembra en el 1er. cuadrante de la caja de Agar y realizar un frotis directo a partir de la muestra. Teñir con Gram, observar y anota forma, agrupación, reacción tintorial y números relativos.

b) Con el asa, se siembra para aislamiento en cultivo puro en la caja de agar sangre, agar MacConkey, agar Sal y Manitol.

c) Incubar los medios a 37 °C durante 24 hrs.

d) De las colonias aisladas en el agar sangre describir número relativos y morfología macroscópica.

e) Realizar las pruebas de identificación necesarias para determinar género y especie de las colonias que desarrollaron en agar sangre.

f) Realizar un antibiograma y determinado la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados.

g) Emitir un resultado definitivo de acuerdo a esta señala los comentarios y/o recomendaciones útiles para el clínico.

RESULTADOS:

Con la información obtenida durante la práctica y la posterior investigación que tendrá que realizar el alumno, entregara un reporte de práctica tal como lo solicite el docente.



EVALUACIÓN (CRITERIOS):

Cada docente establecerá los criterios de evaluación para otorgar una calificación durante la práctica y del reporte de prácticas, con la finalidad medir el grado de adquisición de conocimientos, habilidades, aptitudes/valores de las unidades de competencia que se relacionen con la práctica.

X. BIBLIOGRAFÍA

BÁSICA:

- Brogden K. A. (2000) Virulence Mechanisms Of Bacterial Pathogens. 3rd Edition. Asm Press. Washington, Usa. ISBN: 1-55581-174-4, Clasificación Biblioteca El Cerrillo: QR175 V57 2000
- Deacon J. W. (1988). Introducción A La Micología Moderna. Limusa Mexico. ISBN: 968-18-2641-8. Clasificación Biblioteca El Cerrillo: QK 603 D42
- Hirsh D. C, James Maclachlan, Richard L. Walker. (2004). Veterinary Microbiology. Blackwell Science, Malten, Mass. ISBN: 9780813803791, Clasificación Biblioteca El Cerrillo: SF 780.2 .V48 2004
- Hungerford C Campbell, Charles L., Coaut. (1998). Veterinary mycology laboratory manual. Blackwell Science, Malten, Mass. ISBN: 0-8138-2849-X Clasificación Biblioteca El Cerrillo: SF 780.7 H85
- Jawetz, Ernest., Melnick, Joseph L., Coaut., (1981) Manual De Microbiología Medica. El Manual Moderno. México. ISBN: 968-426-155-1, Clasificación Biblioteca El Cerrillo: QR 46 J375 1981
- Jorge A. Pérez Martínez, Suarez Güemes, Francisco (1990) Bacteriología General: Principios Químico Biológicos. México : U.N.A.M. ISBN: 968-36-1495-7. Clasificación Biblioteca El Cerrillo: QR 46 P48
- Madigan Michael T. Coral Barrachina y col. (2009). Brock Biología de los microorganismos, edición 12a ed.. Pearson. Madrid. ISBN: 9788478290970. Clasificación Biblioteca El Cerrillo: QR 41.2 .B753 2009
- Osbaldiston, G.W. (1975): Técnicas en laboratorio en bacteriología clínica veterinaria / G.W. Osbaldiston. Acribia Zaragoza, Esp. ISBN: 84-200-0372-7. Clasificación Biblioteca el Cerrillo: QR 49 072
- Prescott L. M. y col. (1999). Microbiología. Mc Graw-Hill, Interamericana. isbn: 84-486-0261-7. Clasificación Biblioteca el Cerrillo: QR 41.2 P74
- Quinn P. J. y col. (1999). Clinical veterinary microbiology. Mosby.
- Raquel Granados Pérez, Ma. Carmen Villaverde Peris (2002). Microbiología. No.1 Tomo2. Madrid : Paraninfo : Thomson, 2002. ISBN: 8428324085 Clasificación Biblioteca el Cerrillo: QR41.2 .G73 2002
- Salyers A. A. y Dixie D. W. (2002). Bacterial pathogenesis (A molecular Approach). 2nd edition. ASM Press. Washington, USA. ISBN: 1-55581-070-5, Clasificación Biblioteca el Cerrillo: QR 201 B34 S24



Songer J. G. y Post K. W. (2005). *Veterinary Microbiology (Bacterial and fungal Agents of Animal Disease)*. Elsevier Saunders. Missouri, USA. 0721687172, Clasificación Biblioteca el Cerrillo. SF 780.2 .S66 2005

Stanchi O. N. y col. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Inter-Médica Editorial. Buenos Aires, Argentina. ISBN: 9789505553211, Clasificación Biblioteca el Cerrillo: SF 780.2 .M53 2007

COMPLEMENTARIA:

Arenas. (2003) *Micología Médica Ilustrada*. 2a edición. Mc Graw-Hill, Interamericana.

Gyles C. L. y Thoen C. O. (1995) *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2a edición. Iowa State University Press, Cornell. New Jersey.

Quinn P. J. y col. (2002) *Veterinary microbiology & microbial diseases*. Blackwell Science, Malden, Mass.

Sumano L. H. S. y Ocampo C. L. (1997) *Farmacología veterinaria*. 2da edición. Mc Graw-Hill, Interamericana. México.

Tesis de licenciatura: *Manual de prácticas de bacteriología y micología*: Téllez Silva y José Mercedes. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 2007. Clasificación Biblioteca el Cerrillo: MVZ 24 .T455 2007