



**PROTOCOLO DE LABORATORIO
CURSO MICROBIOLOGÍA
Código 151006**

**Andrea Najjar Céspedes
Docente**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
Bogotá, D. C. Julio 2017**

Contenido

	Pág.
Introducción	5
Actividad práctica 1. Medios de cultivo, métodos de siembra y características macroscópicas de cultivos bacterianos.....	7
Actividad práctica 2. Caracterización microscópica de cultivos bacterianos: Coloración de <i>Gram</i>	19
Actividad práctica 3. Siembra de Microbiota normal.	24
Actividad práctica 4. Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos: difusión en disco.	31
Actividad práctica 5. Caracterización macroscópica y microscópica de hongos.....	37
Actividad práctica 6. Parásitos de importancia en salud.	43
Referencias.....	48



Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 Clasificación de los microorganismos según algunas condiciones del medio ambiente	7
Tabla 2 Métodos para el cultivo de microorganismos en medios sólidos	10
Tabla 3 Características macroscópicas de colonias bacterianas en cultivos sólidos.	11

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 Clasificación de los medios de cultivo.....	9
Figura 2 Características microscópicas observables en la coloración de Gram.	19
Figura 3 Árbol filogenético de la vida.....	24
Figura 4 Diferencias morfológicas y de tamaño entre hongos filamentosos, levaduriformes y bacterias.....	37

Introducción

La Microbiología es la ciencia que estudia aquellos organismos vivos cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutorio del ojo humano, desde luego, ciencia precedida por la invención del microscopio, con sus principios estructurales tal como ahora se le conocen, alrededor del año 1620. En esta arista, un siglo después, la experimentación en animales, el descubrimiento de los cultivos bacterianos, la relación entre patógeno y patología, el perfeccionamiento de técnicas microbiológicas, entre otros, abrió los canales para constituir el naciente cuerpo de conocimientos de quienes encuentran algún afecto o acercamiento a esta ciencia.

Fue así como resultado de la observación y análisis, aquel otro reino diminuto y antes inexistente por descubrir, trajo consigo nuevas ciencias como la inmunología y la virología, afianzando la relación estrecha con la Medicina. Hecho que no quedó allí puesto que estudios posteriores sobre microbiota del suelo han resaltado la gran diversidad fisiológica de los microorganismos y su ubicuidad, generando la necesidad de que otras ciencias biológicas entraran a apoyar el estudio de microorganismos, tales como la genética y la bioquímica, dando así paso a la biología celular y molecular.

Por las atribuciones de esta ciencia, el amplio campo de acción y el propósito de la comprensión cabal por parte del estudiante, especialmente desde el punto de vista práctico, de lo que se debiese hacer y cómo se debiese hacer, el curso de Microbiología de la Escuela de Ciencias de la salud de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, está diseñado para que los estudiantes, a través de actividades prácticas, lleven a cabo procesos para comprender, aplicar y desarrollar nuevo conocimiento en el estudio de la Microbiología.

El objetivo propuesto aquí se divide básicamente en cuatro partes, una que involucra aplicar conceptos en la resolución de problemas por parte del estudiante, mediante el análisis de la información; otra que desarrolla un pensamiento crítico y de análisis a través de la discusión; una más, explicando los conceptos de microbiología con el lenguaje técnico apropiado en los ejercicios académicos y, otra que contiene los elementos generales para desarrollar habilidades en el estudiante, las cuales les



permitan la identificación de posible causalidad, factores de riesgo y medidas preventivas en los eventos infecciosos en salud.

Por último, es bueno resaltar que esta guía no tiene la pretensión de ser un profundo estudio teórico, ni una guía exhaustiva para el desarrollo de prácticas, sino principalmente, a partir de posiciones teóricas antes planteadas, el esfuerzo se centra en interpretar y traducir lo mejor posible a términos prácticos las bases de tales teorías, de modo que se facilite su manejo por parte de los interesados.

Actividad práctica 1. Medios de cultivo, métodos de siembra y características macroscópicas de cultivos bacterianos

Introducción

Durante el estudio de las enfermedades infecciosas, se hizo necesario el aislamiento de los agentes etiológicos y su mantenimiento, en ese momento, Robert Koch comenzó a usar tubérculos estériles para este propósito, observando que no todos los microorganismos crecían en esta superficie. Por lo anterior, empezó a usar extractos de carne junto a un agente solidificante denominado agar, dando como resultado caldos y agares nutritivos. Paralelamente, se desarrollaban técnicas de aislamiento de bacterias y de obtención de cultivos puros.

Los medios de cultivo son una preparación compuesta de biomoléculas conformadas por macronutrientes tales como carbono, oxígeno, hidrogeno, nitrógeno, fósforo y azufre, y de micronutrientes como el magnesio, cobalto, entre otros; cuyo fin es lograr el crecimiento, transporte o mantenimiento de microorganismos. Su clasificación se puede observar en la Figura 1.

Sin embargo, los medios de cultivo no son los únicos necesarios para generar multiplicación y desarrollo de microorganismos, se hacen necesarias condiciones físicas tales como el pH, temperatura, luz, presión, entre otras, su conocimiento permite el diseño de métodos para control o destrucción de poblaciones de estos organismos. Según sean estas condiciones, se desarrollarán algunos microorganismos y otros no, por ello se han establecido clasificaciones para cada condición (Tabla 1).

Tabla 1 Clasificación de los microorganismos según algunas condiciones del medio ambiente

Condición	Definición	Clasificación de los microorganismos	Significado
pH	Indica la concentración de H ⁺ en una solución e interfiere en el funcionamiento de biomoléculas	Acidófilas	Crecen entre pH 0 y 5.0 pH
		Neutrófilas	Crecen entre pH 5.0 y 8.0
		Alcalófilas	Crecen entre pH 8.5 a 11.5

Condición	Definición	Clasificación de los microorganismos	Significado
Temperatura	Magnitud que mide el calor de un objeto e influye en la velocidad de las reacciones químicas en los microorganismos	Psicrófilas	Pueden crecer a 0°C, pero su temperatura optima es 15°C
		Mesófilas	Se desarrollan 25-40°C
		Termófilas	Se desarrollan 45-60°C
Concentración de Oxígeno	El oxígeno es un gas incoloro e inodoro que interviene en procesos de crecimiento bacteriano	Aerobias	Se desarrollan en 20% de O ₂
		Anaerobias facultativas	Se desarrollan en presencia o ausencia de O ₂
		Anaerobias	Se desarrollan en <2% de O ₂
Disponibilidad de agua	Se expresa como actividad de agua (a _w) que es una medida del agua disponible para el microorganismo	Osmófilos	Viven en medios hipertónicos y se subdividen en halófilos y sacarófilos.

Conjunto a la creación de medios de cultivo y al descubrimiento de las condiciones de crecimiento de los microorganismos, se han creado métodos de siembra para cultivar y separar las diversas poblaciones de microorganismos provenientes de las muestras a estudiar. La acción de sembrar (o inocular) implica poner una porción de la muestra (ej. Agua, alimentos, sangre, etc) en un medio de cultivo e incubarlo en condiciones adecuadas. Según sea el medio de cultivo, se pueden emplear instrumentos tales como: asas bacteriológicas, hisopos, pipeta o asa de *Drigalsky*, teniendo en cuenta que todos ellos deben estar estériles a la hora de hacer uso de ellos.

Figura 1 Clasificación de los medios de cultivo.

Clasificación	Estado/ composición/ objetivo	Descripción	
SEGÚN SU ESTADO FÍSICO	- Sólidos:	1.5 a 2.0 % de agar – agar.	
	- Semisólidos:	0.5 % de agar – agar.	
	- Líquidos:	No contienen agar – agar.	
	- Bifásico:	Contiene fase sólida y fase líquida (listos para utilizar).	
SEGÚN SU NATURALEZA O COMPOSICIÓN	- Naturales:	Utilizados para cultivar microorganismos tal y como se encuentran en la naturaleza. Se usan con base a la experiencia y no a su composición. Ej.: Sangre diluida, leche, jugos vegetales, etc.	
	- Sintéticos:	De composición exactamente conocida. Los más utilizados son los medios comerciales deshidratados.	
	- Vivos:	Contienen células u organismos vivos, como las células de riñón de mono o huevos embrionados.	
			Con adición de sangre, suero o extractos de tejidos de animales o plantas al caldo o agar, proporcionando sustancias nutritivas complementarias para el crecimiento de microorganismos exigentes.
SEGÚN SU PROPOSITO	Aislamiento de microorganismos	Medios enriquecidos:	
		Medios selectivos*:	Con adición de algunas sustancias que no permiten el desarrollo de un grupo de microorganismos y sin afectar el desarrollo de los grupos de interés. En principio se pueden seleccionar los microorganismos que se desarrollan en medios orgánicos poco comunes, caso en el cual se omiten otros compuestos de carbono.
		Medios diferenciales*:	Contienen reactivos químicos que traen como resultado, determinado tipo de crecimiento bacteriano después de la incubación (observación de hemólisis, coloraciones de las colonias y otras reacciones indicadoras).
		Medios para identificación:	Para determinar el tipo de crecimiento producido por los microorganismos, así como, la capacidad para producir cambios químicos.

Tomado de Rojas (2011).

En un medio líquido, el método de cultivo es relativamente sencillo, consiste en agregar parte de la muestra al recipiente en donde se encuentra el medio; esa muestra puede agregarse con una pipeta o un asa estéril. Mientras que, para los medios de cultivo sólidos, se han generado diversos métodos (Tabla 2).

Tabla 2 Métodos para el cultivo de microorganismos en medios sólidos

Método	Proceso
Siembra en picadura o punción	<ol style="list-style-type: none"> 1. Esterilizar asa bacteriológica recta y dejar enfriar. 2. Tomar la muestra con el asa estéril. 3. Introducir el asa –con el inóculo- de forma vertical y en el centro del tubo con medio de cultivo. 4. Saque el asa rápidamente y evite tocar las paredes del tubo. 5. Esterilizar asa.
Siembra en estría	<ol style="list-style-type: none"> 1. Esterilizar asa bacteriológica recta y dejar enfriar. 2. Tomar la muestra con el asa estéril. 3. Introducir el asa –con el inóculo- de forma vertical, en el borde inferior del tubo con medio de cultivo inclinado. 4. Sacar, lentamente el asa, e inmediatamente realizar estrías (líneas en zigzag) en la superficie del medio, hasta su borde superior. 5. Esterilizar asa.
Siembra por agotamiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Esterilizar asa bacteriológica curva y dejar enfriar. 2. Tomar la muestra con el asa estéril. 3. Suspender la muestra en un extremo de la caja con medio de cultivo, realizando estrías –no superpuestas- sobre una tercera parte de la caja. 4. Esterilizar asa bacteriológica curva y dejar enfriar. 5. Realizar estrías en dirección perpendicular a las estrías antes hechas, comenzando en la última estría. 6. Repetir el paso 4 y 5. 7. Esterilizar asa.
Siembra en cuadrícula	<ol style="list-style-type: none"> 1. Esterilizar asa bacteriológica curva y dejar enfriar. 2. Poner volumen de muestra en caja con medio de cultivo, usando pipeta automática. 3. Distribuir la muestra con el asa, en forma de línea recta por el centro del medio de cultivo.

Método	Proceso
Siembra con hisopo	4. Hacer estrías de lado a lado del medio de cultivo y en sentido contrario a la línea recta antes hecha.
	5. Girar el medio de cultivo 90°grados y hacer estrías de lado a lado del medio y en sentido contrario a las estrías hechas antes.
	6. Esterilizar asa.
	1. Destapar el hisopo estéril.
	2. Introducir el hisopo en la muestra.
	3. Sacar el hisopo y escurrirlo en las paredes del recipiente dónde está la muestra.
	4. Hacer estrías estrechas de lado a lado de la caja con medio de cultivo, desde el borde superior hasta el borde inferior.
5. Girar el medio de cultivo 90°grados y hacer estrías estrechas de lado a lado del medio y en sentido contrario a las estrías hechas antes.	
6. Repetir el paso 5, tres veces más.	
7. Arrojar el hisopo en Guardián de desechos.	

Hecho esto, posterior a la siembra de microorganismos, se espera obtener crecimiento de microorganismos, el cual tendrá unas características macroscópicas y microscópicas. Con respecto a las características macroscópicas se puede decir que son todos aquellos detalles observables a simple vista en los medios de cultivo sembrados; en medios de cultivo líquidos se puede observar enturbiamiento u opacidad (ligera, media o nula), precipitados o sedimentos (compacto, polvoriento, granuloso, viscoso) o formación de película. En los medios sólidos se pueden observar diversas características de la morfología de las colonias, entre ellas la hemólisis, la producción de pigmentos y las que se exponen en la tabla 3.

Tabla 3 Características macroscópicas de colonias bacterianas en cultivos sólidos.

Características		
Tamaño	Grande	>1mm
	Mediano	1mm
	Pequeño	<1mm
Forma	Puntiforme	

Características	
	Circular 
	Filamentosa 
	Irregular 
	Rizoide 
	Lanceolada 
Borde	Continuo 
	Ondulado 
	Lobulado 
	Espinoso, dentado o lacerado 
	Filamentoso 
	Elevación
Convexa 	
Mamelonada 	
Pulvinada 	
Umbilicada 	

Características	
Superficie	Lisa
	Rugosa
Consistencia	Blanda
	Dura
	Mucoide
Aspecto	Brillante
	Opaco

Modificado de Rojas, 2011.

Objetivos

- Clasificar los diferentes tipos de medios de cultivo que se manejan en el laboratorio de microbiología.
- Practicar los métodos de siembra de microorganismos en diferentes medios de cultivo.

Materiales y reactivos

Materiales que debe llevar al laboratorio

- Elementos de protección personal (bata, guantes, tapabocas, gorro, zapatos cerrados).
- Marcador *Sharpie* negro, toallas de papel absorbente, jabón de manos, fósforos, papel de arroz, láminas y laminillas.

Material que le será proporcionado en el Laboratorio

- Cultivos bacterianos en caldo nutritivo.
- Gradilla.
- Asas bacteriológicas.
- Medios de cultivo (agar *MacConkey*, agar nutritivo y agar nutritivo inclinado, agar *SIM*).
- Balde de desechos

Procedimiento

1. Parta los medios de cultivo, encontrados en las cajas de Petri, a la mitad.
2. Marqué sus medios de cultivo con:

- 
- a. Nombre de la cepa a sembrar (corresponde a las que le entregaran en caldo nutritivo).
 - b. Identificación del grupo.
 - c. Fecha de la siembra.
 3. En la primera mitad, de cada medio de cultivo, siembre por método de agotamiento, la cepa uno.
 4. En la segunda mitad, de cada medio de cultivo, siembre por método de agotamiento, la cepa dos.
 5. En el medio de cultivo inclinado, siembre por estría, la cepa uno.
 6. En el medio de cultivo inclinado, siembre por estría, la cepa dos.
 7. Siembre la cepa uno, en el agar *SIM*, mediante técnica de punción.
 8. Siembre la cepa dos, en el agar *SIM*, mediante técnica de punción.
 9. Coloque los medios de cultivo sembrados en el recipiente correspondiente y llévelos a la incubadora asignada.

Cuestionario y resultados

1. Complete la siguiente tabla con los medios de cultivo empleados.

Nombre del medio de cultivo	Composición	Tipo de medio de cultivo	Utilidad
<p style="text-align: center;">Agar <i>MacConkey</i></p>			

2. ¿En qué condiciones de incubación se colocaron los medios de cultivo sembrados? Explique, brevemente, su respuesta.

3. Reporte en la siguiente tabla, los resultados de las siembras de cada cepa. Escriba no hay crecimiento o hay crecimiento, según lo que usted observa en sus cultivos, y explique –en aquellos cultivos donde no hubo crecimiento- la(s) razón(es) por las cuales se dio este resultado.

Medio de cultivo	Cepa 1	Cepa 2	Explicación
Agar nutritivo			
Agar <i>MacConkey</i>			
Agar <i>SIM</i>			

4. Describa las características macroscópicas de las colonias resultantes de las cepas uno y dos realizados en los medios de cultivo usados.

Medio de cultivo	Agar MacConkey	
Características macroscópicas	Cepa 1	Cepa 2
Tamaño		
Forma		
Borde		
Elevación		
Superficie		
Consistencia		
Aspecto		
Color		
Dibujo		

Medio de cultivo	Agar Nutritivo	
Características macroscópicas	Cepa 1	Cepa 2
Tamaño		
Forma		
Borde		
Elevación		
Superficie		
Consistencia		
Aspecto		

Color		
Dibujo		

5. Describa el resultado obtenido en el agar SIM y su interpretación.

Cepa	Resultado	Interpretación
1		
2		

6. Registre las referencias citadas, usando norma APA

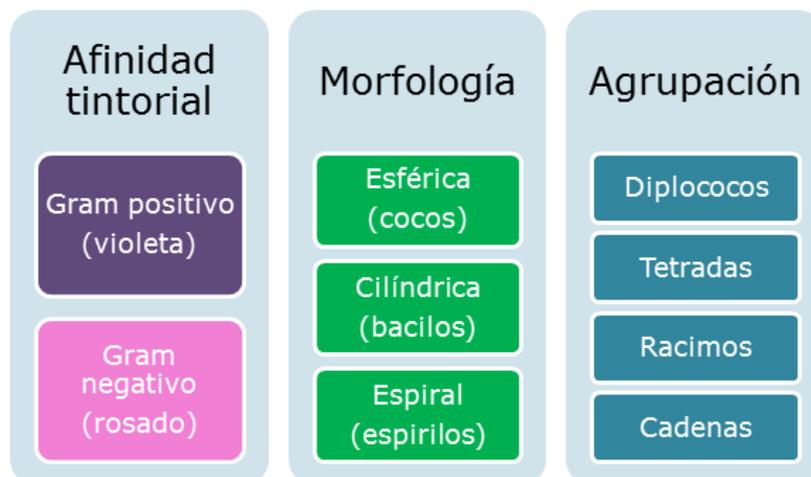
Actividad práctica 2. Caracterización microscópica de cultivos bacterianos: Coloración de *Gram*

Introducción

Dentro de las técnicas de diagnóstico directo en enfermedades infecciosas se emplea frecuentemente el examen microscópico, con el propósito de observar las características microscópicas de los microorganismos de la muestra a estudiar. Dicho examen puede hacerse a través de la realización de una preparación en fresco de la muestra o se puede realizar coloreando la muestra. Dentro de las coloraciones más empleadas en la Microbiología se encuentra la coloración de *Gram*, la cual fue fruto de la curiosidad del médico Danés Hans Christian Joachim Gram, en 1884, cuando este examinaba tejido pulmonar obtenido de un paciente fallecido por neumonía, observando que las bacterias presentes en la muestra tomaban diferentes coloraciones cuando se les colocaban distintos colorantes.

Pero ¿para qué hacer coloración? Los microorganismos no solo son invisibles para el ojo humano, sino que también son semitransparentes; esto hace que su visualización a través del microscopio sea aún más difícil. Por lo anterior, la coloración de *Gram* permite revelar tamaño, forma, agrupación y afinidad tintorial (Figura 1), características que hacen posible la clasificación de microorganismos.

Figura 2 Características microscópicas observables en la coloración de Gram.



Con la coloración de *Gram* se pueden establecer dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias *Gram* positivas se observarán moradas, debido a que retienen el complejo cristal violeta-lugol, a pesar de la exposición a la solución de alcohol-acetona; mientras que las bacterias Gram negativas se observaran rojas, debido a que no retienen el complejo cristal violeta-lugol y por lo tanto dejan el espacio al colorante de contraste: la safranina. Esta diferencia en la afinidad tintorial está dada por la pared celular bacteriana, compuesta de peptidoglicano o mureína, que para las bacterias *Gram* positivas es más gruesa y forma más entrecruzamientos que en las bacterias *Gram* negativas.

En conclusión, esta coloración es un gran aporte al estudio de las enfermedades infecciosas; técnica sencilla, rápida y que aporta información valiosa a la hora de apoyar un diagnóstico, ya que no sólo permite identificar el microorganismo sino que esta puede sugerir antimicrobianos efectivos para tratar el mismo.

Objetivos

- Llevar a cabo la coloración de Gram en las muestras a estudiar.
- Clasificar las bacterias por su afinidad tintorial, su morfología y agrupación.

Materiales y reactivos

Materiales que debe llevar al laboratorio

- Elementos de protección personal (bata, guantes, tapabocas, gorro, zapatos cerrados).
- Marcador *Sharpie* negro, toallas de papel absorbente, jabón de manos, fósforos, papel de arroz, láminas y laminillas.

Material que le será proporcionado en el Laboratorio

- Cultivos bacterianos.
- Asas bacteriológicas.
- Balde de desechos

Procedimiento

Para realizar una preparación a partir de medio de cultivo sólido:

1. Tome una lámina y márquela con los datos de identificación del cultivo.
2. Coloque una pequeña gota de solución salina isotónica en el centro de la lámina.
3. Tome el asa recta y esterilice el asa:
 - a. Encienda el mechero.
 - b. Tomando el asa por el mango, ubíquela verticalmente en la llama del mechero, hasta que esta se encuentre al rojo vivo.
 - c. Retire el asa de la llama y déjela enfriar o enfríela enterrándola en el medio de cultivo.
4. Toque la colonia seleccionada con el asa estéril.
5. Lleve el asa –con la colonia- hasta la gota de solución salina puesta en la lámina y mezcle en círculos distribuyendo la muestra.
6. Deje secar la lámina.
7. Fije la muestra, pasando la lámina por la llama del mechero de 3 a 5 veces.
8. Realice la coloración de *Gram*:
 - a. Agregue a la muestra cristal violeta y déjelo durante 1 minuto.
 - b. Lave el colorante con agua de llave y escurra la lámina.
 - c. Agregue a la muestra lugol y déjelo durante 1 minuto.
 - d. Lave el colorante con agua de llave y escurra la lámina.
 - e. Agregue a la muestra la solución de alcohol-acetona y déjelo durante 30 segundos.
 - f. Lave la solución con agua de llave y escurra la lámina.
 - g. Agregue a la muestra safranina (o fuscina) y déjelo durante 15 segundos.
 - h. Lave la solución con agua de llave y escurra la lámina.
9. Deje secar la lámina completamente.
10. Enfoque la lámina usando el objetivo 100X.
11. Registre sus observaciones.

Para realizar una preparación a partir de medio de cultivo sólido:

1. Tome una lámina y márquela con los datos de identificación del cultivo.
2. Tome el asa curva y esterilice el asa:
 - a. Encienda el mechero.
 - b. Tomando el asa por el mango, ubíquela verticalmente en la llama del mechero, hasta que esta se encuentre al rojo vivo.

- c. Retire el asa de la llama y déjela enfriar o enfríela enterrándola en el medio de cultivo.
3. Sumerja el asa estéril en el medio y saque una gota de medio de cultivo.
4. Coloque la gota del medio de cultivo en el centro de la lámina.
5. Repita los pasos 3 y 4 dos veces más.
6. Deje secar la lámina.
7. Fije la muestra, pasando la lámina por la llama del mechero de 3 a 5 veces.
8. Realice la coloración de Gram:
 - a. Agregue a la muestra cristal violeta y déjelo durante 1 minuto.
 - b. Lave el colorante con agua de llave y escurra la lámina.
 - c. Agregue a la muestra lugol y déjelo durante 1 minuto.
 - d. Lave el colorante con agua de llave y escurra la lámina.
 - e. Agregue a la muestra la solución de alcohol-acetona y déjelo durante 30 segundos.
 - f. Lave la solución con agua de llave y escurra la lámina.
 - g. Agregue a la muestra safranina (o fuscina) y déjelo durante 15 segundos.
 - h. Lave la solución con agua de llave y escurra la lámina.
12. Deje secar la lámina completamente.
13. Enfoque la lámina usando el objetivo 100X.

Cuestionario y resultados

1. ¿Por qué las bacterias *Gram* positivas no se decoloran cuando se les agrega la solución de alcohol-acetona?

2. Según los resultados de su coloración de *Gram*, diligencie la siguiente tabla.

Características microscópicas	Cepa 1	Cepa 2
Morfología		
Afinidad tintorial		
Agrupación		
Dibuje lo que observa		

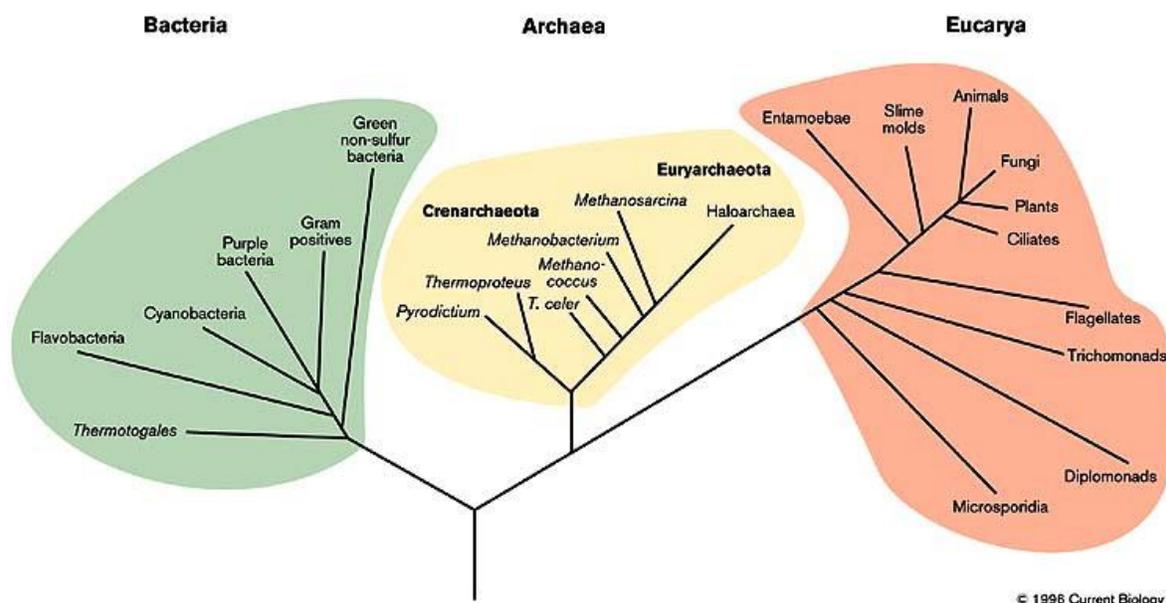
3. Registre las referencias citadas, usando norma APA

Actividad práctica 3. Siembra de Microbiota normal.

Introducción

El árbol filogenético de la vida consta de tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*, siendo un dominio el rango taxonómico más alto de los organismos. Muchos miembros de los dos primeros dominios mencionados viven una vida simbiótica dentro de nosotros.

Figura 3 Árbol filogenético de la vida.



Modificado de Woese, 1996.

El cuerpo humano aloja comunidades microbianas complejas cuya población supera a nuestras propias células en al menos un factor de 10. Con el fin de caracterizar la ecología de las comunidades microbianas asociadas con el hombre, los Institutos Nacionales de Salud lanzaron en 2007 el Proyecto Microbioma Humano y en el 2012 se publicaron los siguientes resultados: 4.788 muestras analizadas de 33 hábitats, tanto femeninos como masculinos, que representaban cinco áreas principales del cuerpo (cavidad oral y orofaringe, piel, fosas nasales, tracto gastrointestinal y vagina) de 242 adultos sanos. Las comunidades encontradas en cada uno de los hábitats del cuerpo poseían una fuerte especialización en su sitio, tanto dentro de este como entre individuos. Así mismo, se observó que, dentro de los hábitats, la variabilidad

interpersonal es alta, mientras que los individuos presentan una variabilidad temporal mínima.

Los análisis de la diversidad taxonómica asociada con la microbiota humana -colección de microorganismos que están presentes en una comunidad de un hábitat corporal definido- se han convertido en tema de gran importancia, ya que estudiar los taxones comúnmente compartidos, en comparación con los menos prevalentes, permite establecer un elemento de base para comparar personas sanas o enfermas.

La microbiología médica moderna se centró en microorganismos patógenos, considerando a la microbiota normal como una población de microbios vasta y desconocida. Sin embargo, esta visión ha ido cambiando, el estudio de esta ha emergido como un importante factor en la fisiología y la enfermedad en humanos.

Las relaciones entre los cerca de 100 trillones de simbioses microbianos y el cuerpo humano nos han facilitado la extracción de energía de los alimentos, proporcionado factores de crecimiento, promovido la diferenciación y función de la mucosa, estimulado el sistema inmune y proporcionado resistencia a la colonización por patógenos. Si la microbiota afecta la fisiología humana, los cambios de su composición pueden alterar la homeostasia del huésped y, por tanto, incrementar el riesgo a enfermar. De hecho, en enfermedades como el asma, la obesidad, la vaginosis bacteriana y la enfermedad inflamatoria intestinal se han encontrado comunidades microbianas alteradas. Lo anterior, también sugiere que se si se conoce la composición de la microbiota normal, se pueden generar intervenciones para su restablecimiento y, por lo tanto, se puede superar la situación de enfermedad.

Objetivo

- Evidenciar la diversidad de microorganismos existentes en las diferentes zonas del cuerpo humano en estado de salud.

Materiales y reactivos

Materiales que debe llevar al laboratorio

- Elementos de protección personal (bata, guantes, tapabocas, gorro, zapatos cerrados).
- Marcador Sharpie negro, toallas de papel absorbente, jabón de manos, fósforos, papel de arroz, lupa, láminas y laminillas.

Material que le será proporcionado en el Laboratorio

- Dos Hisopos o escobillones estériles, para cada estudiante.
- Asas bacteriológicas.
- Medios de cultivo (agar MacConkey, agar nutritivo y agar Sabouraud).
- Tubos con 1ml de solución salina isotónica, para cada estudiante.
- Balde de desechos.

Procedimiento

1. Si es necesario, parta los medios de cultivo, encontrados en las cajas de Petri, a la mitad, de tal manera que cada participante pueda usar una de las mitades.
2. Marqué sus medios de cultivo con:
 - a. Nombre de la zona anatómica a sembrar (Ej. Fosa nasal, conducto auditivo externo, región axilar, región inguinal, región interdigital, etc).
 - b. Nombre del participante.
 - c. Fecha de la siembra.
3. Destape el hisopo estéril y sumérgalo en la solución salina.
4. Escurra el exceso de solución salina del hisopo y frote la zona anatómica seleccionada, girando el hisopo.
5. Con el hisopo, realice estrías superpuestas en un cuarto de cada uno de los medios de cultivo disponibles.
6. Realice siembra de la muestra inoculada en el medio, usando el método de agotamiento.
7. Lleve los medios de cultivo a la incubadora.
8. Registre los resultados obtenidos.

Cuestionario y resultados

1. Averigüe en las referencias sugeridas de la unidad 1, ¿qué géneros de microorganismos pueden encontrarse en las siguientes zonas anatómicas?

Zona	Microorganismos	Morfología y afinidad tintorial
Piel	<i>Staphylococcus spp.</i>	Coco-Gram positivo
Boca		
Tracto respiratorio superior		
Tracto gastrointestinal		
Tracto genital		

2. ¿Para qué se usa el agar Sabouraud? ¿Qué tipo de medio de cultivo es?

3. Reporte en la siguiente tabla, los resultados de las siembras de la muestra. Escriba no hay crecimiento o hay crecimiento, según lo que usted observa en sus cultivos, y explique –en aquellos cultivos donde no hubo crecimiento- la(s) razón(es) por las cuales se pudo haber dado este resultado.

Medio de cultivo	Zona anatómica estudiada:	Explicación
Agar nutritivo		
Agar MacConkey		
Agar Sabouraud		

4. Reporte en la siguiente tabla, el número de colonias con diferentes características macroscópicas encontradas en los cultivos resultantes. Según lo averiguado en el punto 1, ¿este resultado es coherente? Explique, brevemente, su respuesta.

Medio de cultivo	No de colonias con diferente morfología
Agar nutritivo	
Agar <i>MacConkey</i>	
Agar <i>Sabouraud</i>	

5. Seleccione una de las colonias más frecuentemente encontradas en su cultivo y describa las características macroscópicas y microscópicas de esta en los medios de cultivo donde hubo crecimiento.

Características macroscópicas	Medio de cultivo: Agar _____
	Colonia seleccionada
Tamaño	
Forma	
Borde	
Elevación	
Superficie	
Consistencia	
Aspecto	
Color	



Dibujo	
Características microscópicas	Colonia seleccionada
Morfología	
Afinidad tintorial	
Agrupación	

6. Registre las referencias citadas, usando norma APA

Actividad práctica 4. Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos: difusión en disco.

Introducción

Los antimicrobianos son compuestos que hemos empleado para combatir los microorganismos causantes de infecciones. Entre estos se encuentran los antiprotozoarios, los antivirales, los antimicóticos o antifúngicos y los antibacterianos. Pero en este perpetuo combate, algunos microorganismos han desarrollado adaptaciones que los hacen resistentes a la acción de estos compuestos, mientras que otros permanecen siendo sensibles, esta manifestación determinará el efecto terapéutico de un antimicrobiano.

Las pruebas de susceptibilidad a antivirales, antiprotozoarios y antihelminthos son complejas, costosas y no suelen realizarse en el laboratorio clínico; mientras que las pruebas de susceptibilidad a antibacterianos –denominadas también antibiogramas– son las mejor estandarizadas y las más empleadas. Por su parte, las pruebas que se hacen para antimicóticos aún están en estandarización.

A pesar de lo expuesto, las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos tienen por objetivo tratar de predecir el efecto terapéutico de un antimicrobiano y aunque han sido realizadas tanto in-vitro como in-vivo, en los laboratorios clínicos se lleva a cabo la primera modalidad, bajo recomendaciones emitidas por entidades internacionales o nacionales. Sin embargo, estas pruebas in-vitro sólo contemplan el antimicrobiano y el microorganismo, mas no las variables en ser humano (ej. interacción con proteínas, variación de concentración con el tiempo, distribución del antimicrobiano en los tejidos), que es en dónde se da la enfermedad infecciosa.

La susceptibilidad a los antibacterianos esta categorizada en tres grupos: sensible, intermedio, resistente. Una bacteria es sensible si esta es inhibida por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad de éxito terapéutico. Por otro lado, una bacteria es resistente si es inhibida por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad de fracaso terapéutico. Mientras que, en la categoría de susceptibilidad intermedia, se encuentra la bacteria que

es inhibida in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.

Existen diversos métodos para evaluar la susceptibilidad a antibacterianos, pero dentro de los más usados se encuentra el método de *Kirby-Bauer* o difusión en disco. Este consiste en que se siembra el microorganismo en estudio, de manera masiva, en un agar estandarizado y posteriormente se colocan discos de papel impregnados con una concentración dada de antibacteriano, que corresponde a niveles que pueden obtenerse si el antimicrobiano se administra sistémicamente. A medida que los antibacterianos se difunden en el medio van matando el microorganismo en estudio-si este es sensible-, y de esta manera se van generando unas zonas sin crecimiento microbiano, cuyo diámetro se corresponde con la categoría de susceptibilidad del microorganismo.

Objetivos

- Realizar prueba de susceptibilidad a antibacterianos por difusión para microorganismos determinados.
- Interpretar los diámetros de la zona de inhibición para los microorganismos en estudio.

Materiales y reactivos

Materiales que debe llevar al laboratorio

- Elementos de protección personal (bata, guantes, tapabocas, gorro, zapatos cerrados).
- Marcador *Sharpie* negro, regla, toallas de papel absorbente, jabón de manos, fósforos, papel de arroz, lupa, láminas y laminillas.

Material que le será proporcionado en el Laboratorio

- Caldos de cultivo con cepa 1 y Cepa 2.
- Dos Hisopos o escobillones estériles, para un grupo de estudiantes.
- Asas bacteriológicas.
- Pinzas metálicas
- Medios de cultivo (2 cajas de agar *Mueller Hinton* por grupo).

- Dos tubos con 1ml de solución salina isotónica, por grupo.
- Discos con antimicrobianos.
- Balde de desechos.

Procedimiento

1. Marqué sus medios de cultivo con:
 - a. Nombre de la cepa.
 - b. Nombre del grupo.
 - c. Fecha de la siembra
2. Destape un hisopo estéril y sumérgalo en el caldo de cultivo de la cepa 1. Escorra el hisopo en las paredes del tubo antes de sacarlo.
3. Lleve el hisopo con el inóculo a la caja de agar y siembre el medio de cultivo de forma masiva usando el método de cuadrícula.
4. Esterilice la pinza metálica.
5. Coloque los cuatro discos seleccionados con la pinza estéril, de tal manera que estos queden equidistantes entre sí.
6. Repita los pasos 2 a 5 para procesar la cepa 2.
7. Lleve los medios de cultivo a la incubadora.
8. Mida las zonas de inhibición (diámetro) en milímetros, usando una regla.

Cuestionario y resultados

1. Los antibióticos β - lactámicos son los medicamentos más usados, a nivel global, para tratar infecciones bacterianas. ¿Cómo funcionan estos antibacterianos?

2. Usted tiene que seleccionar 4 antibacterianos para hacer la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas 1 y 2. Mencione 3 aspectos que tendría en cuenta para hacer esta selección y explíquelos brevemente y con sus palabras.

Aspectos	Explicación

3. Registre los resultados obtenidos en el siguiente cuadro.

Antibacteriano	Cepa 1		Cepa 2	
	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	Interpretación	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	Interpretación

4. Según los resultados, ¿qué antibacteriano puede usarse para tratar una infección causada por la cepa 1? Explique su respuesta.

5. Según los resultados, ¿qué antibacteriano puede usarse para tratar una infección causada por la cepa 2? Explique su respuesta.

6. Registre las referencias citadas, usando norma APA

--

Actividad práctica 5. Caracterización macroscópica y microscópica de hongos.

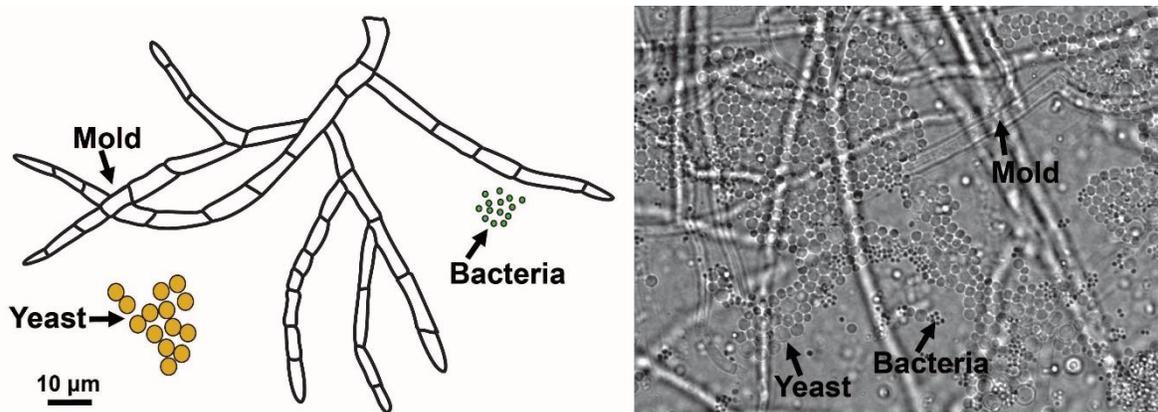
Introducción

Los hongos son organismos conformados por células eucariotas y agrupados dentro del dominio *Eukarya*, siendo diferentes de los protozoos, los animales y las plantas. De estos se han identificado aproximadamente 200.000 especies, y sólo 100 generan infección en el humano. Las infecciones causadas por estos hongos se denominan micosis, es la micología médica quien se encarga de estudiarlas y a los hongos raíz de la cadena causal.

Estos organismos no hacen fotosíntesis, son heterótrofos, saprofitos y pueden llegar a ser parásitos. Adicionalmente, habitan diferentes entornos tales como las mucosas de mamíferos, tierra, superficies abióticas, entre otros. Poseen una pared celular constituida de polisacáridos, que en su mayoría son quitina, mananos y α glucanos.

De acuerdo a sus características morfológicas, los hongos pueden ser macroscópicos (ej. Champiñones) o microscópicos. Los hongos microscópicos pueden presentar dos estructuras fúngicas básicas: las Hifas (filamentos) que son filas de células que crecen apicalmente y cuyo conjunto se denomina micelio; y las levaduras (blastoconidias) que son estructuras ovaladas o esféricas unicelulares.

Figura 4 Diferencias morfológicas y de tamaño entre hongos filamentosos, levaduriformes y bacterias



*Mold (*Filamentos*), Yeast (*levadura*). Tomado de Wolfe (2014).

De acuerdo a lo anterior, desde una perspectiva clínica, los hongos se pueden agrupar en filamentosos y levaduriformes. Sin embargo, hay unas especies de hongos que pueden ser filamentosos en la naturaleza o en el laboratorio (a menos de 30 °C) y, en cambio, presentarse como levaduriformes en los tejidos (a 37 °C). Estos son llamados hongos dimórficos y algunos de ellos son: *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*.

Los cultivos de hongos pueden presentar dentro de sus características macroscópicas, una apariencia cremosa –propia de los hongos levaduriformes-; o apariencias: correosa, aterciopelada, algodonosa, polvorienta y granulosa –propias de hongos filamentosos-.

Objetivo

- Identificar características macroscópicas y microscópicas de los hongos microscópicos.
- Realizar técnica de montaje para la visualización de estructuras fúngicas a partir de un cultivo.

Materiales y reactivos

Materiales que debe llevar al laboratorio

- Elementos de protección personal (bata, guantes, tapabocas, gorro, zapatos cerrados).
- Marcador Sharpie negro, toallas de papel absorbente, jabón de manos, fósforos, papel de arroz, lupa, láminas y laminillas.
- Fruta o verdura o pan con moho en su superficie (uno por cada estudiante).
- Dos jeringas de insulina.

Material que le será proporcionado en el Laboratorio

- Colorante azul de lactofenol.
- Microscopios.
- Balde de desechos.

Procedimiento

1. Marque sus láminas con cada uno de los cultivos fúngicos (fruta, verdura, pan).
2. Coloque una gota de azul de lactofenol en el centro de la lámina.
3. Destape las jeringas de insulina y con una de ellas raspe la zona en donde se encuentra el moho.
4. Ponga el material raspado en la gota de azul de lactofenol y con la punta de la otra jeringa de insulina, corte y extienda la muestra.
5. Retire las jeringas y esterilícelas. NO las tape.
6. Coloque la laminilla encima de la muestra inoculada.
7. Observe la preparación en el microscopio, usando el objetivo de 40X.
8. Registre los resultados.
9. Deseche las láminas y las jeringas en el guardián disponible en el laboratorio.

Cuestionario y resultados

1. ¿Cuáles son los componentes del agar *Sabouraud*? ¿Por qué este agar no se usa para bacterias?

2. Averigüe los componentes del colorante azul de lactofenol y complete el siguiente cuadro:

Componentes	Función

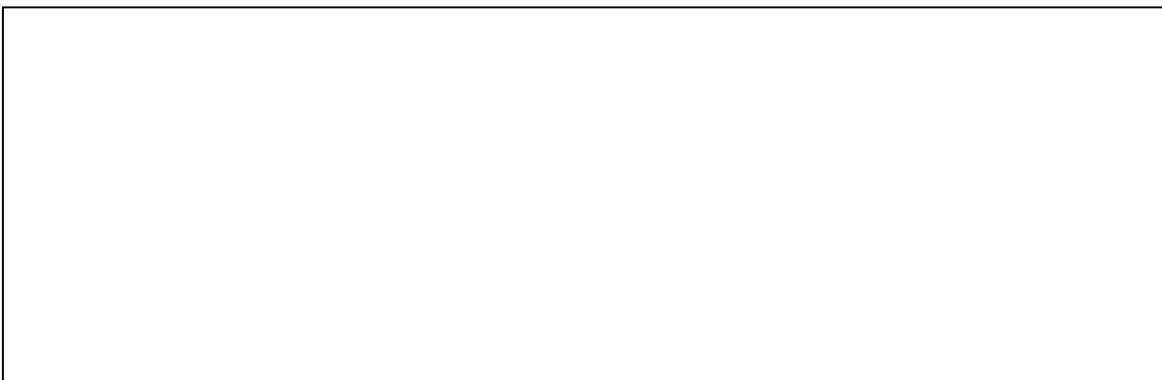
3. De acuerdo al cultivo micótico llevado a la práctica y a las observaciones hechas por cada participante del grupo, completar el siguiente cuadro.

Participante	Cultivo	Características macroscópicas	Características microscópicas
<i>Pedro Pérez</i>	Fruta Descripción		
	Fruta Dibujo		
	Pan Descripción		
	Pan Dibujo		

4. Los hongos filamentosos pueden causar infecciones en humanos ¿Qué condiciones debe tener un ser humano para ser infectado por estos hongos?



5. Registre las referencias citadas, usando norma APA



Actividad práctica 6. Parásitos de importancia en salud.

Introducción

La parasitología es la división de la biología que tiene por objeto de estudio el parasitismo generado por protozoarios, helmintos y artrópodos; siendo el parasitismo la relación simbiótica en la cual un organismo (parásito) vive a expensas de otro (denominado huésped) y le ocasiona daño.

Los protozoarios son organismos eucariotas, unicelulares, que no poseen pared celular, heterótrofos -en su mayoría-, algunos móviles según el aparato de locomoción que posean, con reproducción asexual y sexual. Los helmintos son organismos eucariotas, pluricelulares que conforman gusanos que se pueden clasificar en tres *filum*: platelmintos, nematodos y acantocéfalos; sin embargo, los parásitos de importancia médica se encuentran en los dos primeros *filum* mencionados.

Los platelmintos son gusanos planos de simetría bilateral, que pueden ser de vida libre o endoparásitos, no poseen sistema circulatorio, pero sí un sistema digestivo. Estos gusanos se clasifican en tres clases, siendo las clases Trematoda (duelas) y Cestoda (tenias) en donde se localizan parásitos de humanos y animales. Los nematodos son gusanos cilíndricos, no segmentados que mudan periódicamente su cutícula y se reproducen sexualmente, depositando aproximadamente 200.000 huevos por día. Poseen sistema digestivo completo (boca-ano) y su boca presenta estructuras particulares adaptadas a su estilo de alimentación. Dentro de este grupo se encuentran el oxiuro (*Enterobius vermicularis*), el trichuro (*Trichuris trichiura*), las uncinarias (*Ancylostoma spp.* y *Necator spp.*), lombriz intestinal (*Ascaris lumbricoides*) y la triquina (*Trichinella spiralis*).

Los artrópodos son animales invertebrados cuya característica principal es la presencia de apéndices articulados. Así mismo, poseen simetría bilateral, ojos compuestos, un exoesqueleto conformado por quitina y segmentación variable en donde se pueden encontrar los apéndices articulados; por ejemplo, en insectos se pueden identificar tres segmentos: cabeza, tórax y abdomen. En su mayoría son ovíparos, pero en algunos grupos puede darse la ovoviviparidad y la viviparidad. Estos animales se dividen en cuatro grupos: Quelicerados (arañas, ácaros), Crustáceos, Hexápodos (insectos: moscas, mosquitos, pulgas, piojos), Miriápodos (ciempiés y milpiés). Su importancia radica en que estos

pueden causar patologías directas (parasitosis, reacciones alérgicas) o patologías indirectas, debido a que pueden actuar como vectores o huéspedes intermediarios de microorganismos patógenos.

Finalmente, para que los protozoarios, helmintos y artrópodos lleguen a ser parásitos tienen que existir ciertas condiciones tanto del parásito como del huésped, entre ellas se encuentra la cantidad de parásitos inoculados, factores de virulencia, fase del parásito y la susceptibilidad del huésped.

Objetivo

- Observar parásitos causantes de enfermedades de importancia en salud pública.

Materiales y reactivos

Materiales que debe llevar al laboratorio

- Elementos de protección personal (bata, guantes, tapabocas, gorro, zapatos cerrados).
- Toallas de papel absorbente, jabón de manos, papel de arroz.

Material que le será proporcionado en el Laboratorio

- Microscopio.
- Estereomicroscopio.
- Láminas demostrativas.
- Balde de desechos.

Procedimiento

1. El tutor que lo acompaña en el laboratorio, enfocará las láminas demostrativas disponibles en los microscopios.
2. Después de que las láminas han sido enfocadas, no mueva la platina del microscopio.
3. Para enfocar los objetos a observar, use el tornillo micrométrico del microscopio.
4. Escriba sus resultados.

Cuestionario y resultados

1. ¿Qué son las geohelmintiasis? Mencione 5 medidas preventivas para estas parasitosis.

2. ¿Qué es miasis?

3. Observe las láminas demostrativas disponibles y complete:

Nombre del organismo	Dibujo del organismo o estructura	Tipo de parasito (protozoario, helminto, artrópodo)	Características observadas para su tipificación	Patología con la que se relaciona

Nombre del organismo	Dibujo del organismo o estructura	Tipo de parásito (protozooario, helminto, artrópodo)	Características observadas para su tipificación	Patología con la que se relaciona

4. De acuerdo a lo observado, ¿qué características hacen que los parásitos sean exitosos infectando poblaciones? Explique, brevemente, su respuesta.



6. Registre las referencias citadas, usando norma APA



Referencias

- Becerril, M. (2014). Parasitología médica. (4a. ed.) McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 2. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2053/?il=416>
- Bonifaz, A. (2012). Micología médica básica. (4a. ed.) McGraw-Hill Interamericana. Página 23. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2053/?il=417>
- Brooks, G. (2011). Microbiología médica. (25a. ed.) McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 5. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2053/?il=486>
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Med*, 8(1), 51. doi:10.1186/s13073-016-0307-y. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848870/>
- Manual de prácticas de laboratorio de microbiología I y II: diversidad y estructura de los microorganismos. (2009). México, D.F., MX: Universidad Autónoma de Guerrero. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2077/lib/unadsp/detail.action?docID=10287166&p00=manual+pr%C3%A1cticas+laboratorio+microbiolog%C3%ADa>
- Mendoza, Z. R. (2010). Antimicrobianos 2002. México, D.F., MX: Instituto Politécnico Nacional. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2077/lib/unadsp/detail.action?docID=10365809&p00=antimicrobianos+2002>
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2004). Microbiología. México, D.F., MX: McGraw-Hill Interamericana. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2077/lib/unadsp/detail.action?docID=10515235&p00=prescott>
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., Demo, M. (2015). Manual de microbiología general (Primera). Río cuarto: UniRío. Recuperado de <https://openlibra.com/es/book/download/manual-de-microbiologia-general>
- Rodríguez, P. E. G. (2013). Parasitología médica. México, D.F., MX: Editorial El Manual Moderno. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2077/lib/unadsp/detail.action?docID=10853474>
- Rojas Triviño, Alberto. (2011). Conceptos y práctica de Microbiología general. Manual. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Recuperado de:

<http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>

Santiago, Axel Rodolfo. (2003). Hans Christian Joachim Gram. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(2), 200-201. Recuperado en 22 de junio de 2017, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000200020&lng=es&tlng=es.

Woese, C. R. (1996). Whither microbiology? Phylogenetic trees. *Curr Biol*, 6(9), 1060-1063. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982202706647>

Wolfe, B. (2014, Julio 24). Techniques: Using a microscope to explore fermented foods. Recuperado de <http://microbialfoods.org/using-microscopy-to-monitor-artisan-fermentations/>