



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA RAFAEL NÚÑEZ

PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA III Semestre

DILIA ESTHER APARICIO MARENCO

Microbióloga MSc en Microbiología

DIANA YANET DUARTE AMADOR

Bacterióloga Esp. en Bacteriología Clínica

ROSA BALDIRIS ÁVILA

Química Farmaceuta. MSc Microbiología en ciencias básicas
biomédicas. PhD en Ciencias biomédicas.

Facultad de Ciencias de la Salud Programa de Medicina





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Director programa de Medicina

Heliana Padilla Santos

Mónica Rocha Carrascal

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Indira Llanos González

Dilia Aparicio Marengo

Diana Duarte Amador

Revisión y corrección de estilo

Raúl Padrón Villafañe

Autoras

Dilia Esther Aparicio Marengo

Diana Yanet Duarte Amador

Rosa Baldiris Ávila



CONTENIDO

PRESENTACIÓN.....	5
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.....	6
PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE.....	11
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES.....	12
MÓDULO PRÁCTICO DE VIROLOGÍA	
PRÁCTICA N° 1 TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO VIRAL EN EL LABORATORIO CLÍNICO.....	13
PRÁCTICA N° 2 DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS FRENTE A VIRUS DEL HERPES TIPO 1.....	17
PRÁCTICA N° 3 DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS FRENTE A VIRUS DEL DENGUE.....	24
PRÁCTICA N° 4 DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS FRENTE A VIRUS DEL VIH TIPO 1 Y 2.....	30
MÓDULO PRÁCTICO DE BACTERIOLOGÍA	
PRÁCTICA N° 1 TINCIÓN DE GRAM.....	37
PRÁCTICA N° 2 CULTIVO DE BACTERIAS A PARTIR DE UN FROTIS FARÍNGEO.....	41
PRÁCTICA N° 3 IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS (PRUEBAS BIOQUÍMICAS).....	50
PRÁCTICA N° 4 ANTIBIOGRAMA.....	56
MÓDULO PRÁCTICO DE PARASITOLOGÍA	
PRÁCTICA N°1 EXAMEN DE LAS HECES.....	62
PRÁCTICA N°2 IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS. FROTIS Y GOTA GRUESA. OBSERVACIÓN DE PROTOZOARIOS TISULARES.....	71
PRÁCTICA N°3 DETERMINACIÓN DE PARÁSITOS POR TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS. DETERMINACIÓN DE CHAGAS AB: KIT COMERCIAL INMUNOCOMB II.....	79



PRÁCTICA N°4 ESTUDIO DE PARÁSITOS POR TÉCNICAS MOLECULARES.....	85
---	----

MÓDULO PRÁCTICO DE MICOLOGÍA

PRÁCTICA N°1 TÉCNICAS Y MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA.....	90
PRÁCTICA N°2 HONGOS DEL AMBIENTE.....	98
PRÁCTICA N°3 MICOSIS SUPERFICIALES.....	101
PRÁCTICA N°4 MICOSIS PROFUNDAS.....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	115



PRESENTACIÓN

La microbiología constituye una rama especializada de la biología que estudia los microorganismos: hongos, parásitos, bacterias, virus. Con el desarrollo de esta ciencia ha sido posible conocer, controlar y prevenir las enfermedades infecciosas.

A través de la historia muchos científicos han hecho sus aportes en esta disciplina como Girolamo Fracastoro quien en su obra “*De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione*” plasmó sus planteamientos sobre la etiología y los mecanismos de transmisión de los procesos infecciosos, por su parte Anton van Leeuwenhoek en 1673 con sus hallazgos demostraría la existencia de los microorganismos, quien los denominó ‘*animaculas*’, posteriormente Louis Pasteur en 1876 hizo sus aportes en cuanto a la etiología específica de los procesos infecciosos los cuales fueron apoyados por Robert Koch quien con sus postulados, demostró el papel etiológico de un determinado microorganismo en una enfermedad infecciosa.

Los microorganismos patógenos son una amenaza para la integridad de los seres humanos, por lo que es necesario el diagnóstico oportuno de las patologías de origen microbiano para la orientación de un adecuado tratamiento.

La presente guía involucra varias prácticas diseñadas para que el estudiante integre los conocimientos adquiridos en las sesiones teóricas, a través del desarrollo de técnicas y procedimientos con finalidades diagnósticas las cuales constituyen herramientas importantes en la práctica clínica.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Conjunto de medidas preventivas, destinadas a mantener el control de factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos, logrando la prevención de impactos nocivos, asegurando que el desarrollo o producto final de dichos procedimientos no atenten contra la salud y seguridad de trabajadores de la salud, visitantes y el medio ambiente.

- NO fumar dentro del laboratorio.
- No consumir bebidas o alimentos dentro del área de trabajo del laboratorio.
- Usar bata limpia y abotonada, zapatos cerrados.
- Lavarse las manos antes y después del contacto con un paciente, después de manipular muestras y luego de quitarse los guantes.
- Una vez colocados los guantes no toque superficies ni objetos de uso común del laboratorio tales como: sillas, teléfono, libros, equipos, cerraduras, lapiceros, etc. con el fin de no contaminarlas.
- Asegúrese de que su sitio de trabajo tenga buena iluminación, ventilación suficiente espacio y buena disposición de las mesas de trabajo.
- Gasas, algodones o papeles que hayan estado en contacto con muestras de pacientes deben ser descartados en bolsas rojas.
- En ninguna circunstancia esta aceptado pipetear con la boca, por lo tanto deben emplearse siempre procedimientos mecánicos para el pipeteado de todos los líquidos en el laboratorio.
- No abrir las canecas con las manos, utilice los pedales.
- Las pipetas de Pasteur y pipetas de vidrio deben descartarse en recipientes con hipoclorito de sodio al 5%.
- Los tubos de ensayo con líquido no deben calentarse por el fondo, sino por la parte superior del líquido, estar inclinado y no apuntar hacia el operador.
- En caso de que una sustancia corrosiva se ponga en contacto con la piel o los ojos, enjuagar con abundante agua.



- Para percibir un olor no es necesario poner el rostro encima de la sustancia; basta con agitar un poco con la mano, el aire circundante para que el olor llegue con la mano.
- Los reactivos, una vez sacados de sus frascos, no deben ser devueltos a ellos. Sacar muestras apenas en la cantidad necesaria.

SISTEMA DE PRECAUCIONES UNIVERSALES

Este sistema fue establecido, por el centro de enfermedades (CDC) de Atlanta en 1987, en el cual se recomendó que todas las instituciones de salud adoptaran una política de control de la infección, que se denominaron “*políticas universales*”.

Es un conjunto de técnicas y procedimientos destinados a proteger al personal que conforma el equipo de salud de la posible infección con ciertos agentes, principalmente:

- Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).
- Virus de la Hepatitis B.
- Virus de la hepatitis C.
- Tuberculosis.
- Endoparásitos.
- Ectoparásitos.

Durante las actividades de atención a pacientes o durante el trabajo con fluidos o tejidos corporales.

Los líquidos que se consideran como potencialmente infectantes son:

- Sangre.
- Semen.
- Secreción vaginal.
- Leche materna.



- Líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido pleural, líquido amniótico, líquido peritoneal, líquido pericárdico, cualquier otro líquido contaminado con sangre.

ELEMENTOS DE PROTECCIÓN

Están diseñados para proteger a las personas de un área específica donde se trabaja con sustancias o residuos peligrosos, evitando que quien está manipulando la sustancia tenga contacto directo con ella.

- Bata

Deberán ser preferiblemente de mangas largas e impermeables. Estas deberán cambiarse cuando halla contaminación visible con fluidos corporales durante procedimientos o al final de los mismos

- Guantes

- Contacto directo con sangre y otros fluidos corporales considerados de Precaución Universal.
- Punciones venosas.
- Contacto con piel (lesiones, membranas mucosas).
- Manipulación de reactivos.
- Preparación de medios de cultivo.
- Eliminación de materiales de desecho.
- Una vez colocados los guantes, no tocar superficies ni áreas corporales, con el propósito de no contaminarlas.
- Los guantes deben ser cambiados entre pacientes, puesto que una vez utilizados, se convierten en una fuente de contaminación externa y ambiental.



- Al presentarse ruptura o punción de los guantes estos deben ser cambiados.
- Es importante usar los guantes de la talla adecuada, dado que el uso de guantes estrechos o laxos favorece la ruptura y accidentes laborales.

- **Mascarilla**

Con esta medida se previene la exposición de las membranas mucosas de la boca, la nariz y los ojos, a líquidos potencialmente infectados.

Se indican en:

- Procedimientos donde se manipulen sangre o líquidos corporales.
- Cuando exista la posibilidad de salpicaduras (aerosoles) o expulsión de líquidos contaminados con sangre.

- **Gorro**

El cabello facilita la retención y posterior dispersión de microorganismos que flotan en el aire de los hospitales, laboratorios y otras entidades de salud por lo que se considera como fuente de infección y vehículo de transmisión de microorganismos.

- **Guardianes**

Durante la manipulación, limpieza y desecho de elementos cortopunzantes (agujas, bisturís, lancetas u otros), se deberán tomar rigurosas precauciones para prevenir accidentes laborales.

- **Canecas**

Son utilizadas para descartar residuos sólidos, es necesario adoptar una codificación de colores de acuerdo al tipo y grado de peligrosidad del residuo que se esté manejando para hacer una eficiente disposición de los desechos.



La OMS ha normatizado un código de colores para la selección, disposición, almacenamiento y disposición final de desechos, el cual es universalmente reconocido.

Normas internacionales para la eliminación de basuras por medio de bolsas de colores

- COLOR VERDE: Desechos ordinarios no reciclables.
- COLOR ROJO: Desechos que implican riesgo biológico.
- COLOR NEGRO: Desechos anatomopatológicos.
- COLOR NARANJA: Depósitos de plástico.
- COLOR BLANCO: Depósitos de vidrio.
- COLOR GRIS: Papel, cartón y similares.

LAVADO DE LAS MANOS

Se realiza con el fin de reducir la flora normal y remover la flora transitoria para disminuir la diseminación de microorganismos infecciosos. Se debe realizar en los siguientes casos:

- Antes de iniciar las labores.
- Antes y después de atender pacientes.
- Antes y después de manipular heridas.
- Después de estar en contacto con líquidos de precaución universal.
- Después de manipular objetos contaminados.
- Antes de colocarse guantes e inmediatamente después de retirarlos.
- Al finalizar labores.



Plan de Trabajo del Estudiante

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se va a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarios para la ejecución de la misma.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también de sus propias observaciones, investigación y deducciones.
3. Asegúrese de contar con sus elementos de protección completos y que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
4. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
5. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas, tubos, cajas de y/o cultivos.
6. Tome todas las precauciones necesarias (evite contacto con ojos, boca y el resto del cuerpo) al momento de trabajar con microorganismos. Recuerde que los microorganismos con los que va a trabajar son patógenos.
7. Practique varias veces el procedimiento y en caso de dudas pregunte a su docente. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
9. Al terminar, limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los medios usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
11. Limpie el microscopio antes y al final de la práctica. Recuerde que este equipo es fundamental para su trabajo. ¡¡¡¡¡Cúidelo!!!!!!.
12. Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad.
13. Desarrolle las preguntas que aparecen después de cada práctica.



Materiales para todas las clases

Tenga en cuenta que para todas las prácticas debe traer sus elementos de bioseguridad completos, y las muestras que se solicitan en la guía para el desarrollo de las actividades en el laboratorio.



MÓDULO PRÁCTICO DE VIROLOGÍA
PRÁCTICA N° 1.
TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO VIRAL EN
EL LABORATORIO CLÍNICO

I. INTRODUCCIÓN

Conocer cuando una infección es de etiología viral es muy importante porque determina un cambio en la conducta clínica y en el manejo terapéutico del paciente. El diagnóstico viral por el laboratorio es de gran ayuda para confirmar la etiología, así como para el seguimiento clínico de la entidad, considerando que las patologías producidas por agentes virales son de alta frecuencia tanto en la consulta pediátrica como de adultos. En la mayoría de los casos, el diagnóstico etiológico se sospecha basado en los síntomas y signos del paciente y no se requiere confirmación por laboratorio. Sin embargo, en la actualidad también nos vemos enfrentados a la complejidad de pacientes graves en unidades de cuidados intensivos, a pacientes oncológicos, trasplantados e inmunosuprimidos, quienes presentan cada vez mejores expectativas de éxito en sus tratamientos. En ellos, el oportuno y correcto diagnóstico etiológico y la monitorización de las infecciones virales -entre otras- se hacen necesarios, especialmente en los casos para los que disponemos de tratamiento antiviral específico como anteriormente fue mencionado.

Adicionalmente, realizar un diagnóstico adecuado permite conocer la epidemiología de la infección viral y determinar las connotaciones que implica a nivel de salud pública; tal es el caso de infecciones como el dengue y la fiebre amarilla. Por las características estructurales, ecológicas y biológicas de los virus, su demostración in vitro es y será uno de los mayores retos a los que se



enfrentan los científicos. Al igual que la mayoría de los microorganismos, los virus se pueden descubrir ya sea de una forma directa o indirecta. Las pruebas directas son las que evidencian al virus o algunos de los antígenos virales que se pueden encontrar presentes en los tejidos o fluidos humanos. Las pruebas indirectas son las que se utilizan con más frecuencia y básicamente demuestran un contacto del huésped con el agente viral mediante la determinación de anticuerpos específicos contra el virus. En muchos casos, el diagnóstico de infección viral se hace por el cuadro clínico del paciente y la presencia de anticuerpos contra el agente viral sospechoso; sin embargo, hay algunas técnicas rápidas para demostrar los antígenos virales y también se sabe de técnicas para amplificar su material genético.

No obstante la variedad de pruebas diagnósticas que se han desarrollado, es necesario tener en cuenta que para un óptimo diagnóstico de las entidades virales, debe haber una adecuada indicación, recolección y transporte de las muestras.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las diferentes técnicas directas e indirectas que posibilitan el diagnóstico viral en muestras clínicas

Objetivos específicos

- Reconocer el tipo de muestra utilizadas para el diagnóstico viral y tiempos adecuados para obtención de la misma.
- Identificar las técnicas más utilizadas para el diagnóstico viral diagnósticas
- Diferenciar entre técnicas directas e indirectas.
- Reconocer el fundamento de cada una de las técnicas estudiadas.
- Identificar las técnicas de elección acorde a la etiología viral.



III. FUNDAMENTO

El diagnóstico viral por el laboratorio es de gran ayuda para reconocimiento y confirmación de la etiología, así como para el seguimiento clínico de la entidad, considerando que las patologías producidas por agentes virales son de alta frecuencia tanto en la consulta pediátrica como de adultos.

IV. PROCEDIMIENTO

Los estudiantes se deben reunir en grupo acorde a lo establecido por el docente. Luego de la conformación, leerán e interpretarán los siguientes artículos para responder los interrogantes relacionados en el ítem Taller de preguntas:

- El diagnóstico viral por el laboratorio. Publicado por Crespo en la revista Colombia Médica 2000; 31: 135-150.
- Laboratorio de virología en la práctica clínica. Publicado por Tapia en la revista Revista Médica Clínica Las Condes 2015; 26(6): 744-752.

V. TALLER DE PREGUNTAS

Se relacionan seguidamente las preguntas a resolver:

1. ¿Qué determina un adecuado aislamiento viral?
2. ¿Cuáles son las condiciones para la toma de muestra?
3. ¿Qué factores adicionales se deben tener en cuenta para garantizar la conservación de las partículas virales activas?
4. ¿Qué precauciones se deben tener luego de la toma de la muestra para su conservación?
5. ¿Qué medio de transporte permite una mayor recuperación de partículas virales?
6. ¿Cómo se clasifican las técnicas directas y que permiten evidenciar o demostrar?
7. ¿Qué tipos de tinciones se utilizan para la microscopia de luz y electrónica?
8. ¿Cuáles son los sistemas de cultivos más utilizados?
9. ¿Qué técnicas permiten evidenciar el virus cuando aún no se ha dado el efecto citopático?



10. Indique el fundamento de cada una de las pruebas para la demostración directa de antígenos virales
11. ¿Cuáles son las dos categorías en las que se clasifican las técnicas de diagnóstico viral y cuál es su fundamento?
12. ¿Cuáles son las categorías o grupos en los que se clasifican las técnicas indirectas para la identificación viral?
13. Realice un cuadro comparativo entre técnicas indirectas tipo *a* y *b*.
14. Indique, acorde a los cuadros infecciosos más frecuentes en la práctica clínica, el tipo de muestra a solicitar, virus a identificar y técnica sugerida para la detección.

PRÁCTICA N°2
DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS FRENTE A
VIRUS DEL HERPES TIPO 1



I. INTRODUCCIÓN

La familia *Herpesviridae* comprende una serie de virus con DNA cuya característica biológica más notable es su capacidad de producir latencia. Tras la infección primaria, sintomática o no, el virus permanecerá latente en diversos tipos celulares o tejidos que les son propios a cada miembro de la familia. Serológicamente se diferencian en dos tipos, los cuales comparten cerca de 50% de homología genética.

La infección por el virus del herpes simple es muy contagiosa frecuente y endémica en todo el mundo. Es ocasionada por el herpes simple de tipo 1 (VHS-1) o al virus del herpes simple de tipo 2 (VHS-2), principal agente de úlcera genital en el mundo. El VHS-1 se transmite principalmente por contacto de boca a boca y causa infecciones en la boca o a su alrededor (herpes bucal, herpes labial o bucofacial) Se adquiere mayoritariamente durante la infancia y dura toda la vida. El VHS-2 se transmite casi exclusivamente por vía sexual y provoca infecciones en la zona genital o anal (herpes genital). No obstante, el VHS-1 también puede transmitirse a la zona genital por contacto bucogenital, lo que provoca el herpes genital. Sin embargo, el mayor riesgo de transmisión se da cuando hay úlceras activas.

La infección por herpes labial suele ser asintomática y la mayoría de las personas infectadas por VHS-1 no saben que lo están. Entre los síntomas del herpes labial cabe citar las dolorosas vesículas o úlceras en la boca o a su alrededor. Las úlceras de los labios se denominan habitualmente «calenturas» o «pupas labiales». Antes de la aparición de las úlceras, las personas infectadas suelen notar una sensación de hormigueo, picor o quemazón en esa zona. Tras la primera infección, las vesículas o úlceras pueden reaparecer periódicamente. La frecuencia de las recidivas varía de una persona a otra.

Por otra parte, es poco probable que las personas que ya presentan infección de herpes labial por VHS-1 se infecten con ese mismo virus en la zona genital. Y aunque es más bien raro, la infección por VHS-1 puede transmitirse de la madre infectada al recién nacido durante el parto.



Los estudios epidemiológicos demuestran que todos los virus de la familia *Herpesviridae* son extraordinariamente ubicuos y están ampliamente extendidos en la población general. Una sustancial proporción de adultos presentarán anticuerpos, reflejo de una primoinfección en una etapa previa de su vida y manifestación de la infección latente. Esto condicionará el diagnóstico serológico y la interpretación de los resultados de otras pruebas diagnósticas de laboratorio.

En contraste con la gran prevalencia en la población general, la mayor parte de las infecciones, sean del tipo que sean, son asintomáticas. Cuando lo son, oscilan clínicamente desde las benignas a las que cursan con grave compromiso de la salud o la vida del paciente. Serán estas últimas, y no las primeras, las que motivarán el interés principal del diagnóstico de laboratorio, máxime teniendo en cuenta la inespecificidad de los signos y síntomas clínicos que se presentan.

En los últimos años se ha producido una serie de circunstancias que aconsejan la recopilación y análisis crítico de las técnicas diagnósticas, a saber:

El impacto que las nuevas tecnologías han tenido sobre las pruebas de laboratorio, o que se prevé tendrán en un futuro próximo. Es el caso de la disponibilidad de anticuerpos monoclonales que simplifican y generalizan el diagnóstico [herpes simple (VHS), citomegalovirus (CMV), varicelazoster (VVZ)] o ayudan en la interpretación de resultados (CMV). También, claro está, el efecto citopático que se produce en 1-3 días, tras lo cual el virus es identificado por tinción con anticuerpos fluorescentes de las células infectadas o detectando glicoproteínas del virus mediante inmunoanálisis enzimático sobre fase sólida (ELISA). Un diagnóstico rápido a partir de las lesiones cutáneas se puede realizar usando la prueba de Tzanck, en la que las células de la base de la vesícula se tiñen con el colorante de Giemsa. Y así mismo, la importancia de las técnicas de biología molecular, muy particularmente la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



Por otra parte, las pruebas serológicas, como la prueba de neutralización, pueden usarse en el diagnóstico de las infecciones primarias porque se observa fácilmente un aumento significativo en el título de anticuerpos. Sin embargo, no son útiles en las infecciones recurrentes, ya que muchos adultos ya presentan anticuerpos circulantes y las recurrencias raramente causan un aumento en el título de anticuerpos.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Reconocer en las técnicas diagnósticas virales la importancia de las pruebas cualitativas indirectas para la detección del virus del Herpes tipo 1 en muestras biológicas.

Objetivos específicos

- Identificar por pruebas serológicas tipo ELISA la presencia de anticuerpos tipo IgG Anti-Herpes Simplex tipo 1.
- Reconocer el tipo de muestra biológica indicada para la detección del Virus del Herpes Simplex tipo 1.

III. MÉTODO

Se realizara la prueba ELISA para la detección de anticuerpos IgM Anti-Herpes Simplex en suero humano.

IV. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La prueba ELISA HSV 1 IgG está basada en la técnica ELISA. Donde Los micropocillos ELISA están recubiertos con antígenos de virus de Herpes Simplex Tipo 1 (HSV1-Ag) obtenidos de cultivos celulares. En la primera incubación, los anticuerpos IgG (anti-HSV-IgG-Ac) contra el virus de Herpes Simplex Tipo 1 contenidos en la prueba o el control se fijan a los antígenos inmovilizados. Al final de la incubación, los componentes excesivos son eliminados por lavado.



En la segunda etapa de incubación, se añade un conjugado anti-IgG (anticuerpos anti-IgG-humana, marcados con peroxidasa) que se fija específicamente a los anticuerpos IgG. Se forman inmunocomplejos típicos. Después de eliminar el conjugado excesivo por lavado (segunda etapa de lavado) y añadir TMB/Substrato (etapa 3), se forma un color azul que se transforma a amarillo después de parar la reacción. La intensidad de este color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-Herpes Simplex IgG en la muestra.

La extinción de los controles y muestras se determina haciendo uso de un lector de micropocillos ELISA. Los resultados de los pacientes se obtienen por comparación con un valor de punto de corte (cur off value) o por expresión en unidades HUMAN por ml basándose en el control positivo.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Micro pipetas.
- Puntas esterilizadas.
- Papel absorbente.
- Jarra para descartar material utilizado.
- Kit ELISA para la detección de anticuerpos IgG Anti-Herpes Simplex 1 el cual contiene:
 - Micropocillos (MIC).
 - Control positivo (CP) y control negativo (CN).
 - Buffer de dilución IgG (DIL M) para diluir la muestra 1/100.
 - Conjugado antígeno IgG (CON).
 - Solución de lavado (WASH).
 - Reactivo sustrato (SUB).
 - Solución de parada (STOP).
 - Cintas adhesivas.



VI. MUESTRA

Se suministra una muestra de suero. No deben usarse muestras hemolíticas o altamente lipémicas. Las muestras pueden almacenarse hasta por 7 días de 2...8°C o por largo tiempo a -20°C. Congelar y descongelar solamente una vez, al descongelar homogeneizar. Eliminando material particulado por centrifugación o filtración.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Diluir el suero del paciente 1+100 con DIL (10 µl de suero + ml de DIL y mezclar vigorosamente. Las muestras diluidas se pueden almacenar hasta 48 horas entre 2-8°C)
2. Adicionar 100 µl de muestra en el primer pocillo, 100ul de CP en el segundo y la misma cantidad de CN en el tercer pocillo. Cubrir con cinta e incubar por 30 min a 17 - 25°C.
3. Lavar 4 veces con WASH adicionando por cada lavada 350µl de la solución de lavado en cada uno de los pocillos.
4. Adicionar 100µl de CON en cada pocillo iniciando por la muestra y terminando en CN, cubrir con cinta e incubar por 30min a 17 - 25°C.
5. Lavar 5 veces con WASH adicionando por cada lavada 350µl de la solución en cada uno de los pocillos.
6. Agregar 100µl de sustrato por pocillo, colocar la cinta adhesiva e incubar por 15 minutos a 17 - 25°C.
7. Pasado este tiempo quitar la cinta y adicionar por pocillo 100µl de STOP.
8. Evidenciar la formación de color.

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.



Después de los lavados es necesario remover el líquido remanente invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

En caso de medir la absorbancia, esto debe hacerse a 450nm máximo 30min después de realizada la prueba.

El punto de corte o valor cut-off COV se calcula usando la fórmula:

$$\text{COV} = \text{MNC} + 0,1 \times \text{MPC}$$

Interpretación de resultados: La formación de color amarillo en los pocillos indica positividad de la muestra.

La intensidad de color amarillo es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos.

Los resultados cuantificados se interpretan de la siguiente manera:

$A_{450}(\text{paciente}) \geq \text{COV} + 15\%$: anti-VHS 1-IgG-Ac-positivo

$A_{450}(\text{paciente}) > \text{COV} + 15\%$: anti-VHS 1-IgG-Ac-negativo

Los serotipos VHS 1 y 2 muestran alta reactividad cruzada. Infecciones con tipo 1 pueden producir también un título alto de Anticuerpos contra el serotipo heterólogo.

Resultados positivos para VHS1 IgG, no implican necesariamente exposición o infección con VHS1 y viceversa.

La mayor concentración de anticuerpos, expresada en HU/ml, indica el tipo de anticuerpo predominante en suero del paciente



$$\text{HU/ml} = \frac{A_{450} (\text{paciente})}{\text{MPC}} \times 100$$

Pueden encontrarse resultados positivos por reactivación de infecciones latentes con otros virus relacionados con la familia *Herpesviridae*.

VIII. TALLER DE PREGUNTAS:

1. Indique qué tipo de resultado obtuvo de acuerdo a la formación de color.
2. Indique el tipo de técnica.
3. Realice un esquema basado en el fundamento de la prueba.
4. Compare sus resultados con el de sus compañeros
5. ¿Qué otras pruebas se utilizan para el diagnóstico de herpes simple y cuál es su fundamento?



PRÁCTICA N°3. DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS FRENTE A VIRUS DEL DENGUE

I. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral febril aguda transmitida por la picadura de mosquitos infectados principalmente de la especie *Aedes Aegypti* y, en menor grado, de *Ae. albopictus*. Se conocen cuatro serotipos distintos, pero estrechamente emparentados, del virus: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. Cuando una persona se recupera de la infección adquiere inmunidad de por vida contra el serotipo en particular. Sin embargo, la inmunidad cruzada a los otros serotipos es parcial y temporal. Las infecciones posteriores causadas por otros serotipos aumentan el riesgo de padecer el dengue grave.

Se reconoce un espectro de manifestaciones de la enfermedad que va desde procesos asintomáticos hasta cuadros severos; es así como a partir de 2009, la OMS clasifica el dengue según la complejidad del caso en dengue sin signos de alarma (grupo A), dengue con signos de alarma (grupo B), y dengue grave (grupo C); donde se encuentra incluido el síndrome de choque por dengue (SCD) y otras complicaciones, tales como; miocarditis, encefalitis, hepatitis que han sido asociadas a letalidad por dengue grave.

A continuación, se incluyen manifestaciones clínicas de acuerdo a la gravedad de la enfermedad:

- **Dengue:** las características clínicas dependen a menudo de la edad del paciente. Los niños mayores y los adultos pueden tener una enfermedad febril sin signos de alarma. La enfermedad es incapacitante, de inicio abrupto con sintomatología caracterizada por fiebre alta, cefalea intensa, dolor retro-orbital, dolores musculares, articulares y erupción cutánea.
- **Dengue grave:** los casos de dengue grave están caracterizados por



extravasación severa de plasma que llevan al paciente a desarrollar choque por dengue.

También existen formas clínicas, que, por no ser tan frecuentes, reciben el nombre de “atípicas”. En el dengue grave se presentan otras complicaciones por dengue que resultan del compromiso intenso de un órgano o sistema.

En niños en edad escolar, las manifestaciones más frecuentes son hepáticas y neurológicas; en menor proporción se presentan complicaciones renales, cardíacas, pulmonares, síndrome hemofagocítico, pancreatitis y abdomen agudo.

En Colombia, para la confirmación de casos de dengue se cuenta con pruebas para detección de antígeno, de anticuerpos IgM e IgG, aislamiento viral y detección molecular del virus.

Detección de antígeno: Detección del antígeno NS1 del virus DEN que se encuentra en el suero del paciente en la fase aguda de la enfermedad y puede ser detectado por diferentes metodologías como ELISA e inmunocromatografía. La muestra debe recolectarse en los primeros 5 días de evolución de la enfermedad y los casos positivos deben enviarse al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para su respectiva tipificación.

II. OBJETIVO

Objetivo general

Identificar la importancia de la utilidad de pruebas cualitativas para el diagnóstico de Dengue mediante la detección de anticuerpos anti-dengue IgG e IgM en muestras biológicas.



Objetivos específicos

- Identificar por pruebas serológicas inmunocromatográficas la presencia de anticuerpos anti-dengue IgG e IgM.
- Distinguir el tipo de muestra biológica indicada para la detección del Virus del Herpes Simplex tipo 1.
- Interpretar resultados positivos y negativos de las muestras analizadas.
- Comprender las limitaciones que se presentan en la prueba acorde a la presencia o ausencia de anticuerpos específicos.

III. MÉTODO

Se realizará la prueba inmunocromatográfica para la detección de anticuerpos anti-dengue IgG e IgM en suero y plasma.

IV. FUNDAMENTO

La prueba emplea unas partículas de oro coloidal recubiertas de diferentes proteínas de envoltura recombinantes de dengue. Cuando se añade una muestra con anticuerpos anti-dengue IgG y/o IgM a la prueba, los anticuerpos reaccionan con las proteínas de envoltura del dengue formando inmunocomplejos que migran a lo largo de la membrana y son capturados por anti-IgG humano monoclonal en la primera línea de prueba (G) y/o por anti-IgM humano monoclonal en la segunda línea de prueba (M). El exceso de inmunocomplejos y/o las partículas de oro coloidal que no reaccionaron migran más allá y son inmovilizados en la tercera línea al reaccionar con anti-dengue IgG, formando la línea de control. 2 ó 3 líneas visibles aparecerán con la presencia de anti-dengue IgG y/o IgM en la muestra. Si no hay anticuerpos del dengue en la muestra, o si su concentración está debajo del límite de detección, sólo aparecerá la línea de control que sirve de control para la ejecución y el funcionamiento correctos de la prueba. La ausencia de todas las líneas indica la realización impropia de la prueba o el funcionamiento incorrecto de los reactivos.



V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

1 Kit para la detección de anticuerpos anti-dengue IgG e IgM el cual contiene:

- Dispositivos de prueba sellados individualmente en bolsas (TEST).
- Diluyente (Buffer de fosfato 100 mmol/l y Azida de sodio 0,05 % p/v) (DIL).
- Pipetas desechables (PIP).

VI. MUESTRA

Se suministra una muestra de suero o en su defecto de sangre. Las muestras con adición de heparina, EDTA o citrato, pueden aplicarse o pueden conservarse hasta 3 días a 2- 8°C. Para almacenajes prolongados, las muestras tienen que mantenerse congeladas.

VII. PROCEDIMIENTO

Antes de proceder al análisis, TEST, DIL y las muestras deben llevarse a la temperatura ambiente.

1. Saque el número apropiado de TEST de las bolsas.
2. Sosteniendo (PIP) verticalmente, depositar 5µl de suero o plasma en la ventana de muestra cuadrática. 
3. Agregar 3-4 gotas de DIL a la ventana de reactivo redondeada en la parte inferior del dispositivo. 
4. Leer los resultados de la prueba a los 15-20 minutos en un lugar bien iluminado.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos después del tiempo estimado, se interpretan de la siguiente manera:

- **Negativo.** Sólo una línea de control (C) roja violeta aparece en la parte superior de la ventana de resultado rectangular indicando la realización apropiada del ensayo y el funcionamiento correcto de los reactivos.



- **Positivo.** Una o dos bandas de color adicionales frente a la línea C indican un resultado positivo para IgG (línea a **G**) y/o IgM (línea a **M**) respectivamente.
Aún una línea de prueba débil debe interpretarse como resultado reactivo. Intensidades diferentes entre las líneas de control y de prueba pueden ocurrir, pero éstas son irrelevantes para la interpretación.
- **Inválido.** Si no aparece ninguna línea de control, aún si aparece una línea de test, el test debe repetirse con un TEST nuevo.

Los resultados de la prueba de DENGUE deben siempre interpretarse con relación a otros resultados de pruebas de laboratorio y al cuadro clínico del paciente.

Resultados de pacientes inmunosuprimidos deben siempre interpretarse con precaución.

Factores reumáticos, anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) y anticuerpos antinucleares pueden dar resultados falsos positivos.

Si se sospecha una infección por dengue por los síntomas clínicos, se recomienda efectuar una nueva prueba los 3-4 días después con una muestra fresca.

La producción de IgM varía considerablemente de paciente en paciente. Algunos pacientes muestran niveles detectables de IgM hasta el día 2-4, mientras que otros no desarrollan niveles detectables de IgM hasta el día 8 después del comienzo de la enfermedad.

En infecciones secundarias, los niveles de IgM son normalmente inferiores y en algunos pacientes pueden ser debajo del límite de detección.



Características de la ejecución: sensibilidad diagnóstica 91%, especificidad diagnóstica 90%.

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

Indique qué tipo de resultado obtuvo de acuerdo a la formación de color

1. Indique el tipo de técnica.
2. Realice un esquema basado en el fundamento de la prueba.
3. Compare sus resultados con el de sus compañeros.
4. ¿Qué otras pruebas se utilizan para el diagnóstico de dengue y cuál es su fundamento?



PRÁCTICA N°4

DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS FRENTE A VIRUS DEL VIH TIPO 1 Y 2

I. INTRODUCCIÓN

La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) tiene una evolución crónica, que afecta el sistema inmunitario de la persona y que en ausencia de tratamiento lleva al desarrollo del sida y a la muerte. Cuando se produce la infección, aparecen un conjunto de síntomas inespecíficos los cuales frecuentemente pasan desapercibidos y en muchos casos el diagnóstico de la enfermedad se realiza cuando la persona ha desarrollado sida.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un Retrovirus del género Lentivirus, considerado así por su lento proceso para replicarse, ataca el sistema inmunitario y debilita las defensas ocasionando la presencia de infecciones y algunos tipos de cáncer. A medida que el virus destruye las células inmunitarias, la persona infectada se va volviendo gradualmente inmunodeficiente.

La infección por VIH puede ser inicialmente asintomática o manifestarse como un síndrome similar a una mononucleosis aguda (infección aguda), con fiebre, fatiga, malestar general, mialgia, artralgias, sudoración, anorexia, pérdida de peso, fotofobia, dolor de garganta, náuseas, vómito, diarrea, cefalea, eritema maculopapular transitorio o adenopatías. También puede haber anomalías neurológicas, entre ellas, encefalitis, meningitis, neuropatía periférica, alteraciones del conocimiento o afectivas. Esta enfermedad aguda se manifiesta generalmente de dos a cuatro semanas después del momento de la infección y puede durar varias semanas con resolución completa, posteriormente, en el curso natural de la infección, existe un período de latencia en el cual hay ausencia de síntomas durante años (persona infectada asintomática) debido a que no existe un deterioro grave en la función del sistema inmunitario.



Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida/Sida

Durante este período reaparecen algunas anormalidades neurológicas y el paciente puede describir problemas con la memoria anterógrada o con la incapacidad para realizar tareas simples; pueden verse afectados el estado de ánimo o la personalidad, más a menudo con un cambio hacia la apatía o la depresión y pueden tener conductas maníacas o agitación; es posible que se observen neuropatías, como el síndrome de Guillan Barré, esclerosis múltiple, entre otras.

Dependiendo del compromiso del sistema inmunitario, durante este período, determinado en parte por el tratamiento antirretroviral (TAR), se pueden presentar infecciones oportunistas menores como la varicela-zóster, papiloma virus, molusco contagioso diseminado, foliculitis bacteriana y dermatofitosis.

Cuando la capacidad de respuesta del sistema inmunitario está seriamente comprometida, aparecen manifestaciones clínicas como las ocasionadas por infecciones oportunistas, síntomas generales y neurológicos, hasta el estado más avanzado de infección o síndrome de inmunodeficiencia adquirida, sida.

El período desde la infección del VIH hasta el diagnóstico de sida se encuentra entre los dos meses y 5-10 años o más, teniendo en cuenta el tratamiento con antirretrovirales, el inicio a tiempo de la profilaxis de infecciones oportunistas y el tratamiento de trastornos nutricionales alarga este período.

El diagnóstico de la infección VIH tiene distintos objetivos, uno de ellos es el diagnóstico "per se" de personas que sospechan que pueden estar infectadas y requieren atención médica, consejo no directivo y educación sanitaria respecto a su estado. Otro de los objetivos del diagnóstico de VIH es la seguridad en las transfusiones, productos hemoderivados y donaciones de órganos de obligado cumplimiento en el ámbito territorial español. Finalmente, otros objetivos del



diagnóstico de la infección VIH, son la aplicación en programas de vigilancia serológica de esta infección (estudios de incidencia y prevalencia, tendencias en grupos poblacionales, etc.) o en programas de investigación clínica, farmacológica, virológica e inmunológica.

Para el diagnóstico por laboratorio de la infección por VIH hay una gran variedad de ensayos de laboratorio, el tipo de ensayo y la secuencia en la que se realizan están establecidos en guías de práctica clínica basadas en la evidencia científica para el VIH.

Ninguna prueba permite diagnosticar por sí sola la presencia del VIH. Es importante combinar estas pruebas en un orden específico que haya sido validado basándose en la prevalencia del virus en la población objeto de examen.

Los inmunoensayos son técnicas inmunoquímicas analíticas y se fundamentan en la gran afinidad y especificidad de los anticuerpos por sus antígenos específicos. Dentro de las más utilizadas en Colombia están:

- Tercera generación: son aquellos que permiten detectar anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 (grupo M y O) y tipo 2.
- Cuarta generación: son aquellos que permiten detectar antígenos (proteína p24 para el caso del VIH) y anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 y tipo 2.

Todos los inmunoensayos que se usen en el diagnóstico de VIH deben tener una sensibilidad mayor al 99,5 % y su respectivo registro INVIMA. Los inmunoensayos más utilizados para el diagnóstico de VIH en Colombia son los enzimoimmunoensayos (EIA) tales como pruebas rápidas, Elisa, ELFA y quimioluminiscencia.



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar la importancia de la utilidad de pruebas cualitativas para el diagnóstico de VIH mediante la detección de anticuerpos contra el virus tipo 1 y 2 en muestras biológicas.

Objetivos específicos

- Identificar por pruebas serológicas inmunocromatográficas de tercera generación la presencia de anticuerpos contra el virus tipo 1 y 2.
- Distinguir el tipo de muestra biológica indicada para la detección del Virus de la Inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2.
- Interpretar resultados positivos y negativos de las muestras analizadas.
- Comprender las limitaciones que se presentan en la prueba acorde a la presencia o ausencia de anticuerpos específicos.

III. MÉTODO

Se realizara la prueba inmunocromatográfica para la detección de anticuerpos anti-VIH IgG, IgA e IgM en suero y plasma.

IV. FUNDAMENTO

Es un ensayo de 3^a generación basado en un método inmunocromatográfico. El ensayo emplea antígenos recombinantes representando las regiones inmunodominantes de las proteínas de envoltura de los virus VIH-1 y VIH-2. Antígenos de captura gp41 y p24 del VIH-1 son fijados sobre la membrana en la línea de prueba 1, y el antígeno de captura gp36 del VIH-2 es inmovilizado en la línea de prueba 2. Los mismos antígenos, marcados con un colorante, se encuentran en el vellón de conjugado del dispositivo. Una región angosta de la tira reactiva, se sensibiliza con anticuerpos anti-VIH, sirve de línea de control C. Cuando la muestra migra a través del vellón de conjugado los anticuerpos anti



VIH-1 o anti VIH-2 específicos a los antígenos recombinantes se ligan específicamente al conjugado coloreado, formando inmunocomplejos los que son inmovilizados por los antígenos de captura recombinantes fijados en las líneas de prueba 1 y 2, produciendo allí líneas rojo-violetas. El excedente del conjugado se fija en la línea de control C que indica el funcionamiento correcto de la prueba.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Kit para la detección de anticuerpos anti-VIH IgG, IgA e IgM el cual contiene:

- Dispositivos de prueba sellados individualmente en bolsas (TEST)
- Diluyente (Tampón TRIS 50 mmol/l y Azida de sodio 0,02 % w/v) (DIL)
- Pipetas desechables (PIP)

VI. MUESTRA

Se suministra una muestra de suero, plasma o en su defecto de sangre total no hemolítica. Las muestras de sangre total con adición de heparina, EDTA o citrato, pueden aplicarse o pueden conservarse hasta 3 días a 2 - 8°C al igual que las muestras de suero o plasma. Para almacenajes prolongados, las muestras tienen que mantenerse congeladas.

VII. PROCEDIMIENTO

Antes de proceder al análisis, TEST, DIL y las muestras deben llevarse a la temperatura ambiente.

1. Saque el número apropiado de TEST de las bolsas.
2. Rotule el dispositivo
3. Sosteniendo (PIP) verticalmente, depositar 20µl de sangre o 10µl de suero o plasma en la ventana de muestra S en la parte inferior del dispositivo.
4. Agregar 3 - 4 gotas de DIL a la ventana de muestra del dispositivo.



5. Leer los resultados de la prueba a los 5-20 minutos en un lugar bien iluminado.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos después del tiempo estimado, se interpretan de la siguiente manera:

- **Negativo.** Sólo una línea de control (C) rojo-violeta aparece en la parte superior de la ventana rectangular de resultado indicando la realización apropiada del ensayo y el funcionamiento correcto de los reactivos.
- **Positivo.** Una o dos líneas de color rojo-violeta apareciendo debajo de la línea C indican un resultado positivo para anticuerpos del VIH-1 (línea a 1) o del VIH-2 (línea en 2) en la muestra.
Aún una línea de prueba débil debe interpretarse como resultado reactivo. Intensidades diferentes entre las líneas de control y de prueba pueden ocurrir, pero éstas son irrelevantes para la interpretación.
- **Inválido.** Si no aparece ninguna línea de control, aún si aparece una línea de test, el test debe repetirse con un TEST nuevo.

Por otra parte, posiblemente pacientes inmunodeprimidos o inmunocomprometidos no produzcan anticuerpos anti VIH. Por consiguiente este tipo de pruebas es considerado un método dudoso de diagnóstico.

Los resultados inicialmente reactivos tienen que ser verificados mediante otros métodos confirmativos tipo prueba Western Blot antes de atenderlos y tratarlos, con el fin de descartar que los resultados sean incorrectos o se haya proporcionado una información equivocada. Sin embargo, una vez se ha diagnosticado la infección y se ha empezado el tratamiento no se deben realizar nuevas pruebas diagnósticas.



De otra parte, un resultado negativo no excluye la posibilidad de un contacto con o una infección por el VIH.

Características de la ejecución: sensibilidad diagnóstica 100%, especificidad diagnóstica 99,5%.

VIII. TALLER DE PREGUNTAS.

1. Indique qué tipo de resultado obtuvo de acuerdo a la aparición de la banda en las ventanas.
2. Indique el tipo de técnica.
3. Realice un esquema basado en el fundamento de la prueba.
4. Compare sus resultados con el de sus compañeros.
5. ¿Qué otras pruebas se utilizan para el diagnóstico de VIH y cuál es su fundamento?



MÓDULO PRÁCTICO BACTERIOLOGÍA

PRÁCTICA N°1 TINCIÓN DE GRAM

I. INTRODUCCIÓN

Christian Gram, científico danés, descubrió en 1884 una tinción que permitía diferenciar dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas. La tinción de Gram es considerada, todavía hoy, una técnica muy utilizada para la identificación bacteriana. El resultado de la tinción de Gram se corresponde con diferencias en la composición química y ultraestructura de las paredes celulares de las eubacterias. Las bacterias Gram positivas poseen una membrana plasmática y gran cantidad de peptidoglicano en su exterior, y las bacterias Gram negativas poseen membrana plasmática, menor cantidad de peptidoglicano y una membrana externa rodeándolo.

Esta tinción es una herramienta que sirve para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta también el tipo de muestra y el diagnóstico presuntivo del proceso infeccioso.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aprender a desarrollar la técnica de la tinción de Gram.

Objetivos específicos

- Introducir a los estudiantes en los fundamentos y utilidad clínica de la prueba.
- Reconocer los colorantes que se requieren para la tinción.
- Identificar las diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.



III. FUNDAMENTO

El cristal violeta es un colorante hidrófobo que establece una interacción muy fuerte con el peptidoglicano de la pared bacteriana. El lugol refuerza esa unión. Sin embargo, en las bacterias Gram negativas el cristal violeta no puede llegar hasta el peptidoglicano debido a la membrana externa, por ello al añadir alcohol-acetona, todo el cristal violeta se va. Las bacterias Gram positivas no tienen membrana externa y por eso la unión del cristal violeta con el peptidoglicano sí es covalente y el alcohol-acetona no puede romper esa unión.

La safranina es el colorante de contraste; las bacterias Gram positivas, se tiñen de azul por el cristal violeta y ya no pierden el color; mientras que las bacterias Gram negativas se teñirán de rosa por la safranina.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol acetona.
- Fucsina.
- Solución salina.
- Aceite de inmersión.
- Portaobjetos.
- Asas.
- Mechero.

V. MUESTRA

- Cepa Gram positiva (Proporcionada por CEID).
- Cepa Gram Negativa (Proporcionada por CEID).



VI. PROCEDIMIENTO

1. Si el medio supuestamente infectado es líquido, se deposita una gota sobre el portaobjetos. Si el medio es sólido se coge una pequeña porción de alguna de las colonias de bacterias con el asa de siembra y se deposita en el portaobjetos con una gota de agua.
2. Se deseca a la llama. Hay que tener cuidado con no quemar las células ya que, si así fuera, no se conseguiría ningún resultado.
3. Depositar el portaobjetos sobre unas varillas de vidrio situadas sobre el lavabo.
4. Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto.
5. Lavar con agua corriente.
6. Cubrir con lugol durante 1 minuto.
7. Lavar con agua.
8. Agregar alcohol-acetona por la superficie del portaobjetos por 15 segundos.
9. Lavar con agua.
10. Cubrir con safranina durante 30 segundos.
11. Lavar con agua.
12. Desecar a la llama.

STEP	TIME	PROCEDURE	RESULT
1	one minute	Primary stain: Apply crystal violet stain (purple) ↓ Rinse slide	All bacteria stain purple 
2	one minute	Mordant: Apply Gram's Iodine ↓ Rinse slide	All bacteria remain purple 
3	three to five seconds	Decolorize: Apply alcohol ↓ Rinse slide	Purple stain is removed from Gram-negative cells 
4	one minute	Counterstain: Apply safranin stain (red) ↓ Rinse slide	Gram-negative cells appear pink-red; Gram-positive cells appear purple 

© Cengage Learning 2012

Fuente: Estridge B, Reynolds A. Pasos en el procedimiento de la tinción de Gram. Basic Clinical Laboratory Techniques. 2012.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Dibuje las estructuras observadas
2. Identifique la morfología bacteriana observada
3. Realice conclusiones acerca de los resultados obtenidos.



PRÁCTICA N° 2: CULTIVO DE BACTERIAS A PARTIR DE UN FROTIS FARÍNGEO

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias requieren nutrientes indispensables para su crecimiento tales como fuente de carbono, de energía, nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Los medios de cultivo son un sustrato de nutrientes en los cuales crecen y se multiplican las bacterias para posteriormente ser aisladas e identificadas.

CLASIFICACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

En el laboratorio de microbiología se utilizan medios de cultivo que se clasifican según la consistencia, origen, y capacidad para permitir el crecimiento bacteriano.

• **Consistencia:**

- **Medios líquidos:** son medios libres de agar – agar (Sustancia inerte polisacárida extraído de algas) que poseen nutrientes en solución acuosa. También son conocidos como caldos. Ejemplo: caldo nutritivo, caldo tioglicolato.
- **Medios sólidos:** son medios que contienen de 1.5 a 2.0 % de agar – agar I. Ejemplo: agar sangre.
- **Medio semisólido:** son medios de cultivo que contienen de 0.5 a 1.0 % de agar – agar lo que proporciona una consistencia pastosa. Ejemplo: medio SIM.

• **Origen:**

- **Medios naturales:** son preparados con derivados vegetales o animales. Ejemplo: caldo cerebro corazón, caldo papa.
- **Medios sintéticos:** poseen componentes químicos definidos.



Ejemplo: medios comerciales deshidratados.

- **Medios semisintéticos:** son medios sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo. Ejemplo: extracto de levadura.

- **Capacidad para permitir el crecimiento bacteriano:**

- **Medios básicos:** son medios ricos en nutrientes que permiten el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Se utilizan en la siembra primaria de las muestras clínicas. Ejemplo: agar común, caldo común.
- **Medios enriquecidos:** son medios que están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos (sangre, suero, líquido ascítico, glucosa etc.) que aportan factores de crecimiento o sustancias que neutralizan agentes inhibidores por lo que favorecen el crecimiento de bacterias exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales. Ejemplo: caldo de tioglicolato, caldo cerebro corazón (BHI).
- **Medios selectivos:** son medios que se utilizan para inhibir el crecimiento de bacterias distintas a las que se quiere aislar que están presentes en la muestra por lo que contienen sustancias como cloruro sódico a dosis elevadas, citrato sódico, cristal violeta, sales biliares o antibióticos y antisépticos que fomentan el crecimiento de algunas bacterias y evitan el de otras. Ejemplo: agar manitol.
- **Medios de enriquecimiento:** son medios que favorecen el crecimiento de bacterias que se encuentran en menor proporción en una muestra que posee gran variedad de microorganismos, del mismo modo poseen agentes que inhiben las especies que no son deseadas.



Ejemplo: caldo selenito y tetratonato que se utilizan para aumentar el crecimiento de *Salmonella* en muestras fecales.

- **Medios diferenciales:** son medios que se utilizan para poner de manifiesto características distintivas de las colonias como algunas propiedades bioquímicas. Son medios que distinguen entre distintos grupos bacterianos en función casi siempre del color de sus colonias. Ejemplo: agar MacConkey.
- **Medios cromogénicos:** son medios que permiten la detección de microorganismos a través de compuestos cromogénicos que se generan gracias a la hidrólisis enzimática de sustratos, proporcionando color a las colonias lo que permite una identificación presuntiva.
- **Medios de transporte:** son utilizados para mantener la viabilidad de las bacterias sin multiplicación significativa, para posteriormente ser recuperadas. Ejemplo: medio de Stuart.

SIEMBRA

Siembra en caja de Petri

- **Siembra por agotamiento:** consiste en el agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido con el objetivo de obtener colonias separadas. Se utiliza para aislar cultivos puros de muestras con flora mixta.
- **Siembra masiva:** se utiliza para obtener un gran número de microorganismos en la superficie del agar. Esta técnica es útil para la realización de recuentos de colonias y antibiogramas por el método de difusión.



Siembra en medios contenidos en tubo

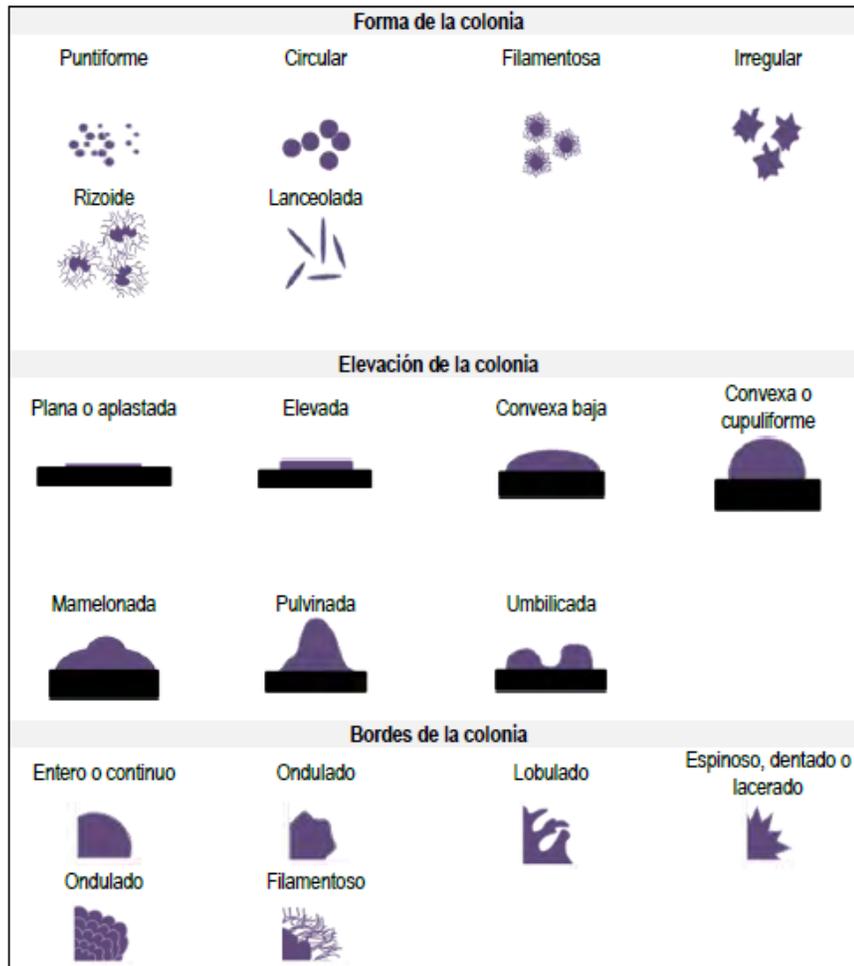
- **Inoculación en tubo con agar inclinado:** consiste en la inoculación en un tubo con agar que se deja solidificar de manera inclinada. Se utiliza para el aislamiento de microorganismos aerobios y anaerobios, para demostración de reacciones bioquímicas y visualización de pigmentos.
- **Inoculación en tubo con medios líquidos:** con esta inoculación se logra un crecimiento masivo y rápido de las bacterias lo cual se evidencia por enturbiamiento, formación de velo en la superficie, sedimento, cambio de color, formación de flóculos.
- **Inoculación en tubo con medios semisólidos:** su utilidad se basa en la observación de la movilidad de las bacterias.

MORFOLOGÍA DE COLONIAS

Las colonias son agrupaciones de bacterias originadas por el crecimiento. Las características de las colonias constituyen un parámetro importante en la identificación bacteriana. Se debe evaluar el tamaño, la forma, los bordes, la elevación, la consistencia, el aspecto, el color, la elevación, la hemólisis.

Las colonias se clasifican según:

- **Tamaño:** grande, mediano, pequeño.
- **Forma:** puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, lanceolada.
- **Bordes:** entero, ondulado, lobulado, filamentoso, espinoso.
- **Consistencia:** blanda, dura, mucoide
- **Aspecto:** brillante, opaco, traslúcida.
- **Color:** cromógenas y no cromógenas
- **Elevación:** plana, elevada, convexa baja, convexa cupuliforme, mamelonada, pulvinada, umbilicada.
- **Hemólisis:** parcial, total y no hemólisis.



Fuente: Rojas–Triviño A. Descripción macroscópica de colonias creciendo sobre agar nutritivo. Conceptos y práctica de Microbiología general. 2011

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Comprender la importancia del cultivo para obtener aislamientos que permitan la identificación del agente bacteriano.

Objetivos específicos

- Aplicar las técnicas de siembra y cultivo de bacterias.



- Conocer concepto de colonia bacteriana, medio de cultivo y halo de inhibición.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agar sangre.
- Agar manitol.
- Portaobjetos.
- Asas.
- Mechero.
- Baja lenguas.
- Escobillones estériles.
- Incubadora.

IV. MUESTRA

Secreción faríngea.

V. PROCEDIMIENTO

- No se puede tocar nada que vaya a tomar contacto con la muestra biológica con las manos (depresor, asa de siembra, torunda...) para evitar contaminaciones.
- Una vez utilizado, este material ha de ser eliminado en un contenedor especial.
- Todos los materiales o muestras tomadas deben estar perfectamente identificados: nombre, grupo, fecha e indicativo del tipo de muestra.
- Al acabar la práctica, se deben lavar bien las manos.

TOMA DE LA MUESTRA

- Se abre con cuidado, por un extremo, el baja lenguas, sin tocar el otro extremo para mantenerlo estéril.
- Distribuidos por parejas, uno de los miembros de la pareja sujeta con el baja



lenguas del otro, colocándola pegada al suelo de la boca, manteniendo despejada la abertura bucal.

- Se introduce un escobillón y se tocan suavemente las amígdalas, en donde se encuentran bacterias, intentando evitar el contacto con la lengua u otras zonas. Es normal que se provoque un reflejo de arcada. En este caso, se separa la torunda y se vuelve a intentar.
- Al finalizar, se tira el baja lengua al contenedor de desechos orgánicos.

SIEMBRA

- Realizar una siembra por agotamiento en cajas con agar sangre y agar manitol.

INCUBACIÓN Y OBSERVACIÓN

Se llevan las placas a incubar a 37°C (temperatura corporal), durante 24 horas. Tras este período se recogen las placas y sin abrir se observa el crecimiento bacteriano. Al finalizar la práctica se entregan las placas al profesor para que sean destruidas junto con el resto de material empleado.

El medio de cultivo agar sangre es un medio nutritivo general, no selectivo, en el cual pueden crecer casi todos los tipos de microorganismos. Su nombre deriva de que contiene un 5-10% de sangre desfibrinada (no coagula) extraída de caballo, conejo o, sobre todo, de carnero.

Las bacterias existentes en la faringe pueden ser de dos tipos:

- Flora bacteriana propia o normal, de vida saprofita (crecen sobre restos de comida).
- Flora patógena, que provoca enfermedades (especialmente *Streptococcus pyogenes*, responsable de la faringitis aguda, la fiebre reumática, angina estreptocócica, escarlatina, erisipela)



Al tomar una muestra de la faringe, las bacterias existentes empiezan a dividirse. De una bacteria se forman miles o millones, dando lugar a una colonia visible a simple vista.

Todas las bacterias de una colonia son genéticamente idénticas a la bacteria que las originó e iguales entre sí.

Las resiembras tienen por objetos intentar conseguir que se formen colonias aisladas de la masa principal.

Al contener el medio de cultivo glóbulos rojos (agar-sangre) si existiera algún microorganismo patógeno se produciría la destrucción de estos glóbulos rojos, ya que estas bacterias tienen enzimas que rompen las paredes de los glóbulos rojos, y se formaría un halo de hemólisis: alrededor de la colonia de bacterias patógenas se forma una zona transparente. Así se detecta su presencia en la faringe.

El medio manitol se utiliza para el aislamiento selectivo de estafilococos, permite diferenciar estafilococos coagulasa positivo de los estafilococos coagulasa negativo a partir de muestras clínicas. Los estafilococos coagulasa positivo (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) producen colonias amarillas y un medio circundante de color amarillo gracias a un indicador de pH el rojo de fenol, mientras que los estafilococos coagulasa negativo producen colonias de color rojo y no producen cambio de color.

VI. TALLER DE PREGUNTAS

Dibuja la placa representando las colonias que han crecido en ella. Responde a las siguientes preguntas:

1. ¿Observa un único tipo de colonias o hay varios tipos distintos?
2. En caso de que haya tipos distintos describe las diferencias entre las colonias
3. ¿Qué es un halo de hemólisis?



4. ¿Por qué se produce?
5. ¿Qué ocurriría si tocáramos el material biológico con las manos?



PRÁCTICA N° 3.

IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS (PRUEBAS BIOQUÍMICAS)

I. INTRODUCCIÓN

En la tierra existe una diversidad de hábitat cada uno de ellos caracterizado por factores físicos, tales como, la luz, la temperatura, entre otros), y factores químicos (pH, presencia de diversos compuestos químicos, entre otros). El análisis espacio-temporal de los diversos hábitats presentes en la tierra desde los inicios de la atmósfera oxidante, revela variaciones de tipo cualitativa y cuantitativa.

A pesar de las amplias variaciones de factores físicos y químicos que caracterizan al conjunto de hábitat en la tierra, se ha podido demostrar la presencia de diversos microorganismos, en particular, de diversos géneros y especies de bacterias. Esta propiedad de las bacterias es producto de un proceso evolutivo que les ha permitido utilizar para su desarrollo variado nutrientes a través de una diversidad de procesos o vías metabólicas.

En cada proceso o vía metabólica interviene una o más enzimas, las cuales pueden ser detectadas a través de test o pruebas bioquímicas específicas. En estos ensayos enzimáticos se puede analizar la utilización de un determinado sustrato, la producción de uno o más intermediarios metabólicos o del compuesto terminal de una vía metabólica.

Las pruebas bioquímicas forman parte de la taxonomía numérica o fenotípica, y permite el análisis bioquímico comparativo entre diferentes bacterias a nivel del taxón género. De gran importancia para el hombre resulta la aplicación de pruebas bioquímicas que permiten identificar bacterias patógenas, particularmente, aquellas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

En la práctica, el proceso de identificación de bacterias presentes en una muestra natural que se ha venido analizando hasta el momento, debería continuar con la



aplicación de diversas pruebas bioquímicas a cada uno de los cultivos bacterianos puros.

Existen, además, sistemas multipuebas para la identificación de microorganismos. Uno de estos es el sistema API 20E para la identificación de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativo. Consiste en un sistema miniaturizado de las pruebas bioquímicas convencionales con micro tubos conteniendo sustratos deshidratados a los que se les agrega una suspensión bacteriana y se incuban durante 18 a 24 hs. a 37 °C. En cada microtubo se halla incorporado un sistema indicador de pH. Al cabo del tiempo de incubación se registran los resultados experimentales obtenidos en cada uno de los microtubos, lo cual es producto de reacciones bioquímicas específicas de la bacteria que se desea identificar.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer las pruebas utilizadas para determinar características metabólicas de las Enterobacterias.

Objetivos específicos

- Reconocer los fundamentos de las pruebas bioquímicas y su correcta interpretación.
- Identificar una cepa bacteriana perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* mediante la aplicación de pruebas bioquímicas convencionales.

III. FUNDAMENTO

- **Agar Triple Hierro-Triple Azúcar (Agar TSI o Triple Sugar Iron).**



Este medio se emplea para detectar la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido, gas y también para detectar la producción de ácido sulfhídrico.

- **Agar Hierro Lisina (Agar LIA o Lisyne Iron Agar).**

Esta prueba permite detectar la capacidad de descarboxilar o desaminar un aminoácido formando una amina gracias a dos enzimas: la lisina descarboxilasa y la lisina desaminasa, además la presencia de sales de hierro sirve para detectar la producción de H₂S por algunos microorganismos. El proceso se produce en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6,0), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la descarboxilación dando lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador a color violeta.

- **Agar Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar).**

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio.

- **Agar SIM (Sulfide Indole Motility Medium).**

Medio que permite poner en evidencia la producción de indol, ácido sulfhídrico y movilidad de las bacterias. La prueba está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del reactivo p- Dimetilaminobenzaldehido principio activo del reactivo de Kovac's.

- **Prueba de la Ureasa**



La ureasa es una enzima que poseen algunas bacterias que pueden hidrolizar la urea con producción de amoníaco de acuerdo a la siguiente reacción química: $\text{Urea} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NH}_3$.

El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciéndose alcalinización y aumento del pH del medio que se detecta por la presencia de un indicador de pH en el medio.

- **Caldo RM – VP (Rojo de metilo – Voges proskauer).**

Con estas dos pruebas se estudia qué tipo de fermentación (butilenglicólica o ácido mixta) realiza el microorganismo en estudio.

La prueba de Voges-Proskauer sirve para comprobar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína) a partir de la fermentación (butilenglicólica) de la glucosa. La prueba del rojo de metilo sirve para comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación (ácido mixta) de la glucosa.

- **Reducción de Nitratos.**

Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos, a nitrógeno elemental o a hidroxilamina. Se revela adicionando 1 ml de ácido sulfanílico y 1 ml de alfa naftilamina. Si el tubo no presenta ningún cambio se adiciona polvo de zinc. Se utiliza para asignar bacterias a la familia *Enterobacteriaceae*.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Batería de pruebas bioquímicas: TSI, LIA, CITRATO, RMVP, SIM, UREA, NITRATO
- Reveladores RM y Nitrato



- Portaobjetos
- Asas
- Mechero
- Cepa E. Coli
- Incubadora

V. MUESTRA

No aplica

VI. PROCEDIMIENTO

- **Inoculación de pruebas bioquímicas:** a partir de un cultivo fresco de la cepa bacteriana (18 – 24 horas) se toma una muestra de una colonia con un asa en punta y se procede a inocular diversos medios de cultivo sólido de acuerdo al protocolo específico establecido para cada ensayo experimental. En el caso de las pruebas bioquímicas de tipo líquido (caldo rojo de metilo y caldo lactosa rojo de fenol), estas se inoculan a partir de un cultivo bacteriano en caldo.
- **Incubación de las muestras:** todos los tubos de ensayo inoculados se incuban a 37°C por tiempos variables, dependiendo de la especificación de cada uno de los test bioquímicos utilizados.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. ¿Cómo se interpretan las siguientes pruebas bioquímicas?

- Agar Triple Hierro-Triple Azúcar
- Agar Hierro Lisina
- Medio Movilidad-Indol-Ornitina
- Caldo Lactosa Rojo de Fenol



- Agar Citrato de Simmons
- Caldo Rojo de Metilo
- Vogues Proskauer.
- Reducción de Nitrato

2. Mencione tres sistemas automatizados para la identificación bacterias y explique cómo funcionan.



PRÁCTICA N°4 ANTIBIOGRAMA

I. INTRODUCCIÓN

El antibiograma se define como el estudio de la sensibilidad "*in vitro*" de las bacterias a los antibióticos, aunque se extiende a algunos quimioterapéuticos. El antibiograma es un método de diagnóstico rápido y preciso, ya que no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias, hongos y virus a los agentes antimicrobianos. Con frecuencia es necesario estudiar la sensibilidad individual de cada patógeno a estas drogas, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado que provee mayores posibilidades de una evolución favorable.

Los antibióticos en general pueden ser de amplio espectro o de espectro reducido, estos últimos van a matar gérmenes más específicamente. Dependiendo del origen o localización de la infección, se va a utilizar uno u otro. Por ejemplo, en una infección de garganta no se debería utilizar uno de amplio espectro ya que mataría también a la microbiota normal tan importante para nosotros.

El antibiograma por el método de difusión en agar es una prueba en la que se enfrenta la bacteria inoculada sobre la superficie de un medio de agar con una solución antibiótica absorbida en discos de papel de filtro. Este método está estandarizado y los halos de inhibición han sido obtenidos correlacionándolos con las CMI y aparecen en unas tablas.

Hay varios factores que afectan al halo de inhibición: la carga del antibiótico en los discos, la difusión del antibiótico en el medio de cultivo, el tamaño del inóculo bacteriano, la composición y grosor del medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación.

Los discos de antibióticos son adquiridos comercialmente. Deben contener la



cantidad establecida de antibiótico y ser conservados a 4°C protegidos de la humedad.

El inóculo bacteriano debe tener una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland, aproximadamente 108 UFC/ml y ser preparado en solución salina estéril o caldo de cultivo.

Todas las bacterias no tienen la misma sensibilidad a los distintos antibacterianos. La evaluación de esta sensibilidad nos va a ayudar en la selección del compuesto más adecuado para el tratamiento de una infección bacteriana. Las pruebas más utilizadas para evaluar la sensibilidad de una bacteria a un agente antibacteriano están basadas en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente.

- **Concentración mínima inhibitoria (CMI)** se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada.
- **Concentración mínima bactericida (CMB)** se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de destruir una cepa bacteriana dada.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la sensibilidad bacteriana a distintos antibióticos utilizando el método de difusión en agar.

Objetivos específicos

- Aprender a realizar la lectura de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.
- Conocer las indicaciones del antibiograma en la práctica clínica.



III. MÉTODO

Difusión en agar (Kirby – Bauer).

IV. FUNDAMENTO

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. En la superficie de agar sólido de Muller - Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Sensidiscos de antibióticos.
- Escala de Mac Farland 0,5.
- Agar Muller Hinton.
- Cepa bacteriana.
- Caldo nutritivo.
- Escobillon estéril.
- Asa en aro.
- Mechero.
- Pinzas.
- Regla.
- Incubadora.



VI. MUESTRA

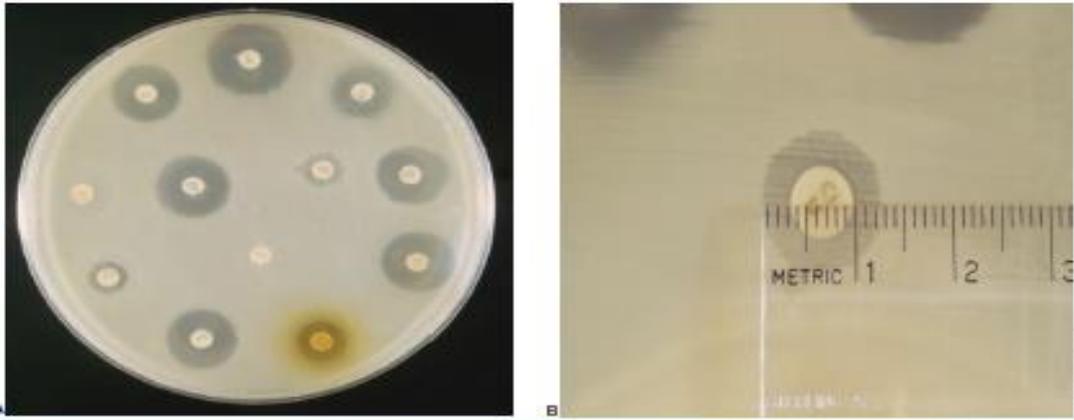
No aplica

VII. PROCEDIMIENTO

- Se toma con el asa 2-3 colonias y se inoculan en caldo nutritivo o solución salina estéril de tal manera que alcance la turbidez del patrón 0,5 de la escala de MacFarland.
- Introducir un escobillón estéril rotándolo contra las paredes del tubo para escurrir el exceso de inóculo.
- Realizar una siembra masiva en tres direcciones para asegurar una completa distribución sobre la superficie del agar Muller Hinton
- Se toman las pinzas se pasan por la llama del mechero y se toman los sensidiscos para colocarlo sobre la superficie del medio aplicando una ligera presión.
- Se colocan los discos en la superficie del medio de cultivo de acuerdo con las recomendaciones del docente.
- Incubar las placas invertidas a 37°C por 24 horas.
- Para la lectura de las placas examinar los halos de inhibición y medir los diámetros con una regla.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los tamaños de las zonas de inhibición se realizan de acuerdo con las tablas correspondientes y los microorganismos se informarán como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) frente al antimicrobiano ensayado.



Fuente: Estridge B, Reynolds A. Prueba de sensibilidad a antibióticos. Basic Clinical Laboratory Techniques. 2012

- Reportar los resultados del antibiograma.
- Recopilar sus resultados incluyendo el diámetro del halo de inhibición.
- Discutir en cada caso cuáles fueron el rango de sensibilidad del microorganismo ante las diferentes drogas. (resistente, intermedia y sensible) de acuerdo a el diámetro del halo de inhibición.
- Discutir en cada caso el rango de acción de las drogas con los diferentes microorganismos. (de amplio espectro, de bajo espectro).

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Describa brevemente cómo se realiza el antibiograma en método de difusión en agar.
2. Describa brevemente cómo se realiza el antibiograma por sistema de panel.
3. ¿Cuál es la importancia clínica de antibiograma y en qué circunstancias usted como médico lo solicita al laboratorio?
4. ¿Cuáles son las estrategias para disminuir la aparición de resistencias a los antibióticos?



5. Clasifica a los antimicrobianos usados en la práctica de acuerdo a su estructura química y mecanismo de acción en la estructura celular.
6. ¿Cuáles son las bases para la utilización clínica de los antimicrobianos?
7. ¿Qué otros métodos se pueden utilizar para la valoración y selección de antimicrobianos?
8. ¿Qué son los halos de inhibición?
9. ¿Por qué se miden los halos?



MÓDULO PRÁCTICO PARASITOLOGÍA

PRÁCTICA N°1. EXAMEN DE LAS HECES

I. INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de parasitología se emplean diversas metodologías para apoyar el diagnóstico de parasitosis e infecciones intestinales.

Es así, como el examen de las heces constituye un perfil que con frecuencia está indicado clínicamente en las diarreas crónicas y en procesos que cursan con insuficiencia digestiva así como también en la demostración del agente causal de dichas alteraciones. Este tipo de examen incluye diferentes parámetros en función del método de análisis, cuyo valor es significativo como ayuda a la hora de establecer un diagnóstico.

Entre los diferentes métodos para el análisis de las heces se señalan:

- Coprológico.
- Coproscópico o coprológico dirigido.
- Coprocultivo.
- Sangre oculta en heces.
- Tinciones.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer la aplicación clínica de los métodos de análisis de muestras de materia fecal.



Objetivos específicos

- Aprender a interpretar los resultados del análisis de las heces.
- Diferenciar la utilidad de las diferentes pruebas para el análisis de las heces.

III. FUNDAMENTO

COPROLÓGICO

Análisis de la materia fecal que incluye un examen macroscópico y microscópico. El examen macroscópico está constituido por diversos parámetros como el color, consistencia, moco, sangre, presencia de parásitos adultos, y el microscópico incluye: residuos vegetales, residuos animales, células, cristales, flora bacteriana, hongos y estructuras parasitarias; todos estos serán descritos a continuación.

Examen macroscópico: consiste en realizar una descripción de las características físicas de la materia fecal.

- **COLOR:** En condiciones normales la materia fecal es de color pardo a marrón, en los niños puede ser amarillo claro debido a su régimen lácteo. El color de las heces es debido a los pigmentos biliares que son drenados al duodeno, en la luz intestinal, las bacterias convierten la bilirrubina directa en urobilinógeno, el cual en gran proporción se reabsorbe y el resto se excreta con las heces; sustancias exógenas coloreadas, no absorbidas provenientes de algunos alimentos y/o medicamentos, pueden proporcionar otros colores sin que esto implique patología alguna, no obstante las principales alteraciones en el color se refiere a la ausencia de color o acolia y la presencia de heces con sangre que puede variar desde rojas hasta negras.
 - *Acolia:* es debida a la ausencia de los pigmentos biliares por obstrucción intra o extrahepática del flujo biliar al duodeno.
 - Obstrucción intrahepática: hepatitis, cirrosis, colestasis entre otros.



- Obstrucción extrahepática: cálculo biliar, cáncer de páncreas que ocluya la desembocadura.
 - *Heces rojas o negras (melenas)*: están muy relacionadas con presencia de sangre procedente de lesiones en cavidad oral, fosas nasales, hasta el ano. La intensidad del color dependerá de cuan alta o baja sea el origen de la sangre. Por consiguiente, si la sangre se origina a partir del tracto superior, esta será más oscura debido a la acción de los jugos gástricos y si la procedencia del sangrado es cercana al recto el color de las heces varia del pardo a rojo vivo.
 - *Estrías hemorrágicas*: se presentan en fisuras anales, hemorroides, estreñimiento entre otros.
- **CONSISTENCIA**: Depende de la cantidad de agua que se elimine con las heces, a saber pueden ser líquidas, semilíquidas, blandas, pastosa y dura. Normalmente las heces son cilíndrica, blandas o pastosas. En condiciones patológicas, como el estreñimiento, son duras debido a que el tubo digestivo trata de extraer la mayor cantidad de agua presente en las heces ante un déficit de líquidos. Una consistencia líquida y abundante se presenta cuando aumenta la cantidad de agua eliminada por las heces, tal es el caso de las diarreas donde además de aumentar la frecuencia de las deposiciones se pierden electrolitos. Cuando estas presentan una forma aplanada o de cinta debe sospecharse de obstrucciones del recto asociadas a procesos tumorales.
- **OLOR**: es producido por la presencia de sustancias aromáticas derivadas de la desaminación y descaboxilación del triptófano como el indol y escatol. La intensidad del olor dependerá de los hábitos alimenticios, donde ésta aumentará en las dietas ricas en carnes, mientras que en las dietas ricas en vegetales disminuirá. Patológicamente se aumenta cuando hay desintegración de proteínas como sucede en el cáncer de recto, un olor



amoniaco se relaciona con insuficiencia renal o fistula recto vesical; olor a smegma se presenta en la disentería amebiana, y a huevo podrido en la salmonelosis.

- **MOCO:** la presencia aumentada está relacionada con proceso inflamatorio en mucosa intestinal, es característico en colitis ulcerativa, amibiasis intestinal invasiva entre otros.
- **SANGRE:** la observación macroscópica de sangre fresca puede indicar hemorroides o fisuras anales, así como también algunas parasitosis entre otras afecciones del tracto intestinal; cabe destacar que en ocasiones la sangre no es perceptible macroscópicamente y es necesario, si se tiene sospecha de hemorragia gastrointestinal, un test de sangre oculta en heces, lo cual se tratará más adelante.
- **PARÁSITOS ADULTOS:** es posible observar estructuras parasitarias en estado adulto de helmintos y proglótides de cestodos.

Examen microscópico: luego de una preparación de una pequeña porción de materia fecal tomada con un palillo y emulsionada con lugol y/o solución salina, se procede a observar al microscopio para reconocer las siguientes estructuras:

- **RESIDUOS ALIMENTICIOS DE ORIGEN VEGETAL:** estos se clasifican en almidones, células, pelos y fibras.
 - *Almidones:* son estructuras que se presentan de forma y tamaño irregular, su presencia indica un déficit de disacaridasas.
 - *Células y fibras vegetales:* suelen observarse formando retículos en forma de panal y también de espiral, estas estructuras



pueden asociarse a diarreas y a síndromes de malabsorción.

- *Pelos vegetales*: poseen un conducto central que recorre su longitud, su pared es refringente y homogénea.

- RESIDUOS ALIMENTICIOS DE ORIGEN ANIMAL:
 - *Grasas*: se observan como gotas amarillas y un aumento de éstas (Esteatorrea) puede presentarse en diarrea, síndrome de malabsorción, obstrucción del flujo biliar, déficit exocrino pancreático, abetalipoproteinemia, anormalidades en los linfáticos intestinales. Al microscopio se observan de tres formas tales como grasas neutras ácidos grasos y jabones.

 - *Grasas neutras*. Aparecen como gotitas redondas de diferentes tamaños con bordes de color negro y se tiñen con el lugol de amarillo claro.

 - *Ácidos grasos*. Toman la forma de copos, como la de las grasas neutras o de cristales semejantes a agujas que generalmente están agrupadas.

 - *Jabones*. Se presentan como amorfos de color amarillo o masas redondeadas parecidos a huevos de parásitos. Proviene de la saponificación de las grasas en el intestino.

 - *Fibras musculares*: se observan de color amarillo en forma de rectángulos con estrías transversales; un aumento notable se evidencia principalmente en defectos de la digestión.



- **LEUCOCITOS:** normalmente son muy escasos pero su presencia de forma aumentada indica un proceso infeccioso, generalmente se encuentran asociados a moco y se presentan en diferentes enfermedades intestinales.
- **ERITROCITOS:** están presentes en materia fecal en casos de hemorragias del colon, hemorroides, fisuras sangrantes así como también en síndrome disentérico.
- **LEVADURAS:** se pueden observar en condiciones normales, pero aumentan cuando existe desequilibrio de la flora bacteriana.
- **BACTERIAS:** están presentes en condiciones normales.
- **CRISTALES:** tienen diferente morfología y de poca significación clínica. Se clasifican en:
 - *Oxalato de calcio:* tiene forma de sobre de carta. Procede generalmente de la savia o de determinadas células de las plantas. Puede cristalizar en diversas formas, la más frecuente es la bipirámide tetragonal.
 - *Fosfatos triples:* tienen forma de ataúd
 - *Colesterina:* tiene aspecto de escalera
 - *De charcot – leyden:* se presentan de forma alargada, romboidal y con extremos puntiagudos que se originan por la desnaturalización de los eosinófilos y su presencia está asociada a procesos alérgicos como helmintosis e isosporosis.



COPROLÓGICO DIRIGIDO O COPROSCÓPICO

Es un examen más completo de la materia fecal donde, además de analizarse los parámetros antes descritos, se incluyen determinaciones bioquímicas y tinciones.

- DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS
 - *pH*: normalmente es de 7.0, depende de la dieta y de la fermentación bacteriana en el intestino delgado; la fermentación de carbohidratos acidifica mientras que la degradación de las proteínas alcaliniza. Tiene especial interés en diarreas por rotavirus en menores de cinco años en los cuales se presenta un pH ácido acompañado por vomitos y fiebre.
 - *Azúcares reductores*: los azúcares que se determinan son principalmente glucosa y lactosa. Un resultado positivo indica la presencia del carbohidrato que no se absorbe y es útil en el diagnóstico de diarrea por deficiencia de disacaridasa, que se presenta en lactantes que no pueden desdoblar la lactosa así como también en diarreas provocadas por rotavirus.
- TINCIONES
 - *Coloración de Gram*: no tiene gran significancia, pero se debe reportar la presencia de bacilos gram negativos curvos o en forma de gaviota tipo *Campylobacter*.
 - *Coloración de Wright*: está compuesto de azul de metileno que tiñe de azul las partes ácidas de las células y eosina que tiñe las partes alcalinas, disueltos en metanol que permite la fijación de las células, adicionando a la preparación buffer de fosfatos que rehidrata a las células después de la exposición con metanol.



Es necesario que cuando los leucocitos se presenten de manera aumentada en las heces, se realice un diferencial de estos leucocitos a partir de un frotis delgado de la materia fecal o mucosa rectal coloreada con Wright. Los polimorfonucleares predominan en las shigelosis, colitis invasiva por *Escherichia coli*, Salmonelosis excepto fiebre tifoidea, colitis ulcerativa y en esta última también se presentan eosinófilos en menor proporción. Los mononucleares o macrófagos se encuentran aumentados en fiebre tifoidea.

COPROCULTIVO

Este análisis está indicado en situaciones como diarrea de mala evolución, por severidad o prolongación de los signos o síntomas asociados. Tiene especial utilidad debido a que es un método que permite efectuar el diagnóstico etiológico bacteriano de las infecciones e intoxicaciones alimentarias.

SANGRE OCULTA EN HECES

Este examen está indicado cuando macroscópicamente no se observa sangre en la materia fecal. Para su detección suele utilizarse sustancias que reaccionan como bencidina, guayaco, ortotoluidina que reaccionan con los derivados de la hemoglobina. Es importante que, para mayor exactitud de la prueba, se recomiende al paciente no ingerir carnes rojas, remolacha o ningún producto alimenticio que pueda proporcionar pigmento rojo tres días previos a la prueba.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Gotero con solución salina al 0,85%.
- Gotero con lugol.
- Aplicadores de madera (palillos).
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Microscopio.



V. MUESTRA

Muestra de materia fecal

VI. PROCEDIMIENTO

El alumno traerá una muestra de heces fecales y procederá a realizar un examen directo de la siguiente manera:

1. En un portaobjetos se colocará una gota de solución salina al 0,85% y una gota de lugol separadamente. Con un palillo se tomará una pequeña cantidad de materia fecal y se mezclará con los reactivos antes mencionados, depositados en la lámina portaobjetos, tratando de que la preparación no quede ni muy gruesa ni muy delgada.
2. Colocar en cada una de las mezclas un cubreobjetos.
3. Se procederá a observar la preparación con el objetivo de menor aumento (10X), buscando estructuras grandes y procediendo a describirlas.
4. Se procederá observar con objetivo de mayor aumento (40X), se describirán las estructuras encontradas.

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Describa sus observaciones y resultados.
2. Dibuje las estructuras observadas y compárelas con el atlas de parasitología e identifique las formas parasitarias presentes.
3. Elabore un cuadro diferencial de los tipos de análisis de las heces y su importancia en el diagnóstico clínico.



PRÁCTICA N°2.
IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS SANGUÍNEOS. EXTENDIDO DE
SANGRE PERIFÉRICA Y GOTA GRUESA. OBSERVACIÓN DE
PROTOZOARIOS TISULARES.

I. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de diagnóstico directo son útiles en el trabajo de campo a la hora de identificar hemoparásitos. No obstante, su sensibilidad es relativa, ya que por lo general registran cierta proporción de falsos negativos, consecuencia de la cantidad de parásitos en la sangre, la cual en algunas enfermedades, puede ser baja y/o fluctuante. Por ello, es recomendable repetir todas las muestras negativas o complementarlas con otras técnicas antes de establecer un diagnóstico definitivo.

Existen diferentes técnicas de sensibilidad variable y detección directa para el diagnóstico de hemoparásitos como *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Babesia* y *Microfilarias*; el cual se hace por el hallazgo de parásitos circulantes utilizando las técnicas de gota gruesa y el extendido de sangre periférica teñidos con los colorantes derivados de Romanowsky, como son Giemsa, Wright y Field, es así como la adopción de una u otra dependerá de los recursos (tecnología e instalaciones disponibles) del laboratorio.

De las enfermedades parásitos sanguíneos mencionados, la malaria es una enfermedad parasitaria que constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial.

El diagnóstico de malaria está basado en la observación e identificación de parásitos del género *Plasmodium* en muestras de sangre total. El examen microscópico incluye la gota gruesa y el extendido de sangre periférica como método complementario. El tratamiento adecuado para un paciente con malaria va a depender en gran medida de una adecuada lectura de la gota gruesa la cual debe establecer la especie de *Plasmodium* y la cuantificación del número de estructuras



parasitarias por microlitro de sangre así como también los estadios parasitarios encontrados.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aprender a interpretar la gota gruesa y el extendido de sangre periférico para el diagnóstico de hemoparásitos.

Objetivos específicos

- Conocer las técnicas de elaboración y coloraciones recomendadas para la gota gruesa y extendido de sangre periférico.
- Distinguir las estructuras morfológicas relacionadas con los hemoparásitos.

III. MÉTODO

Examen directo a través de gota gruesa y extendido de sangre periférica.

IV. FUNDAMENTO

GOTA GRUESA

Procedimiento que concentra varias capas de sangre y lisa los hematíes permitiendo visualizar estructuras parasitarias circulantes, leucocitos y plaquetas. La gota gruesa es un procedimiento más eficaz que el extendido puesto que permite observar mayor número de parásitos dado que se estudia mayor cantidad de sangre.

EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA

Permite la visualización de las características morfológicas de los parásitos y su relación con los eritrocitos lo que favorece la identificación de la especie parasitaria.



Es menos sensible que la gota gruesa y en parasitemias bajas este examen suele ser negativo.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Microscopios.
- Laminillas.
- Lancetas y torundas.
- Colorante de Giemsa.
- Colorante de Wright.
- Preparaciones montadas de parásitos sanguíneos.

VI. PROCEDIMIENTO

TOMA DE MUESTRA Y ELABORACIÓN DE LA GOTA GRUESA.

- Con manos enguantadas, realizar la limpieza con alcohol antiséptico y algodón del dedo medio del paciente.
- Después de secar la zona con una torunda de algodón seco, se punciona con una lanceta estéril desechable en el borde lateral del dedo entre la yema y la uña.
- Luego de limpiar la primera gota de sangre con algodón seco, se presiona el dedo y se coloca la siguiente gota en el extremo de la lámina portaobjetos poniendo en contacto dicha lámina por encima de la gota de sangre evitando tocar la incisión realizada en el dedo del paciente.
- Presionar nuevamente el dedo y colocar otra gota a una distancia de 0.5 – 1 cm.
- Extender la gota de sangre realizando un cuadrado homogéneo y de grosor adecuado o a manera de “N”. Con el borde de otra lámina portaobjetos se extiende la sangre realizando el menor número de movimientos sobre las muestras para evitar dañar la morfología del parásito.



- Proporcione al paciente una torunda de algodón seco para que presione con ella la incisión realizada con la lanceta.
- Dejar secar a temperatura ambiente en una superficie plana y libre de polvo.

COLORACIONES

Los colorantes derivados del método original de Romanowsky tienen utilidad para la diferenciación de la mayoría de las estructuras normales y anormales de la sangre. Entre los colorantes de Romanowsky se encuentran: la coloración de Field, Giemsa, Wright y Romanowsky modificada.

Coloración de Field

PRECOLORACIÓN: este proceso ayuda a preservar las células sanguíneas e iniciar el proceso de deshemoglobinización sin alterar la morfología del parásito, además da mejor contraste a la coloración.

- Verificar que la muestra esté completamente seca para que no se desprenda.
- Sumergir la lámina en una solución de azul de metileno por 2 segundos.
- Escurrir la lámina sobre una gasa o papel absorbente para eliminar el exceso de azul de metileno.
- Introducir la lámina en un recipiente que contenga solución amortiguadora pH 7.2.
- Retirar rápidamente, dejar escurrir las láminas para continuar la coloración.

COLORACIÓN: por cada lámina a colorear, adicionar 3 ml. de solución amortiguadora en un tubo, una gota de solución A y una gota de solución B; mezclar suavemente por inversión.

- Colocar la lámina portaobjetos con la muestra hacia abajo sobre la placa cóncava de coloración.



- Adicionar la solución colorante evitando la formación de burbujas y dejar actuar por 9 min. O el tiempo estandarizado.
- Pasado el tiempo de coloración retirar la lámina de la placa cóncava, colocarla en posición vertical en el soporte para dejar escurrir y secar.

LECTURA, CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LA GOTA GRUESA

Para observar la gota gruesa al microscopio, se adiciona una gota de aceite de inmersión y se enfoca con objetivo de 100x.

Para iniciar la búsqueda de formas parasitarias, se observa la muestra siguiendo un recorrido de zigzag de manera continua y ordenada.

Una gota gruesa solo se debe considerar como negativa si no se han encontrado formas parasitarias al observar por lo menos 200 campos microscópicos. Si después de obtener un resultado negativo, persiste la sospecha clínica y epidemiológica de hemoparasitosis, se realizan gotas gruesas seriadas con intervalos de 12 horas hasta completar 48 horas.

En el caso de malaria nunca se debe hacer un diagnóstico sin confirmación parasitaria.

Los parásitos deben tener cromatina, citoplasma, y pigmento malárico este último en estadios maduros y gametocitos.

Si la gota gruesa es positivo, el siguiente paso es determinar la especie del parásito infectante.

En la malaria por *Plasmodium vivax*, se pueden visualizar todas las formas circulantes en sangre tales como trofozoitos jóvenes, trofozoitos maduros, esquizontes y gametocitos.

En malaria por *Plasmodium falciparum*, generalmente se encuentran las formas jóvenes o los gametocitos o las dos formas.



La infección mixta tiene un importante valor epidemiológico puesto que su elevada frecuencia en un área malárica indica un alto grado de transmisión. Desde el punto de vista clínico y terapéutico, el diagnóstico de la infección mixta es definitivo para el tratamiento y la evolución del paciente. La infección mixta más frecuente en Colombia es la asociación de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.

Es importante realizar el recuento para *P. falciparum* debido a que la mortalidad por malaria y la resistencia a los antimaláricos generalmente es dada por esta especie además de que el pronóstico y el tratamiento del paciente dependen de la intensidad de la parasitemia teniendo en cuenta que un recuento $> \text{ó} =$ a 50.000 parásitos/microlitro, indica que se está al frente de una malaria complicada.

En el caso de *P. vivax* no es indispensable realizar el recuento parasitario ya que el tratamiento es el mismo exceptuando los casos en los cuales el paciente se encuentre complicado, no obstante se debe tener cuidado de verificar no estar al frente de una malaria mixta caso en el cual hay que realizar el recuento parasitario informando primero la especie que tenga mayor número y posteriormente la que se encuentra subordinada.

Para determinar el recuento parasitario es necesario hallar el número de parásitos en los campos microscópicos que se requieran para contar 100 leucocitos. En este recuento se asume que el recuento leucocitario de los individuos en promedio es de 8.000 leucocitos por microlitro, por lo tanto la fórmula establecida es:

$$\frac{\# \text{ de parásitos/ microlitro de sangre}}{\text{-----}} = \# \text{ de parásitos} \times 8.000 \text{ leucocitos}$$

100 leucocitos



EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA

Toma de muestra extendido de sangre periférica

- Una vez realizada la punción como se describió en la gota gruesa, proceda a presionar el dedo del paciente.
- Colocar una gota pequeña de sangre de manera delicada a un extremo de la lámina portaobjetos evitando que la lámina toque el dedo del paciente.
- Para realizar el extendido se debe ayudar de otro portaobjetos colocando uno de los extremos del mismo en contacto con la gota de sangre.
- Dejar extender por capilaridad la sangre a lo largo del borde del portaobjetos y con una inclinación de 30 a 40 grados realizar el frotis a lo largo de la lámina.
- El extendido debe tener cabeza, cuerpo y cola para que permita una adecuada lectura.
- Limpiar el dedo del paciente.

Coloración: el colorante que se utiliza con mayor frecuencia es el Wright.

COLORACIÓN DE WRIGHT

- Luego de verificar que el extendido esté completamente seco.
- Cubrir el extendido con el colorante de wright durante 1 min.
- Posteriormente agregar unas gotas de agua destilada sin permitir que se derrame el colorante y dejar actuar por 4 min.
- Pasado el tiempo de coloración, lavar con agua de chorro, colocar en posición vertical en el soporte para dejar escurrir y secar.
- Observar con objetivo de 100 x, describir sus observaciones y resultados.

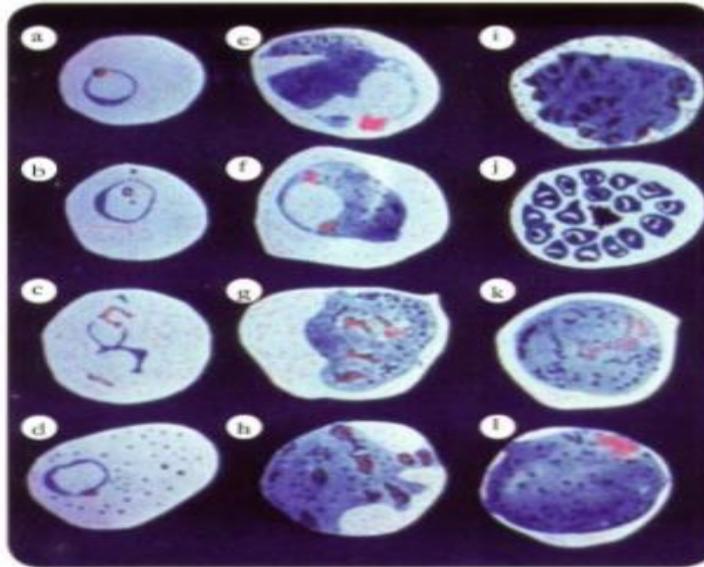


Figura 6-4. *Plasmodium vivax*: a). Trofozoito en anillo; b). Trofozoito en anillo y granulaciones de Schöffner en el eritrocito; c). Trofozoito en crecimiento y granulaciones; d). Trofozoito en anillo en eritrocito de formado y con granulaciones; e). Trofozoito maduro con cromatina grande, granulaciones de Schöffner en el eritrocito y pigmento malárico en el parásito; f). Esquizonte joven con dos cromatinas y granulaciones; g, h, i). Esquizontes en distintas etapas de maduración, tienen pigmento malárico; j). Esquizonte maduro con merozoítos y pigmento malárico en el centro; k). Microgametocito con cromatina difusa y pigmento malárico; l). Macrogametocito con cromatina concentrada y pigmento malárico.

- Dibujar las estructuras observadas y compárelas con el atlas de parasitología e identifique las formas parasitarias presentes.

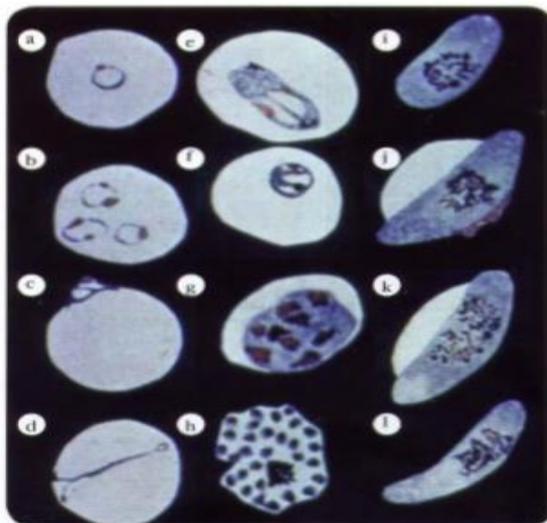


Figura 6-5. *Plasmodium falciparum*: a). Trofozoito pequeño en anillo; b). Multiparasitismo por trofozoítos, algunos con dos cromatinas; c). Trofozoito periférico; d, e, f). Trofozoítos más desarrollados en los capilares de los órganos; g, h). Esquizontes presentes en los capilares, tienen pigmento malárico. Las 5 formas anteriores rara vez se encuentran en sangre circulante; i, j). Macrogametocitos con pigmento malárico; k, l). Microgametocitos con pigmento malárico.

Fuente: Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. 2012.

Fuente: Botero D,
Restrepo M. Parasitosis
Humanas. 2012.



RÁCTICA N° 3
DETERMINACIÓN DE PARÁSITOS POR TÉCNICAS
INMUNOLÓGICAS. DETERMINACIÓN DE CHAGAS AB:
KIT COMERCIAL INMUNOCOMB II

I. INTRODUCCIÓN

La inmunología en las enfermedades parasitarias tiene peculiaridades muy interesantes debido al tamaño de los parásitos y a la gran metamorfosis que sufren a lo largo de su vida, por lo cual también cambian su mosaico antigénico y sus mecanismos de relación con el huésped. El mosaico antigénico de los parásitos comprende antígenos específicos de su grupo zoológico, de especie y de estadio de desarrollo. Además, en su cuerpo tienen antígenos somáticos que nunca entran en juego en la respuesta inmune durante la infección natural, por quedar confinados estos antígenos al interior del parásito y no hacer contacto con el mecanismo inmunocompetente del huésped; en cambio, las secreciones y excreciones de los parásitos, expulsan a través de su boca, ano, etc., desempeñan un papel importante en la sensibilización del huésped.

Además, cuando el parásito muere, sus proteínas sufren desnaturalización y después son liberadas al medio interno del huésped, lo cual hace que los anticuerpos formados correspondan a antígenos modificados del parásito. La persistencia de un estímulo antigénico dado (especialmente a las helmintiasis, el parásito persiste por muchos meses en el huésped), permite la formación de complejos antígeno-anticuerpo, que a su vez se comportan como antígenos y originan una nueva generación de anticuerpos. Cuando la reacción del huésped y la involución del parásito terminan en una lesión fibrosa o calcificada, el paciente puede continuar con su enfermedad, como ocurre en la elefantiasis, pero en ese momento el estímulo antigénico ha terminado y los anticuerpos del huésped habrán de desaparecer.



Considerando los mecanismos patogénicos involucrados en las enfermedades parasitarias, en los cuales frecuentemente se observa que una infección previa condiciona en forma las reacciones del huésped que una nueva infección se acompaña de cuadros patológicos más graves, cabe suponer que no hay esperanzas en los fenómenos inmunológicos inducidos artificialmente como medios de protección de la población humana; con pocas excepciones, las enfermedades parasitarias no producen inmunidad protectora efectiva. Contrariamente, en los últimos años ha ocurrido un avance importante en el diagnóstico inmunológico de las enfermedades parasitarias, y en la actualidad contamos con diversas pruebas de especial utilidad clínica o epidemiológica.

Citaremos algunos ejemplos:

- Intradermorreacciones en leishmaniasis, toxoplasmosis, esquistosomiasis, hidatidosis.
- Reacción de floculación al latex, en amibiasis, enfermedad de Chagas, toxoplasmosis hidatidosis, triquinosis.
- Reacción de hemaglutinación, en amibiasis, malaria, enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, cisticercosis, hidatidosis, fasciolosis, wuchereriasis, toxocariasis.
- Reacción de fijación de complemento en toxoplasmosis, kala-azar, enfermedad de Chagas, esquistosomiasis, cisticercosis, hidatidosis y otras.
- Prueba tintorial en toxoplasmosis.
- Reacción de inmunofluorescencia en malaria, en toxoplasmosis, esquistosomiasis.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aprender a ejecutar prueba basada en ensayo inmunoenzimático en fase sólida indirecto para el apoyo diagnóstico de la enfermedad de Chagas.



Objetivos específicos

- Conocer el fundamento de la prueba por ensayo inmunoenzimático en fase sólida indirecto.
- Aprender a interpretar los resultados de la prueba para la detección cualitativa de los anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

III. MÉTODO

Ensayo inmunoenzimático en fase sólida indirecto.

IV. FUNDAMENTO

El test ImmunoComb® II Chagas AB constituye un ensayo inmunoenzimático en fase sólida indirecto. La fase sólida está constituida por un peine con 12 proyecciones (“dientes”). Cada diente es sensibilizado en dos puntos: Punto superior: inmunoglobulina humana (control interno). Punto inferior: proteínas recombinantes de *Trypanosoma cruzi*. La bandeja de desarrollo tiene 6 filas (A-F) de 12 pocillos. Cada fila contiene una solución reactiva lista para ser utilizada en cada etapa del ensayo. El test es realizado paso a paso, pasando el Peine de fila en fila y con un periodo de incubación en cada una de las etapas. Para comenzar el test, las muestras de suero o plasma deben ser añadidas al diluyente en los pocillos de la fila A de la bandeja de desarrollo. Luego, el peine es insertado dentro de los pocillos de la fila A. Los anticuerpos anti *T. cruzi*, en caso de estar presentes en las muestras, se combinarán específicamente a las proteínas recombinantes en los puntos inferiores del diente del Peine. En forma simultánea, las inmunoglobulinas existentes en las muestras serán capturadas por los anticuerpos a la inmunoglobulina antihumana en el punto superior (Control interno). Los componentes no combinados son lavados en la fila B. En la fila C, las inmunoglobulinas específicas capturadas en los dientes reaccionarán con anticuerpos de clase Ig antihumanos polivalentes conjugados con fosfatasa alcalina. En las dos filas siguientes, los componentes no



combinados son removidos por medio de lavado. En la fila F, la fosfatasa alcalina ligada reaccionará con componentes cromogénicos.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Kit ImmunoComb® II Chagas AB.
- Pipetas de 10 microlitros.
- Puntas.
- Cronómetro.
- Papel absorbente.

VI. MUESTRA

Suero o plasma.

VII. PROCEDIMIENTO

La parte experimental estará basada en las instrucciones del inserto del kit comercial InmunoComb II.

REACCIÓN ANTÍGENO–ANTICUERPO (FILA A DE LA BANDEJA DE DESARROLLO)

1. Extraiga 10 μ l de muestra con la pipeta. Para las muestras guardadas en glicerina-buferada (dilución $\frac{1}{2}$), extraiga 20 μ l. Perfore el papel de aluminio de uno de los pocillos de la fila A de la Bandeja de desarrollo con la punta de la pipeta o con el perforador; coloque la muestra en la parte inferior del pocillo. Mezcle rellenando y expulsando la solución repetidamente. Deseche la punta de la pipeta.
2. Repita el paso número 1 para las otras muestras, incluyendo un Control positivo y un control negativo suministrados con el kit. Utilice un nuevo depósito en la fila A y cambie las puntas de la pipeta para cada muestra o control.



3. A) Inserte el peine (con la cara impresa mirando hacia Ud.) dentro de los pocillos de la fila A que contiene muestras y controles. Mezcle: quite e inserte el peine dentro de los pocillos varias veces.

B) Deje el peine en la Fila A durante 10 minutos exactamente. Configure el cronometrador. Mezcle dos veces más durante la incubación. Un poco antes de finalizar los 10 minutos, perforo el papel de aluminio de la fila B utilizando el perforador. No abra más pocillos de los necesarios.

C) Al cabo de 10 minutos, quite el peine de la fila A. Absorba el líquido adherido de las puntas puntiagudas de los dientes con papel absorbente limpio. No toque la superficie frontal de los dientes. Primer lavado (Fila B)

4. Inserte el peine dentro de los pocillos de la fila B. Agite: quite el peine vigorosamente e insértelo en los pocillos durante 10 segundos por lo menos para obtener un lavado adecuado. Repita esta acción varias veces durante el transcurso de 2 minutos; mientras tanto, perforo el papel de aluminio de la fila C. Al cabo de 2 minutos, quite el peine y absorba el líquido adherido como en el paso 3c. Reacción con el conjugado (Fila C).

5. Inserte el peine dentro de los pocillos de la fila C. Mezcle los peines varias veces. Configure el cronometrador en 10 minutos. Mezcle como en el paso 3B. Perforo el papel de aluminio de la fila D. Al cabo de 10 minutos, quite el peine y absorba el líquido adherido. Segundo lavado (Fila D)

6. Inserte el peine dentro de los pocillos de la fila D. Agite en forma repetida durante 2 minutos, como en el paso 4. Mientras tanto, perforo el papel de aluminio de la fila E. Al cabo de 2 minutos, quite el peine y absorba el líquido adherido. Tercer lavado (Fila E)

7. Inserte el peine dentro de los pocillos de la fila E. Agite en forma repetida durante 2 minutos. Mientras tanto, perforo el papel de aluminio de la fila F. Al



cabo de 2 minutos, quite el peine y absorba el líquido adherido. Reacción de color (Fila F)

8. Inserte el peine dentro de los pocillos de la fila F. Mezcle como en el paso 3a. Configure el cronometrador para 10 minutos. Mezcle como en el paso 3b. Al cabo de 10 minutos, quite el peine. Reacción final (Fila E)

9. Inserte el peine nuevamente en la fila E. Al cabo de 1 minuto, quítelo y déjelo secar al aire. Eliminación de residuos: deseche las bandejas de desarrollo, las puntas de las pipetas, el papel absorbente y los guantes como residuos que constituyen peligro biológico.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- La sola aparición del punto superior (Control Interno) indica que la muestra no es reactiva a los anticuerpos contra *T. cruzi*.
- Un punto circular inferior indica la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi*.

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

- Mencione otros métodos inmunoserológicos que apoyen el diagnóstico de enfermedad de Chagas.
- ¿Cuál es el fundamento de esas pruebas?



PRÁCTICA N°4. ESTUDIO DE PARÁSITOS POR TÉCNICAS MOLECULARES

I. INTRODUCCIÓN

El parasitismo ha sido siempre un importante tema de investigación básica, clínica y aplicada, por lo que no sorprende que la parasitología incorporara los desarrollos de la genética molecular rápidamente y con entusiasmo en el mismo momento en que el uso generalizado de la PCR o la secuenciación de ADN lo hicieron posible. Durante las últimas décadas, el estudio a nivel molecular de los parásitos que afectan a los humanos o a sus cultivos y producciones animales ha sido uno de los frentes más activos en parasitología clínica y aplicada. De hecho, hoy en día se ha secuenciado ya el genoma completo de algunos parásitos de especial importancia socioeconómica, como el que causa la forma más virulenta de malaria humana (*Plasmodium falciparum*). Sin embargo, estos desarrollos metodológicos han tenido más dificultades para implantarse en el estudio de los parásitos que afectan a las poblaciones naturales. De hecho, la utilización de técnicas moleculares de estudio de parásitos es muy reciente en ecología, y su uso sigue estando restringido a unos pocos taxones parásitos.

Probablemente, el principal motivo por el que las técnicas moleculares no se han popularizado entre los parasitólogos es la dificultad de aislar marcadores moleculares a partir de organismos que, en muchas ocasiones, son en sí mismos difíciles de separar de sus hospedadores. Este problema es especialmente acentuado en el caso de los parásitos intracelulares, cuyo ADN es difícil de separar del ADN del hospedador al purificar el material genético a partir de muestras de tejido infectado.

El estudio de la ecología de las relaciones entre parásitos y hospedadores se ha beneficiado recientemente de la aplicación de técnicas moleculares de diagnóstico



e identificación de los parásitos. Dichas técnicas, basadas en la amplificación y secuenciación de un fragmento del ADN de los parásitos, no sólo facilitan enormemente la detección de infecciones, sino que han abierto un nuevo campo de investigación acerca de la diversidad a menudo críptica de estos parásitos, sus patrones de divergencia evolutiva, o sus singularidades ecológicas.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Reconocer la importancia de las técnicas moleculares en el diagnóstico clínico de las parasitosis.

Objetivos específicos

- Conocer los conceptos básicos de las herramientas moleculares aplicadas en el diagnóstico de parasitosis.
- Comparar las metodologías de identificación molecular con respecto a los métodos morfológicos e inmunológicos utilizados en el diagnóstico de parasitosis.

III. MÉTODO

- Identificación basada en ácidos nucleicos.
- Hibridación de ácidos nucleicos.
- Amplificación.
- Digestión enzimática de ácidos nucleicos.

IV. FUNDAMENTO

MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BASADOS EN ÁCIDOS NUCLEICOS

La secuencia de nucleótidos en los ácidos nucleicos constituye una huella dactilar de cada organismo. Detectar y distinguir estas huellas es el arma



más poderosa de la biología molecular. Diferentes técnicas moleculares analizan el ADN o ARN microbianos detectando, identificando y caracterizando gran número de etiologías infecciosas. Como la estructura química de los ácidos nucleicos es idéntica en todos los organismos las mismas técnicas moleculares pueden utilizarse para bacterias, hongos, parásitos y virus.

MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Cada organismo posee secuencias propias y específicas exclusivas de su especie. Las técnicas de hibridación se basan en la propiedad de homología de las bases nitrogenadas, componentes de las cadenas de ácidos nucleicos. Cada cadena puede unirse específicamente a su cadena homóloga por complementariedad de sus bases (adenina se une a timina y citosina a guanina).

La hibridación consiste en disponer de una sonda específica y marcada de alguna manera para enfrentarla a la muestra clínica. La sonda es una secuencia de ADN que corresponde por homología con una secuencia específica del germen que se desea detectar. Además está unida a una molécula fluorescente, radioactiva o a una enzima.

Para realizar hibridaciones en primer lugar el ADN problema se fija permanentemente a un soporte sólido, normalmente una membrana de nitrocelulosa. A continuación se aplica sobre ella la sonda específica y marcada. Si la muestra contiene el germen en cuestión la sonda se unirá a su diana. Tras lavar la sonda no unida se revela la presencia de marca a través de fluorescencia, radioactividad o actividad enzimática.

Las técnicas de hibridación no son muy complicadas de realizar y ofrecen una especificidad excelente. Las sondas marcadas se utilizan mucho en



investigación biomédica y también tiene aplicación en el diagnóstico microbiológico. Por ejemplo la identificación de micobacterias es difícil mediante métodos fenotípicos, así que se utilizan sondas específicas de especie.

MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN

El mecanismo de funcionamiento de la PCR es sencillo. Usa pequeños fragmentos de ADN homólogos a regiones adyacentes a la secuencia que se desea amplificar. Estos fragmentos, denominados primers sirven de punto de inicio para la enzima Taq polimerasa que copia la secuencia de interés. A través de la repetición de ciclos de tres eventos: unión de los primers, polimerización y separación de cadenas hijas, se promueve que se doble la cantidad de ADN en cada ciclo.

En resumen si conocemos las secuencias flanqueantes de los genes específicos de algunas especies podemos fabricar primers homólogos y mediante PCR obtener gran número de copias de gen diana. En muchos casos y cada vez más se aplica la reacción de PCR como diagnóstico. Basta con aplicar la muestra en el tubo de reacción y observar si se produce amplificación. Si es así el germen en cuestión se encuentra presente en la muestra. La detección de ADN amplificado se realiza mediante electroforesis con bromuro de etidio en gel de agarosa.

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La utilización de enzimas de restricción es otra alternativa de diagnóstico. Se trata de enzimas presentes naturalmente en muchos microorganismos. Constituyen un sistema de defensa frente a ADN extraño. Son capaces de detectar secuencias específicas en el ADN y provocar un corte de las cadenas en ese punto. Estas enzimas se han purificado y pueden utilizarse en el laboratorio.



El diagnóstico mediante digestión enzimática consiste en exponer el ADN del microorganismo problema a una de estas enzimas, de modo que se producen cortes en lugares específicos. Los fragmentos se separan por electroforesis en función de su tamaño. Se obtiene así lo que se denomina un patrón de restricción, que no es más que una colección de bandas dispuestas de manera concreta para cada microorganismo y para cada enzima de restricción. Es una huella dactilar que puede compararse con resultados anteriores para decidir si la cepa problema pertenece o no a una determinada especie.

Hay que destacar que la mayoría de las técnicas de biología molecular combinan hibridación, amplificación y digestión enzimática. Los métodos de biología molecular permiten no sólo identificar y caracterizar microorganismos, sino también establecer relaciones filogenéticas entre cepas diferentes e incluso localizar genes de resistencia antibiótica que no se expresen y por tanto fuera del alcance de los estudios fenotípicos.

V. PROCEDIMIENTO

La parte procedimental será desarrollada a través de la lectura y discusión de artículos científicos actualizados sobre diagnóstico de las parasitosis por medio de métodos moleculares.



MÓDULO PRÁCTICO DE MICOLOGÍA

PRÁCTICA 1

TÉCNICAS Y MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones micóticas comprenden un gran número de alteraciones, por lo tanto, el diagnóstico microbiológico es un avance fundamental en la instauración del origen de la infección cuya particularidad primordial es la identificación del agente etiológico causante de la entidad clínica. En lo posible esta debe realizarse a nivel de especie para orientar al tratamiento fúngico.

TOMA Y TRANSPORTE DE LA MUESTRAS

Condiciones

- Es importante que el paciente no esté bajo ningún tratamiento.
- Seleccionar el sitio anatómico adecuado del cual se va a tomar la muestra.
- Evitar la contaminación con flora endógena.
- Las muestras deben ser representativas, abundantes y libres de contaminantes o sustancias que inhiban el crecimiento del hongo. Estas deben recogerse asépticamente, utilizando frascos estériles y remitirlas al laboratorio antes de 2 horas.
- Los hisopos deben ser evitados, pero hay muestras que lo requieren, como por ejemplo las de conducto auditivo, vagina y cérvix.
- En el caso de heridas abiertas, drenajes o lesiones superficiales, debe limpiarse la zona previamente con etanol (70%) para evitar contaminaciones.



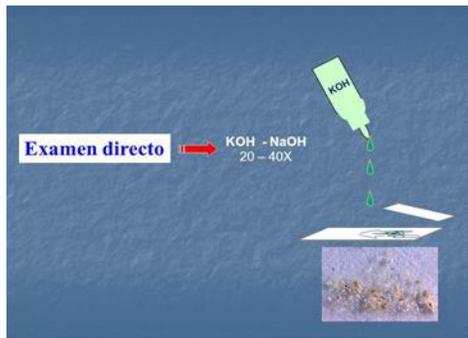
- Las muestras de lesiones cerradas y abscesos deben ser aspiradas con jeringa y transferidas a un frasco estéril.
- El raspado de lesiones de piel y faneras (pelos y uñas) puede recolectarse con distintos materiales; los más utilizados son bisturí, moqueta o cepillo.
- En situaciones que requieran un estudio epidemiológico debe establecerse la necesidad de una recogida ambiental, familiar o de animales.

Transporte de las muestras

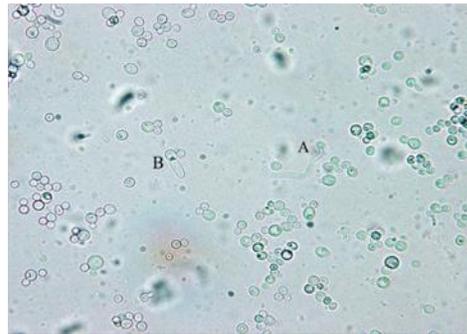
Las muestras deben ser transportadas en un recipiente estéril, humidificado y a prueba de vertidos. Sin embargo, las muestras dermatológicas pueden transportarse en un recipiente seco o, de forma ideal, sembrarla directamente sobre el medio de cultivo; no deben introducirse en medios de transporte, a no ser que sea fácil retirar la muestra del medio. Los raspados corneales y hemocultivos deben sembrarse directamente en el medio de cultivo adecuado. Las muestras cuyo transporte se prolongue más de 2 horas deben almacenarse a 4°C, excepto la sangre y los líquidos estériles (30-37°C) y las muestras dermatológicas (15-30°C).

EXAMEN DIRECTO

El examen directo es sencillo, rápido y permite observar las estructuras micóticas. Se realiza a partir de productos anatomopatológicos como escamas, pelos y exudados, expectoración u otros líquidos.



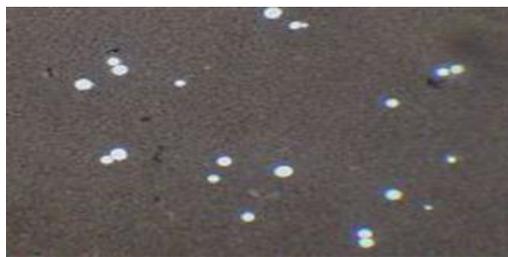
Fuente: <https://slideplayer.es/slide/118161/>



Fuente: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci#fig1>

Fig. 1 Examen directo KOH

- **KOH al 10 %.** Digiere el material proteico, aclara pigmentos y disuelve el “cemento” que mantiene pegadas a las células queratinizadas y las de otros tejidos, ello permite observar los elementos fúngicos que estén presentes.
- **Tinta china/ nigrosina:** Es la técnica más ampliamente utilizada para poner de manifiesto la cápsula de *C. neoformans*. La cápsula aparece como un halo claro y nítido en torno a una levadura redonda, delimitada por las partículas de carbón en suspensión coloidal de la tinta china, exhibiendo un nítido contraste.



Fuente; <http://www.bio-nica.info/biblioteca/TincionBacterias.pdf>

Fig. 2 Tinta China/ nigrosina

- **Blanco de calcoflúor:** se basa en la propiedad que tiene este fluorocromo de unirse de forma inespecífica a los residuos b-1,3 presentes en polisacáridos como la celulosa y la quitina de la pared celular de los hongos.

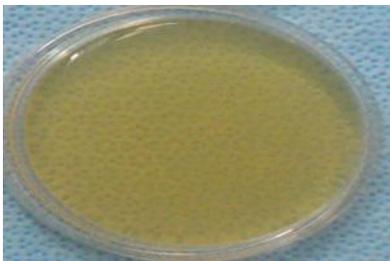
- **Azul de lactofenol:** Permite conservar mejor la integridad de los elementos durante mayor tiempo; tiene tres características especiales, el fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide se rompa; destruye la flora acompañante inactivando la célula y quitándole patogenicidad; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al provocar una capa protectora.

CULTIVOS

Es el método más utilizado en el diagnóstico de las micosis, ya que una vez aislado el hongo permite la identificación a nivel de especie, los estudios de sensibilidad in vitro a los antifúngicos y los estudios de caracterización.

El tiempo de crecimiento de los hongos está determinado genéticamente y puede variar de unas pocas horas a varios días. En general, las levaduras pueden detectarse tras 24 a 72 horas de cultivo, mientras que los hongos filamentosos necesitan más de 48 horas, como en el caso de los mucorales, o 33 días como por ejemplo *Blastomyces dermatitis*.

Para algunos hongos, el cultivo se considera el método de referencia y establece el diagnóstico definitivo, por ejemplo en criptococosis. Sin embargo en cultivo de uñas podemos tener cultivos negativos, así el examen directo sea positivo; esto es debido a que las células fúngicas no son viables en la queratina ungueal, por lo que la toma de muestras se debe repetir un mínimo de 3 a 4 veces para aislar el hongo.



<http://www.atenaiberica.com/>
Fig. 3 Agar sabouraud



<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/.pdf>
Fig. 4 Colonias grandes cremosas



AUXONOGRAMA Y ZIMOGRAMA

Son importantes en levaduras para definir la especie con base en las características fisiológicas. AUXONOGRAMA, es la utilización de productos con carbono o nitrógeno. ZIMOGRAMA, es la fermentación de azúcares.

- **Auxonograma:** se basa en la utilización (oxidación) o asimilación de los carbohidratos. Se fundamenta en nutrientes hidrocarbonados o nitrogenados
- **Zimograma o fermentación de carbohidratos:** las propiedades fermentativas se basan en la producción de ácido y gas. La producción de ácido se evidencia por el cambio de color del indicador de pH de morado a amarillo y el gas se observa por la acumulación de este en la campana de Durham.

Todos estos métodos han sido reemplazados por métodos modificados más recientes: API 20C, API 32C, Vitek®, Uni-Yeast-Tek®, Minitek®, Yeast-Ident®, MicroScan®

BIOPSIAS

Es una técnica alternativa muy empleada para el diagnóstico de las micosis invasoras; plata metenamina y PAS se considera una prueba definitiva de la invasión tisular. El patólogo, con una metodología sencilla y rápida, puede llegar a diagnosticar algunos tipos de micosis, pero no solo identifica el agente causante, sino el tipo de lesión que produce, la respuesta inflamatoria y el órgano u órganos afectados, además puede clasificar el tipo de micosis en superficial, cutánea, subcutánea, profunda o sistémica en virtud de la localización.



OTRAS TÉCNICAS

La detección de ADN fúngico en la muestra clínica es otra posibilidad para el diagnóstico de micosis invasora, como por ejemplo la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencia conservada para todos los hongos (PCR panfúngica) o de secuencias específicas de una especie concreta (PCR específica) y la utilización de sondas de ADN. La utilización de biochips, los cuales se basan en la hibridación de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en la muestra clínica con miles de oligonucleótidos que se encuentran en el soporte de vidrio, permiten encontrar secuencias específicas para la identificación de los hongos patógenos y para la detección de mutaciones que confieran resistencia o factores de virulencia.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer las diferentes técnicas y métodos para la identificación de los hongos causantes de patologías clínicas con el fin de establecer el diagnóstico.

Objetivos específicos

- Conocer los diferentes métodos de diagnóstico micológico para hongos causantes de patologías médicas.
- Conocer las condiciones del paciente antes de tomar la muestra y como se debe transportar al laboratorio.
- Aprender a realizar montaje con KOH y azul de lactofenol a partir de los cultivos.
- Conocer las principales características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) de los hongos a partir de cultivos.



III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- **Reactivos**

- Azul de lactofenol.
- Koh al 10%.

- **Materiales**

- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Cultivo de hongos.
- Cinta adhesiva.

- **Equipos**

- Microscopios.
- Asas bacteriológicas.
- Mecheros.

IV. MUESTRA

Cultivo de hongos

V. PROCEDIMIENTO

1. Tomar una porción de las colonias obtenidas del cultivo
2. Realizar montajes con Azul de lactofenol y KOH entre lámina y laminilla.
3. Observar al microscopio con objetivo de 10 x y 40 x.

VI. TALLER DE PREGUNTAS

1. Realizar una descripción de las características microscópicas de las estructuras fúngicas a través de montajes con azul de lactofenol a partir del crecimiento obtenido en el cultivo
2. Dibujar las estructuras fúngicas observadas.



PRÁCTICA N° 2 HONGOS DEL AMBIENTE

I. INTRODUCCIÓN

En el medio ambiente (aire, suelo, agua) se encuentra como parte de la flora microbiana, un gran número de especies de hongos. Estos se han adaptado a las condiciones de temperatura, humedad, presencia de ciertos nutrientes y otras series de factores propios de cada zona ecológica.

Los hongos del ambiente bien merecen ser tenidos en cuenta por dos razones muy importantes:

- Como contaminantes en el laboratorio, bien sea a nivel de cultivos, de muestras de materiales patológicos o del material que se emplea para realizar el trabajo en el laboratorio: medio de cultivos, soluciones, vidriería, instrumental entre otros.
- Como agentes etiológicos de algunas enfermedades considerándose en este caso como oportunistas.

En ambos casos es necesario interpretar su presencia en una muestra determinada, haciendo en cada caso la diferenciación entre agente etiológico y contaminante. El aspecto macroscópico de la colonia junto con las estructuras que se observan al microscopio, permiten la identificación y clasificación correcta de los hongos ambientales.



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer los hongos del ambiente que se comportan como oportunistas y contaminantes del material médico.

Objetivos específicos

- Identificar los contaminantes que se presentan con más frecuencia en el laboratorio.
- Interpretar la presencia de un hongo contaminante crecido en un cultivo de un material patológico.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- **Reactivos**
 - Azul de lactofenol.
 - Hidroxido de potasio al 10%.
 - Agar saboraud.
- **Materiales**
 - Portaobjetos.
 - Cubreobjetos.
 - Asas bacteriológicas.
 - Placas de hongos.
- **Equipos**
 - Microscopios.



IV. MUESTRA

Colonias obtenidas en los agares saboraud durante una semana de incubación a temperatura ambiente y expuesta durante 15 minutos al aire en diferentes sitios de las instalaciones del CEID.

V. PROCEDIMIENTO

1. Observar el color, tamaño, textura, bordes, entre otros. Diferenciar entre colonias de moho y levadura.
2. Reconocer la consistencia de las colonias de hongos: algodonosa, pulverulenta, granulosa, lanosa, aterciopelada, vellosa.
3. Observar el aspecto de las colonias: plana, acuminada, crateriforme, plegada, radiada.
4. Observar el color tanto en el anverso como en el reverso.
5. Anotar si hay o no presencia de pigmentos difusibles al agar.



PRÁCTICA N° 3 MICOSIS SUPERFICIALES

I. INTRODUCCIÓN

Las micosis se clasifican atendiendo a su localización anatomoclínica tanto en los hospedadores inmunocompetentes como en los inmunodeprimidos y agrupando en algunas ocasiones diversos agentes etiológicos, según este criterio las podemos clasificar en:

- **Micosis superficiales:** Se refiere a una diversidad de cuadros clínicos en los que están involucrados la piel y sus anexos. Las manifestaciones en piel son prurito, eritema y descamación; en cuero cabelludo son alopecia e invasión al cabello tipo endothrix, ectrothrix y tipo fávico; y en uñas, onicomycosis.
- **Micosis Subcutáneas:** Son infecciones del tejido celular subcutáneo, adquiridas por trauma con material contaminado por hongos saprofitos ambientales. Afectan la dermis y epidermis y las manifestaciones clínicas son crónicas; se pueden caracterizar por ser inflamatorias y granulomatosas.
- **Micosis Sistémicas:** Este tipo de micosis se adquieren por inhalación de propágulos de los hongos que están en el medio ambiente, muchas veces en nichos ecológicos muy restringidos. Causan cuadros clínicos que dependen del estado inmunológico del huésped y de la cantidad de propágulos inhalados, y pueden ser desde cuadros asintomáticos inespecíficos, hasta procesos pulmonares granulomatosos; en pacientes inmunocomprometidos se manifiesta de forma generalizada.
- **Micosis Oportunistas:** Este tipo de micosis involucra especies de hongos que forman parte de la microflora ambiental o son comensales de la piel y mucosa, y quienes habitualmente son eliminadas por el sistema inmune celular. Cuando hay deficiencia de la respuesta inmune, alteraciones de la flora bacteriana por suministro de antibióticos o la existencia de

enfermedades de base en el paciente, como por ejemplo la diabetes o enfermedades mieloproliferativas con neutropenia, pueden causar una infección diseminada fatal para el paciente.

- **Micosis superficiales sistémicas.** Son las que afectan la capa córnea de la piel y la porción suprafolicular del cabello y vellos, generalmente asintomáticas por la poca o nula respuesta inmune.

PITIRIASIS VERSICOLOR

Producida por especies del hongo lipofílico *Malassezia*: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodiales*, hongo que puede ser colonizante de la epidermis; se relaciona con la presencia de ciertos aminoácidos y compuestos hidrófobos en la piel, así como la disminución del recambio epitelial del estrato córneo. El cuadro clínico se manifiesta por la presencia de lesiones maculares híper o hipopigmentadas en la piel del tórax, parte superior de la espalda y brazos. Las especies del hongo *Malassezia* pueden estar involucradas en otros cuadros clínicos como la dermatitis seborreica, foliculitis en pacientes inmunocomprometidos, fungemia en lactantes prematuros en nutrición parenteral con emulsiones lipídicas y síndrome de Gougerot-Carteaud, que es una papilomatosis en región intermamaria, interescapular, cuello y abdomen.

Malassezia	Microscópica con koh	Macroscópica cultivo
	Blastoconidias y fragmentos de hifas	

Fig.4 Malassezia examen directo y cultivo

Fuente: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144838/mod_page/content/1/otos_superficiales/MZ-D_015.jpg

TIÑA NEGRA PALMAR

Infección crónica del estrato córneo causada por el hongo levaduriforme dematiaceo *Phaeoannelomyces werneckii*, que consiste en lesiones maculares color oscuro afectando principalmente las palmas de las manos y las plantas de los pies, rara vez en la cara.

<i>Hortaea werneckii</i>	Microscópica	Macroscópica
	Aneloconidias con un septo central, un extremo redondeado y otro cónico, inicialmente hialino, luego verde.	

Fig. 5 Examen directo y Cultivo

Fuente: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144839/mod_page/content/1/otos_superficiales/HW-C_004.jpg

PIEDRA NEGRA

Son nódulos duros, negros, adheridos a la porción extrafolicular del cabello, producida por la forma sexual del hongo *Piedraia hortae*.

<i>Piedraia hortae</i>	Microscopia	Macroscópica
	Nódulo pigmentado o ascocarpo con tejido pseudoparanquimatoso que al presionarse libera ascas que tienen 8 ascospora	

Fig. 6 Examen directo con KOH y Cultivo

Fuente: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144837/mod_page/content/1/otos_superficiales/PN-003.jpg

PIEDRA BLANCA

Son nódulos blandos de color blanquecino que se pueden localizar en vellos de cejas, bigote o pelo escrotal y vulva, al igual que en cabello de la cabeza. Es producida por colonización de especies del hongo levaduriforme *Trichosporum*: *T. asteroides*, *T. beigelii/cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. pullulans*. Este

hongo también se ha asociado a fungemia en pacientes inmunosuprimidos, especialmente VIH positivos.

Trichosporum	Microscopia	Macroscópica
	Nódulo de color azul unido al pelo con arthroconidias e hifas en su interior	

Fig. 7 Examen directo con KOH y Cultivo

http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144836/mod_page/content/1/fotos_su_perficiales/PB-015.jpg

DERMATOFITOSIS

Producida por un grupo de hongos queratinolíticos identificados como dermatofitos: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*. Sus cuadros clínicos se denominan tiñas y se encuentran entre las infecciones más prevalentes a nivel mundial, principalmente en países en desarrollo.

Las Tiñas del cuero cabelludo son: Tiña capitis no inflamatoria, tiña capitis inflamatoria, con formación de queriom de celso y tiña fávica. Las otras, dependiendo del lugar del cuerpo comprometido son: Tiña barbae, Tiña córporis, Tiña manum, Tiña ungiu u onicomycosis, Tiña cruris y Tiña pedis.

Los propágulos infectantes son los arthroconidios, que son adquiridos por contacto directo, se adhieren especialmente a los corneocitos, germinan y penetran al estrato corneo formando ramificaciones de hifas; la invasión es favorecida por las condiciones específicas de este hábitat: células muertas, temperatura inferior a 37°C, humedad adecuada y aporte suficiente de hierro y otros nutrientes.

DERMATOMICOSIS

Son infecciones crónicas que afectan la piel altamente queratinizada de palmas, plantas, uñas y espacios interdigitales. Los cuadros clínicos son muy similares a las tiñas producidas por dermatofitos, pero el tratamiento es diferente. Dentro de los



principales agentes etiológicos están los hongos hialinos como el *Scytalidium dimidiatum*.

S. hyalinum, *Fusarium sp*, *Aspergillus spp*, especies de *Cándida* y hongos negros como especies del género *Phialophora*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Bipolares*, entre otros.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Familiarizarse con las diferentes muestras micológicas para la identificación y el diagnóstico de las micosis superficiales

Objetivos específicos

- Distinguir las muestras que se deben tomar para realizar el diagnóstico de las micosis superficiales.
- Aprender a procesar las muestras para observar las características microscópicas en los exámenes directos.
- Aprender a cultivar en los agares que se utilizan en el laboratorio de micología para el diagnóstico de las micosis superficiales.
- Identificar las características macroscópicas y microscópicas de las colonias obtenidas en el cultivo.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

• Reactivos

- Agar saboraud suplementado con cloranfenicol.
- Hidróxido de potasio al 10%.
- Azul de lactofenol.

• Materiales

- Alcohol.
- Algodón.



- Lancetas.
- **Equipos**
 - Microscopios.

IV. MUESTRA

Colonias de cultivos previamente sembrados.

V. PROCEDIMIENTO

1. Toma de muestra: Pelos, escamas, raspados de uñas, detritus subungueales.
2. Examen Directo: KOH al 10%, azul de lactofenol. Se observan estructuras fúngicas tales como filamentos largos o tabicados o artrosporados, parasitación ectothrix, parasitación endothrix.
3. Cultivo: Las muestras se siembran con escobillones estériles o con asa de platino previamente calentada al rojo vivo. En general se colocan los especímenes en la superficie del medio de cultivo y se conservan a temperatura ambiente, los pelos y escamas se siembran en diferentes puntos de la superficie del agar y cerca de la pared del vidrio.
4. Revisar los cultivos

VI. TALLER DE PREGUNTAS

- Describa las estructuras micóticas observadas en el examen directo.
- Observar el color, tamaño, textura y bordes, entre otros, de las colonias obtenidas.
- Reconocer la consistencia de las colonias de hongos: algodonosa, pulverulenta, granulosa, lanosa, aterciopelada, vellosa.
- Observar el aspecto de las colonias: plana, acuminada, crateriforme, plegada, radiada.



- Describir las estructuras micóticas observadas en el examen con azul de lactofenol.



PRÁCTICA N°4. MICOSIS PROFUNDAS

I. INTRODUCCIÓN

Las micosis profundas son enfermedades frecuentes en países en vías de desarrollo y desarrollados, su diseminación puede estar favorecida por las condiciones del medio que faciliten el crecimiento del hongo que las ocasiona. Representan un grupo de hongos que tienen la capacidad de afectar órganos internos y piel teniendo como vías de entrada inhalatoria y cutánea y por medio de ella diseminarse a otros órganos. Se pueden clasificar en:

1) SUBCUTANEAS. Son infecciones del tejido celular subcutáneo, adquiridas por trauma con material contaminado por hongos saprofitos ambientales. Afectan la dermis y epidermis y las manifestaciones clínicas son crónicas. Se pueden caracterizar por ser inflamatorias y granulomatosas.

- a. **Esporotricosis.** El hongo que la produce se denomina *Sporothrix schenckii*. Después de un período de incubación de 15 a 30 días (se ha reportado hasta 2 años) se produce una lesión nodular, denominada chancro, en el tejido cutáneo y subcutáneo en el sitio de inoculación. Clínicamente se pueden producir diferentes cuadros como la esporotricosis linfocutánea, que compromete vasos linfáticos drenantes; la fija o dermoepidérmica, con lesión única y sin compromiso de vasos linfáticos; la pulmonar primaria, que se observa en pacientes inmunosuprimidos, se adquiere por inhalación y simula una tuberculosis cavitaria; la pulmonar metastásica; la osteoarticular, forma diseminada en huesos y articulaciones; la esporotricosis invasiva generalizada, que es rara; y se han descrito casos de formas meníngeas y oculares en pacientes inmunosuprimidos.



- b. **Cromoblastomycosis.** Micosis producida por un grupo de hongos dematiaceos, tales como *Fonsecae pedrosoi*, *Fonsecae compactum*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* y *Rhinocladiella aquasperma*. Las lesiones son crónicas, de meses a años, y en las muestras clínicas se observan las células escleróticas de medlar o células fumagoides que son patognomónicas de esta entidad.
- c. **Lobomycosis.** Producida por el hongo *Loboa lobo*, con lesiones crónicas tipo queloides en sitios anatómicos expuestos, como por ejemplo la región sacra, miembros inferiores, superiores y región auricular.
- d. **Rinosporidiasis.** El agente etiológico no es un hongo, es un microorganismo acuático perteneciente al reino *Stromophila* denominado *Rhinosporidium seeberii*. La rinosporidiosis se caracteriza por la formación de lesiones polipoides, pedunculadas y papilomatosas que obstruyen los conductos aéreos, la nasofaringe, laringe y conjuntivas.
- e. **Eumicetomas.** Infección de carácter crónico que se adquiere por trauma con material contaminado por hongos como *Madurella mycetomatis* y *Exophiala sp.* El cuadro clínico se caracteriza por fistulización, edemas y gránulos de azufre.
- f. **Faeohifomycosis.** Infección por inoculación traumática de hongos dematiaceos, como por ejemplo *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia geniculata*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala moniliae*, *Wangiella dermatitidis*. En las lesiones se observan hifas pigmentadas y no células escleróticas. Estos hongos también pueden causar infección cutánea y sistémica.



g. **Hialohifomicosis.** Infección por inoculación traumática de hongos hialinos a nivel subcutáneo, pero también puede cursar con compromiso sistémico. Los pacientes inmunocomprometidos los pueden adquirir por vía aérea, por ejemplo infección por *Fusarium spp*, y *Aspergillus spp*.

2) **SISTÉMICAS.** Este tipo de micosis se adquieren por inhalación de propágulos de los hongos que están en el medio ambiente, muchas veces en nichos ecológicos muy restringidos. Causan cuadros clínicos que dependen del estado inmunológico del huésped y de la cantidad de propágulos inhalados, y pueden ser desde cuadros asintomáticos inespecíficos, hasta procesos pulmonares granulomatosos; en pacientes inmunocomprometidos se manifiesta de forma generalizada.

a. **Histoplasmosis.** Es producida por el hongo *Histoplasma capsulatum* variedad *capsulatum*, que predomina en América, desde el sur de Canadá hasta Argentina, y la variedad *duboisii*, en el África. Su nicho son cuevas de murciélagos, gallineros y palomares. Dentro de las formas clínicas tenemos la presentación aguda y crónica, la pulmonar (asintomática, leve, moderada, grave, neumónica o cavitada), la diseminada, de leve a progresiva, y la mucocutánea.

b. **Blastomicosis.** Infección causada por *Blastomyces dermatitidis*, cuyo nicho ecológico es el suelo de gallineros, corrales y establos, terrenos con alto contenido orgánico, abonados o con deyecciones de animales, pH ácido y elevada humedad.

La infección es crónica, con lesiones granulomatosas y supurativas; la más frecuente es la pulmonar (aguda o crónica), pero también se presenta la forma extrapulmonar crónica con afección de piel, huesos



y tracto genitourinario, la forma aguda fulminante y las formas asintomáticas.

- c. **Coccidioidomicosis.** Infección causada por *Coccidioides immitis* en zonas endémicas desde el sudoeste estadounidense, Centro América, Venezuela, Paraguay hasta la Patagonia en Argentina. La inhalación de artroconidios puede causar un cuadro pulmonar con o sin diseminación sistémica (ósea, meníngea y cutánea) principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

- d. **Paracoccidioidomicosis.** Micosis granulomatosa producida por el hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, restringido a zonas boscosas de los grandes ríos y lagos del Brasil, Venezuela, Colombia, Paraguay y norte de Argentina. La infección puede ser asintomática o sintomática, como la forma juvenil aguda, con compromiso pulmonar y del sistema reticuloendotelial, con adenopatías, hepatomegalia y afección ósea, o como la forma crónica del adulto con lesiones pulmonares y metástasis a diversos órganos, y lesiones en mucosa orofaríngea y ulcero-vegetativas peribucales.

- e. **Criptococosis.** Infección subaguda o crónica pulmonar o meníngea causada por *Cryptococcus neoformans*, hongo ubicuo en la naturaleza principalmente en excretas de palomas y detritus de árboles. Las levaduras desecadas y de menor tamaño son inhaladas, llegan a espacios alveolares, pero el desarrollo de la enfermedad depende de la respuesta del sistema inmune celular. Aunque el foco primario es el pulmón, el tropismo por el Sistema Nervioso Central (SNC) puede llevar a diseminación a meninges; en pacientes inmunosuprimidos puede haber presentación clínica mucocutánea que corresponde a



metástasis de la forma diseminada.

3) OPORTUNISTAS. Este tipo de micosis involucra especies de hongos que forman parte de la microflora ambiental o son comensales de la piel y mucosa y quienes habitualmente son eliminadas por el sistema inmune celular. Cuando hay deficiencia de la respuesta inmune, alteraciones de la flora bacteriana por suministro de antibióticos o la existencia de enfermedades de base en el paciente, como por ejemplo la diabetes o enfermedades mieloproliferativas con neutropenia, pueden causar una infección diseminada fatal para el paciente.

- a. **Candidiasis sistémica.** Es la micosis más frecuente. Es producida por *Cándida albicans* y otras especies del mismo género, capaces de invadir sangre y otros órganos profundos. Las levaduras de *Cándida* son colonizadoras de la mucosa rectal, vaginal y bucal, por lo que las infecciones pueden ser endógenas; también se ha demostrado la transmisión interpersonal o como resultado de contaminación con sondas y catéteres.

- b. **Aspergilosis sistémica.** Es producida por especies del género *Aspergillus*. *Aspergillus fumigatus* es el agente causal de más del 90% de los casos de aspergilosis invasora; se adquiere por inhalación de conidios, que germinan e invaden los tejidos. Los pacientes con neutropenia prolongada conforman el principal grupo de pacientes con riesgo para adquirir esta grave infección, al igual que pacientes leucémicos y receptores de órganos, los cuales pueden sufrir aspergilosis pulmonar invasora o aspergilosis sistémica con compromiso del SNC, infarto cerebral, vasculitis o abscesos cerebrales.



- c. **Zigomicosis.** Infecciones causadas por hongos pertenecientes a los mucorales: *Mucor spp*, *Rhizomucors spp*, *Rhizopus spp*, *Cunninhanella spp*, etc. Su hábitat es la materia orgánica en descomposición. Causan cuadros principalmente subcutáneos, pero formas sistémicas han sido también descritas, siendo la más frecuente la rinocerebral; también se puede presentar a nivel pulmonar, cutáneo, intestinal, en SNC, periorbitaria y nasal.
- d. **Pneumocistosis.** Neumonía causada por el hongo *Pneumocystis jiroveci* y que afecta pacientes inmunocomprometidos, principalmente VIH positivos.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Reconocer las estructuras fúngicas comprometidas en las micosis profundas mediante la observación de las láminas de micología que dispone el laboratorio CEID.

Objetivo específico

- Observar y describir las características morfológicas de los hongos que ocasionan las micosis profundas

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- **Materiales**
 - Láminas de hongos.
- **Equipos**
 - Microscopios.
 -



IV. PROCEDIMIENTO

Observación de las láminas de micología que proporciona el laboratorio CEID para el reconocimiento de las estructuras fúngicas comprometidas en las micosis profundas.

V. TALLER DE PREGUNTAS

- Describir las estructuras micóticas observadas en el microscopio.



BIBLIOGRAFIA

1. Crespo MP. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Colomb Méd.* 2000; 31(3), 135-150. Disponible: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/166/168>
2. Tapia LI. Laboratorio de virología en la práctica clínica. *Rev. méd. Clín. Las Condes.* 2015; 26(6), 744-752. Disponible: https://ac.els-cdn.com/S0716864015001509/1-s2.0-S0716864015001509-main.pdf?tid=210d6964-3721-43ce-924e-12a35ff5921c&acdnat=1531848121_e61bdfdb549d58aa12730fe73850ff25
3. <http://www.who.int/es>. Organización Mundial de la Salud. Virus del herpes simple. [Internet]. Ginebra: OMS; 2017 [actualizado 23 nov 2018; citado 26 nov 2018 disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
4. Martínez G MJ. Diagnóstico microbiológico de infecciones de transmisión Sexual: Parte II. ITS virales. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2010 Feb [citado 26 Nov 2018]; 27(1):60-64. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182010000100010&lng=pt.
5. studylib.es. Prueba ELISA para la detección de anticuerpos IgG Anti-Herpes Simplex 1 en suero humano. Human Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica mbH. [Internet]. Alemania: Human; 2004. Ficha Técnica



- VHS1 IgG Human Ref 51216. [citado 16 de jul 2018] Disponible: <http://studylib.es/doc/6950295/hsv-igg>
6. Levinson W. Microbiología e inmunología médicas. 8ª ed. Madrid: MacGraw-Hill. 2004.
 7. Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay for immunoglobulin G. Immunochemistry [Internet]. 1971 [citado 16 de jul 2018]; 8(9):871-874. Disponible en: [Enzyme-linked immunosorbent assay \(ELISA\) quantitative assay of immunoglobulin G](#)
 8. Engvall, E., Perlmann, P., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes, J. Immunol. [Internet]. 1972 [citado 16 de jul 2018]; 109(1):129-135. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/109/1/129.long>
 9. Remington JS, Klein JO. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. [Internet]. 6ª ed. Sanders, Philadelphia, London, Toronto; 1976 [actualizado 2006; citado 16 de jul 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/book/9780721605371/infectious-diseases-of-the-fetus-and-newborn-infant> -
 10. Bidwell DE et al . Enzyme-immunoassays for viral diseases. J. Infect. Dis. HMW, [Internet]. 1977 [citado 16 de jul 2018]; 136 Suppl: S274-278 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/198490> - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/198490>



11. Volk WA. Essentials of Medical Microbiology. [Internet]. 2a ed., J.B. Philadelphia, New York, San Jose, Toronto: Lippincott Company: 1982 574-576 [citado 16 de jul 2018]
12. <https://www.ins.gov.co> Instituto nacional de Salud. Protocolo de vigilancia en salud pública. DENGUE Código: 210-220-580. FOR-R02.0000-059 V02 22-12. [Internet]; Bogotá; Instituto nacional de Salud [actualización 7 mar 2018; consultado 13 jul 2018] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/ZIKA%20Lineamientos/Dengue%20PROTOCOLO.pdf>
13. <http://www.who.int/es>. Organización Mundial de la Salud. Dengue. Dengue y dengue grave. [Internet]. Ginebra: OMS; 2018 [actualizado 23 nov 2018; citado el 13 de julio de 2018] Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
14. sistemainterno.com. Hexagon Dengue. Prueba rápida inmunocromatográfica para la detección de anticuerpos IgG e IgM hacia el virus del dengue. [Internet]. Alemania: Human; 2007. Ficha Técnica Dengue Human Ref 58082. [citado 13 de jul 2018] Disponible: http://sistemainterno.com/web/gaamsa/files/2012/11/gaamsa_ficha_tecnica_dengue_human.pdf
15. <http://www.who.int/es>. Organización Mundial de la Salud. Dengue haemorrhagic fever. [Internet]. Ginebra: OMS; 1997 [actualizado 23 nov 2018; citado el 13 de julio de 2018] Disponible en: http://search.who.int/search?q=Dengue+haemorrhagic+fever+&ie=utf8&site=who&client=es_r&hl=lang_es&lr=lang_es&proxystylesheet=es_r&output=xml_no_dtd&oe=utf8



16. Kao CL King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J. Microbiol. Immunol. Infec* [Internet]. 2005 [citado 13 de jul 2018]; 38, 5-16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692621>
17. De Paula S, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz. J. Infect. Dis.* [Internet]. 2004 [citado 13 de jul 2018]; 8(6):390-8. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702004000600002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
18. Crespo MP. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Colomb Méd.* 2000; 31(3), 135-150. Disponible: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/166/168>
19. Tapia LI. Laboratorio de virología en la práctica clínica. *Rev. méd. Clín. Las Condes.* 2015; 26(6), 744-752. Disponible: https://ac.els-cdn.com/S0716864015001509/1-s2.0-S0716864015001509-main.pdf?_tid=210d6964-3721-43ce-924e-12a35ff5921c&acdnat=1531848121_e61bdfdb549d58aa12730fe73850ff25
20. Martínez G MJ. Diagnóstico microbiológico de infecciones de transmisión Sexual: Parte II. ITS virales. *Rev. chil. infectol.* [Internet]. 2010 Feb [citado 26 Nov 2018]; 27(1):60-64. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182010000100010&lng=pt. [http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182010000100010.](http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182010000100010) - https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182010000100010&lng=pt. <http://>
21. Levinson W. (2004). *Microbiología e inmunología médicas*. 8ª ed. Madrid, España: MacGraw-Hill; 2004.



22. <https://www.ins.gov.co> Instituto nacional de Salud. Protocolo de vigilancia en salud pública. VIH Código: 210-220-580. PRO-R02.0000-59V02 22-12. [Internet]; Bogotá; Instituto nacional de Salud [actualización 7 mar 218; consultado 13 jul 2018] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/ZIKA%20Lineamientos/PRO%20VIH%20-%20SIDA.pdf>
23. www.bganalizadores.com.ar. Hexagon VIH. Prueba rápida inmunocromatográfica de 3ª generación para la detección de anticuerpos contra los virus 1 y 2 de la inmunodeficiencia humana. [Internet]. Alemania: Human; 2005. Ficha Técnica VIH Human Ref 57002 [citado 13 de jul 2018] Disponible en: <http://www.bganalizadores.com.ar/img/a5fab28cc557d04c5659d2d8320b749fHEXAGON%20HIV%201-2.pdf>
24. <http://www.who.int/es>. Organización Mundial de la Salud. VIH/SIDA. [Internet]. Ginebra: OMS; 1997 [actualizado 23 nov 2018; citado el 13 de julio de 2018] Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/hiv-aids>
25. Procop G, Church D, Hall G, Janda W, Koneman E. Diagnóstico Microbiológico 7ª ed. Médica Panamericana; 2017.
26. Diaz-Gamazo. Manual Práctico De Microbiologia 3ª ed. Masson. 2005.
27. Orjuela – López O, Velez – Rodriguez A, Gallego C. Bacteriología Aplicada Manual de Procedimientos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
28. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. 5ª Ed. Colombia: Editorial CIB; 2012.
29. Holmes B, Willcox WR, Lapage SP. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. *J Clin Pathol*. 1978;31(1):22-30.
30. Robertson E. A. Macks G. C, Mac Lowry J. D. Analysis of Cost and Accuracy of alternative strategies identification. *J. Clin Microbiol*. 1976 3,4 421-424.
31. Estridge, B. H. y Reynolds, A. P. Basic Clinical Laboratory Techniques. USA; 2012.
32. G. Bou et al / *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–608.



33. Sanz, S. A. Prácticas de Microbiología. 2^a ed. Universidad de la Rioja. Servicio de publicaciones. España; 2011.
34. Instrucciones de uso medios en placa BD Mannitol Salt Agar. 2013. [consultado 21 de julio de 2018] Disponible: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
35. Ash L, Orihel T. Atlas de parasitología humana. 5^a Ed. Editorial Panamericana; 2014.
36. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Parasitología Clínica de Craig y Faust. 3^a Edición. Masson Doyma México; 2003.
37. ImmunoComb® II Chagas Ab ORGENICS. http://www.impulsoraasea.com/mod_descargas/ICHAGASAB.pdf
38. Becerril F.M.A., Romero- Cabello R. Parasitología Médica. De las moléculas a la enfermedad. McGraw Hill. México D.F; 2004.
39. Markell E.K, Voge M. John D.T. 1990. Parasitología Médica. 6^a. Ed. McGraw-Hill. México D.F;1990.
40. Tay J., Velasco O., Lara R., Gutiérrez M. Parasitología Médica. 7^a. Edición. Méndez editores. México D.F; 2002.
41. Gestión para la Vigilancia Entomológica y control de la transmisión de Malaria. <http://www.ins.gov.co>.
42. Rubio Calvo M, Gil Tomas J, Rueca R, Ramírez I, Navarro L. Micosis más frecuentes en nuestro medio, *Revista Iberoamericana de Micología*, 2001;2: 1-15.
43. Bonifaz A. Micología Médica Básica. Mc. Graw Hill 3 edición. 2010.
44. Arenas G, R. Micología Medica Ilustrada. Quinta edición. Mac Graw Hill interamericana Mexico 2014.
45. D' Alessandro A, Diagnostico Micológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.1976



46. Fig 1 examen directo KOH
<https://slideplayer.es/slide/118161/1/images/1/KOH+Examen+directo+KOH+-+NaOH+20+%E2%80%93+40X.jpg>
<http://www.dermatologia.cat/images/grans/koh.jpg>
47. Fig 2 Tinta china células levaduriformes capsuladas
<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/003.jpg>
48. Fig. 3 Agar Saboraud <http://www.atenaiberica.com/imagenes/ca.jpg>
http://bibmed.ucla.edu/ve/diagnostico_archivos/diagno3.jpg
<http://aprendeonline.udea.edu.co>
<http://userscontent2.emaze.com>
49. Fig.4 Malassezia examen directo y Cultivo
http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144838/mod_page/content/1/fotos_superficiales/MZ-D_015.jpg
50. Fig. 5 Examen directo y Cultivo
http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144839/mod_page/content/1/fotos_superficiales/HW-C_004.jpg
51. Fig. 6 Examen directo con KOH y Cultivo
http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144837/mod_page/content/1/fotos_superficiales/PN-003.jpg
52. Fig. 7 Examen directo con KOH y Cultivo
http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/144836/mod_page/content/1/fotos_superficiales/PB-015.jpg



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA RAFAEL NÚÑEZ

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 110

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

