

## TEXTOS DE LOS GUIONES EXPERIMENTALES

Por Raúl Garza Velasco

### GUIÓN EXPERIMENTAL No. 1

#### TÍTULO

Aislamiento e identificación de los cocos Gram positivos y Gram negativos de mayor importancia en salud pública, a partir de mezclas bacterianas.

#### PROBLEMA

Determine cuál(es) de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativa (ECN), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria sicca*, *Neisseria lactamica* y *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, se encuentra(n) presente(s) en cada una de sus dos “muestras problema”. Considere que cada muestra puede contener 0, 1 ó 2 bacterias pertenecientes a los géneros en estudio.

#### INFORMACIÓN ESTRICTAMENTE NECESARIA PARA EL ESTUDIANTE:

##### Medios de cultivo disponibles

- a) Medios para aislamiento: agar chocolate, agar manitol-sal, agar S110, agar sangre y agar Vogel Jonson.
- b) Medios y reactivos para efectuar pruebas de identificación: agar sangre, agar chocolate, caldo manitol rojo de fenol, caldo infusión de cerebro y corazón, N,N dimetil p-fenilendiamina, hidróxido de sodio y plasma de conejo.

##### Precauciones

Recordar que los ECP y los estreptococos  $\beta$  hemolíticos pueden ocasionar enfermedades en piel y vías respiratorias: manipular las muestras y los cultivos con todo cuidado y, al finalizar cada sesión, lavarse perfectamente las manos y frotarlas con etanol; utilizar guantes y cubrebocas durante todas las actividades implicadas en el experimento; asegurarse de esterilizar todo el material, en cuanto se obtengan los resultados requeridos.

##### Intervalos de operación

- Cada estudiante recibirá, en tubos de ensayo, dos “muestras problema”, cada una de las cuales se encontrará marcada con un número diferente.
- Las bacterias presentes en las “muestras problema” representarán un dato conocido por el profesor y contendrán 0, 1 ó 2 microorganismos de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Neisseria*.
- Cada estudiante podrá utilizar hasta:

- ✓ Tres placas de agar chocolate, una de agar S110, una de agar manitol-sal y tres de agar sangre.
  - ✓ Dos tubos con caldo manitol rojo de fenol y dos con caldo infusión de cerebro y corazón.
  - ✓ Dos juegos de pruebas bioquímicas CTA, para oxidación de carbohidratos (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y fructosa).
- El lapso de tiempo con que contará el estudiante entre la recepción de sus “muestras problema” y la entrega (al profesor) de las respuestas asociadas a las preguntas planteadas en el presente guión, será de cuatro sesiones de laboratorio, programadas en lunes y miércoles o en martes y jueves. Algunas resiembras, incubaciones y lecturas podrán efectuarse fuera de las cuatro sesiones formales, ya que se trata de actividades muy sencillas que sólo requieren de 10 a 15 minutos por sesión “extraclase”, y su oportuna realización optimizará, tanto el tiempo de experimentación del alumno, como el tiempo global de la asignatura.

## **Procedimiento**

A partir de cada “muestra problema”:

### **a) Preparar extensiones teñidas al Gram y observarlas a inmersión:**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- a.1. ¿Cuáles fueron las características microscópicas de las diversas bacterias presentes en cada “muestra problema? ¿Cuáles de las características anteriores le sugirieron la posible presencia de los géneros en estudio?
- a.2. Además de poner de manifiesto la morfología y afinidad tintoreal de los microorganismos presentes ¿qué otro dato de utilidad le aporta el frotis al Gram que realizó a partir de sus “muestras problema”?

### **b) Sembrar en medios para aislamiento, Incubar a 35°C.**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- b.1. ¿Qué medios de aislamiento seleccionará usted para cada muestra, considerando los planteamientos anteriores?
- b.2. ¿En cuáles de los medios elegidos es aún más importante practicar óptimamente el método de siembra por agotamiento? Señale al menos dos razones

b.3. ¿Cuáles hechos le indicaron que usted efectuó correctamente el aislamiento correspondiente?

A partir de los medios para aislamiento:

c) Observar las características macroscópicas de las colonias obtenidas en cada placa y, a partir de las que sugieran la presencia de los géneros en estudio, verificar a inmersión su morfología microscópica y su pureza, antes de resembrarlas en medios relacionados con su identificación.

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

c.1. ¿Qué tipo de colonias someterá usted a pruebas de identificación, considerando las observaciones macroscópicas y microscópicas a las que se refiere el inciso “c”?

c.2. ¿Cómo elegirá las pruebas de identificación y cuáles de estas últimas requerirán de otro subcultivo adicional previo?

### **Recomendaciones**

- Dado que los estafilococos crecen más rápido que los estreptococos y las neisserias, los medios de aislamiento en los que puedan desarrollar los tres géneros deberán sembrarse con mayores cuidados para que los primeros no enmascaren la presencia de los segundos y las terceras.
- Una vez realizadas las estrías asociadas al agotamiento en la gelosa sangre, antes de esterilizar el asa pueden practicarse algunas picaduras poco profundas en el agar; de esta manera será más fácil diferenciar en dichas zonas si la hemólisis de las colonias estreptocóccicas es alfa o beta.
- Puesto que los estreptococos y las neisserias son géneros más delicados que los estafilococos, en el caso de que queden pendientes algunas actividades a realizar durante la segunda sesión, postergar solamente lo referente a los estafilococos.
- Preparar el reactivo para oxidasas sólo 15 minutos antes de su empleo.
- Someter previamente a prueba de pureza –observación de frotis teñidos al Gram– las colonias que se seleccionen para realizar las pruebas de identificación.
- Recordar que la prueba de la coagulasa requiere de la previa neutralización del pH antes de agregar el plasma al cultivo de 24 h en el caldo manitol rojo de fenol y que las lecturas deben realizarse cada 30 a 60 minutos durante las primeras 4 h.

- Leer a las 18-24 h los resultados de las pruebas de la bacitracina, optoquina y CAMP.

## CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las características que lo condujeron a identificar a cada una de las bacterias presentes en sus muestras? Para cada microorganismo identificado, escriba su nombre completo en latín y, a continuación, en forma de columna, señale las características que se le solicitan.
2. ¿Cuál(es) género(s) desarrolló(aron) más rápidamente en los medios para aislamiento y cuál(es) requirieron de tiempos más prolongados? ¿Influyó este factor en la dificultad para aislar a alguno(s) de los microorganismos en estudio?
3. ¿En cuáles de los medios de aislamiento que utilizó desarrollaron respectivamente los géneros en estudio? Para cada microorganismo identificado, escriba su nombre completo en latín y, a continuación, en forma de columna, enumere los nombres de los medios en los que aquél pudo desarrollar.
4. ¿En cuáles de los medios de aislamiento pudo determinar el número de géneros bacterianos que contenía cada una de sus “muestras problema”? ¿Porqué?
5. ¿Podría haber prescindido de algunos de los medios de aislamiento empleados? ¿Cuáles son las razones implicadas en su respuesta?
6. ¿Qué importancia tiene realizar un previo frotis al Gram a partir de las colonias elegidas para realizar pruebas de identificación? Señale al menos dos razones de relevancia.
7. ¿En qué le ayudó conocer el tipo de hemólisis de las colonias estreptocóccicas antes de someterlas a las pruebas de identificación?
8. ¿Cómo diferenció entre las colonias de *Streptococcus* y *Neisseria*?
9. ¿Porqué fue necesario diferenciar el género de las colonias de estafilococos, estreptococos y *Neisseria* antes de someterlas a sus respectivas pruebas de identificación?
10. ¿Cuál(es) de la(s) bacteria(s) en estudio estaba(n) presente(s) en cada una de sus dos “muestras problema”? Entregue en otra hoja por separado lo referente a esta pregunta, haciendo alusión a cada “muestra problema” [según su respectivo distintivo (número y letra)].

## GUIÓN EXPERIMENTAL No. 2

### TÍTULO

Aislamiento y diferenciación micro y macroscópica de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, a partir de mezclas bacterianas.

### PROBLEMA

Determine cuál(es) de los siguientes géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, se encuentra(n) presente(s) en cada una de sus 3 “muestra problema”. Considere que cada muestra puede contener 0, 1 ó 2 de los géneros en estudio.

### INFORMACIÓN ESTRICTAMENTE NECESARIA PARA EL ESTUDIANTE

Soluciones disponibles de colorantes y reactivos

Azul de metileno, fucsina fenicada, verde de malaquita, mezcla alcohol-ácido para Ziehl Neelsen y colorantes y reactivos de Gram.

Medios de cultivo disponibles

Agar sangre, agar sangre con telurito, caldo tioglicolato y Lowenstein Jensen.

### Precauciones

Manipular las muestras y los cultivos con todo cuidado y, al finalizar cada sesión, lavarse perfectamente las manos y frotarlas con etanol; utilizar guantes y cubrebocas durante todas las actividades implicadas en el experimento.

### Intervalos de operación

- Cada estudiante recibirá, en tubos de ensayo, tres “muestras problema”, cada una de las cuales se encontrará marcada con un distintivo diferente.
- Las bacterias presentes en las “muestras problema” representarán un dato conocido por el profesor y éstas contendrán 0, 1 ó 2 microorganismos de los géneros en estudio.
- El estudiante deberá reportar el contenido de bacterias de los géneros en estudio, presentes en cada una de sus tres “muestra problema”.
- Cada estudiante podrá utilizar hasta tres placas de agar sangre y tres de agar sangre con telurito; tres tubos con caldo tioglicolato y tres con Lowenstein Jensen en pico de flauta.
- El lapso de tiempo con que contará el estudiante, entre la recepción de sus “muestras problema” y la entrega de su cuestionario (resuelto) al profesor, será de cuatro sesiones de laboratorio, programadas en lunes y miércoles o en martes y jueves. Algunas resiembras, incubaciones y lecturas podrán efectuarse fuera de las cuatro sesiones formales, ya que se trata de actividades muy

sencillas que, conjuntamente, sólo requieren de 10 a 15 minutos por sesión “extraclase”, y su oportuna realización optimizará, tanto el tiempo de experimentación del alumno, como el tiempo global destinado a la asignatura.

## **Procedimiento**

A partir de cada “muestra problema”:

### **a) Preparar extensiones fijas y teñirlas: 1) al Gram; 2) por Ziehl Neelsen; observarlas a inmersión:**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- a.1. ¿Cuáles fueron las características microscópicas de las diversas bacterias presentes en cada “muestra problema”?
- a.2. ¿Cuáles de las características anteriores le sugirieron la posible presencia de los géneros en estudio?

### **b) Sembrar los medios en placa y en tubo. Incubar a 35°C.**

Anote la respuesta a la siguiente pregunta:

- b.1. ¿Incubará usted alguna de las placas en anaerobiosis? En el caso de una respuesta positiva indique cuál medio elegirá para ello y cuál es la razón; si la respuesta fue negativa, señale las razones implicadas.

A partir de los medios para aislamiento:

### **c) Observar las características macroscópicas de las diversas colonias obtenidas en cada placa y verificar a inmersión su morfología microscópica.**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- c.1. ¿En cuáles de los medios elegidos obtuvo desarrollo bacteriano y cuáles fueron las características de las colonias obtenidas en cada uno?
- c.2. ¿Cuáles fueron los respectivos tiempos de incubación requeridos para la obtención de cada una de las diversas clases de colonias descritas en la pregunta anterior?
- c.3. ¿Las características microscópicas correspondieron al tipo de colonias obtenidas?

## **Recomendaciones**

- Puesto que *Bacillus* crece más rápidamente que el resto de los géneros estudiados, las placas de gelosa sangre deben sembrarse con mayores cuidados, a fin de que *Bacillus* no enmascare la presencia de los restantes.
- Recordar que la incubación de las micobacterias suele ser más prolongada que la de muchos otros microorganismos y que, de ser posible, debe realizarse en atmósfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>.
- Esterilizar las “muestras problema” y los cultivos en cuanto se obtengan los resultados correspondientes.

## CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las características que lo condujeron a reconocer micro y macroscópicamente a cada uno de los géneros presentes en sus muestras? Para cada microorganismo identificado, escriba su nombre completo en latín y, a continuación, en forma de columna, señale las características que se le solicitan.
2. ¿Cuáles clases de bacterias observó en las extensiones teñidas por Ziehl Neelsen obtenidas a partir de sus “muestras problema”? ¿De qué color se manifestaba cada una?
3. ¿Observó esporas en algunas de las preparaciones? ¿Cómo se observaron en las preparaciones teñidas por Ziehl Neelsen y cómo en las de Gram?
4. ¿Cuál(s) género(s) desarrolló(aron) más rápidamente en los medios para aislamiento y cuál(es) requirieron de tiempos más prolongados? ¿Incluyó este factor en la dificultad para aislar a alguno(s) de los microorganismos en estudio?
5. ¿En cuáles de los medios de aislamiento que utilizó desarrollaron respectivamente los géneros en estudio?
6. ¿Desarrollaron en algún(os) medio(s) sólido(s) todos los microorganismos observados a inmersión en las extensiones efectuada a partir de sus “muestras problema”? Amplíe su respuesta.
7. ¿Cuál(es) de lo(s) género(s) pertenecientes a este guión estaba(n) presente(s) en cada una de sus tres “muestras problema”? Entregue en otra hoja por separado lo referente a esta pregunta, haciendo alusión a cada “muestra problema” –según su respectivo distintivo (número y letra)–.

## TEXTO DEL GUIÓN EXPERIMENTAL No. 3

### TÍTULO

Aislamiento e identificación de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa (Lac + y Lac -), a partir de mezclas bacterianas.

### PROBLEMA

Determine cuál(es) especie(s) de los siguientes géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Salmonella* y *Shigella*, se encuentra(n) presente(s) en cada una de sus dos “muestras problema”. Considere que cada “muestra problema” puede contener 0, 1 ó 2 bacterias pertenecientes a los géneros en estudio o a los microorganismos estudiados con anterioridad.

### INFORMACIÓN ESTRICTAMENTE NECESARIA PARA EL ESTUDIANTE

#### Medios de cultivo disponibles

- a) Medios para aislamiento: agar EMB, agar Endo, agar Hecktoen, agar Mac Conkey, agar SS, agar sangre agar Tergitol 7, agar verde brillante y agar XLD.
- b) Medios y reactivos para efectuar pruebas de identificación: agar citrato de Simmons, agar Kligler, agar SIM, caldo BHI, caldo manitol rojo de fenol, caldo RMVP y caldo sacarosa-urea; etanol, N,N dimetil p-amino benzaldehído, N,N dimetil p-fenilendiamina, hidróxido de potasio,  $\alpha$ -naftol rojo de metilo.

#### Precauciones

Recordar que este grupo bacteriano y los microorganismos estudiados con anterioridad comprenden especies virulentas: manipular las muestras y los cultivos con todo cuidado y, al finalizar cada sesión, lavarse perfectamente las manos y frotarlas con etanol; utilizar guantes y cubrebocas durante todas las actividades implicadas en el experimento; asegurarse de esterilizar todo el material, en cuanto se obtengan los resultados requeridos.

#### Intervalos de operación

- Cada estudiante recibirá, en tubos de ensayo, dos “muestras problema”, cada una de las cuales se encontrará marcada con un distintivo diferente.
- Las bacterias presentes en las “muestras problema” representarán un dato conocido por el profesor y éstas contendrán 0, 1 ó 2 microorganismos, seleccionados entre los nueve géneros en estudio y los manejados en guiones anteriores.
- El estudiante deberá reportar el contenido de bacterias presentes en cada una de sus dos “muestras problema”.

- Cada estudiante podrá utilizar hasta:
  - ✓ Una placa de cada uno de los siguientes medios: agar EMB, agar Endo, agar Hecktoen, agar Mac Conkey, agar SS, agar Tergitol 7, agar verde brillante y agar XLD.
  - ✓ Tres placas de agar sangre.
  - ✓ Cinco juegos de pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias y *Pseudomonas*, cada uno integrado por: agar citrato de Simmons, agar Kligler, agar SIM, caldo manitol rojo de fenol, caldo RMVP y caldo sacarosa-urea.
  - ✓ Dos tubos con caldo BHI.
- El lapso de tiempo con que contará el estudiante, entre la recepción de sus “muestras problema” y la entrega (al profesor) de las respuestas asociadas a las preguntas incluidas en el cuestionario del presente guión, será de cuatro sesiones de laboratorio, programadas en lunes y miércoles o en martes y jueves. Algunas resiembras, incubaciones y lecturas podrán efectuarse fuera de las cuatro sesiones formales, ya que se trata de actividades muy sencillas que sólo requieren de 10 a 15 minutos por sesión “extraclase”, y su oportuna realización optimizará, tanto el tiempo de experimentación del alumno, como el tiempo global de la asignatura.

## Procedimiento

A partir de cada “muestra problema”:

### a) Preparar extensiones teñidas al Gram y observarlas a inmersión:

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- a.1. ¿Cuáles fueron las características microscópicas de las diversas bacterias presentes en cada “muestra problema”? ¿Cuáles de las características anteriores le sugirieron la posible presencia de los géneros en estudio?
- a.2. ¿Detectó la presencia de microorganismos no pertenecientes al grupo en estudio? En caso de una respuesta positiva, señale las características microscópicas implicadas.

### b) Sembrar en medios para aislamiento. Incubar a 35°C.

- b.1. ¿Qué medios de aislamiento seleccionará usted, considerando las respuestas asociadas a los planteamientos anteriores?

b.2. ¿Cuáles hechos le indicaron que usted efectuó correctamente el aislamiento correspondiente?

A partir de los medio para aislamiento:

c) Observar las características macroscópicas de las colonias obtenidas en cada placa y reconocer las que puedan pertenecer a distintos microorganismos, a fin de verificar a inmersión su morfología microscópica y su pureza, antes de resembrarlas en medios relacionados con su identificación.

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

c.1. ¿Cuántas clases de colonias (diferentes) asocia usted a cada una de sus “muestras problema” considerando las observaciones macroscópicas y microscópicas a las que se refiere el inciso “c”?

c.2. ¿Qué tipo de colonias someterá usted a pruebas de identificación, considerando que sólo contará con un máximo de cinc juegos de pruebas bioquímicas?

### **Recomendaciones**

- Antes de inocular los medios selectivos en placa, anotar la coloración original de cada uno.
- Repartir las placas con medio selectivos para aislamiento, a razón de 4 para cada “muestra problema”, buscando que para cada una de éstas se cuente con medios en los que se pueda detectar la eventual producción de ácido sulfhídrico e inhibir la posible producción de *swarming*.
- Preparar el reactivo para oxidasas sólo 15 minutos antes de su empleo.
- Someter previamente a prueba de pureza –observación de frotis teñidos al Gram– las colonias que se seleccionen para realizar pruebas de identificación.
- Recordar que la observación de las características macroscópicas y las lecturas de las pruebas de identificación (exceptuando la de Voges Proskauer) deben realizarse a las 18-24 h.

### **CUESTIONARIO**

1. ¿Cuáles de sus decisiones resultaron determinantes para poder detectar la presencia de todos los microorganismos presentes en sus “muestras problema”? Señale 4 decisiones importantes en orden de prioridad.

2. ¿Cuáles son las características que lo condujeron a identificar a cada uno de los bacilos Gram negativos presentes en sus “muestras problema”. Para cada microorganismo identificado, escriba su nombre completo en latín y, a continuación en forma de columna, señale las características que se le solicitan.
3. ¿En cuáles de los medios de aislamiento desarrollaron las colonias que sometió a pruebas de identificación? ¿En alguno(s) de ellos seleccionó más de una colonia para someterlas a dichas pruebas? Señale las razones implicadas en su respuesta inmediata anterior.
4. Podría haber prescindido de algunos de los medios de aislamiento empleados? ¿Cuáles son las razones implicadas en su respuesta?
5. ¿Cuál(es) especie(s) bacteriana(s) estaba(n) presente(s) en cada una de sus dos “muestras problema”? Entregue en otra hoja por separado lo referente a esta pregunta, haciendo alusión a cada “muestra problema” –según su respectivo distintivo (número y letra)–.

## GUIÓN EXPERIMENTAL No. 4

### TÍTULO

Aislamiento e identificación de microorganismos a partir de exudados faríngeos.

### PROBLEMA

1. Determine cuál(es) microorganismo(s) patógeno(s) de vías respiratorias altas se encuentra(n) presente(s) en la faringe o amígdalas de su compañero.
2. Aíse una cepa de *Neisseria* y otra de *Corynebacterium*, de entre la flora habitual de la faringe de su compañero.

### INFORMACIÓN ESTRICTAMENTE NECESARIA PARA EL ESTUDIANTE

#### Medios de cultivo disponibles

Medios para enriquecimiento y para aislamiento: caldo infusión de cerebro y corazón, agar manitol-sal, agar Mac Conkey, agar sangre de carnero y agar Biggy.

Medios y reactivos para efectuar pruebas de identificación: agar sangre, agar chocolate, caldo manitol rojo de fenol, caldo infusión de cerebro y corazón, N,N dimetil p-fenilendiamina, hidróxido de sodio, plasma de conejo, agar SIM, caldo manitol rojo de fenol, caldo RMVP y caldo sacarosa-urea; etanol, N,N dimetil p-amino benzaldehído.

#### Precauciones

Recordar que los ECP y los estreptococos  $\beta$  hemolíticos pueden ocasionar enfermedades en piel y vías respiratorias: manipular las muestras y los cultivos con todo cuidado y, al finalizar cada sesión, lavarse perfectamente las manos y frotarlas con etanol; utilizar guantes y cubrebocas durante todas las actividades implicadas en el experimento; asegurarse de esterilizar todo el material, en cuanto se obtengan los resultados requeridos.

#### Intervalos de operación

- Las bacterias presentes en las muestras faríngeas suelen incluir algún patógeno del que el compañero del estudiante funge como portador y, desde luego, a los géneros *Corynebacterium* y *Neisseria*.
- Cada estudiante podrá utilizar hasta:
  - ✓ Una placa de agar chocolate, una de agar S110 o agar manitol-sal y dos de agar sangre de carnero.
  - ✓ Dos tubos con caldo manitol rojo de fenol, uno con agar Biggy y dos con caldo infusión de cerebro y corazón.
  - ✓ Un juego de pruebas bioquímicas para enterobacterias/*Pseudomonas*.

- El lapso de tiempo con que contará el estudiante entre la recepción de sus “muestras problema” y la entrega (al profesor) de las cepas de *Neisseria* y *Corynebacterium*, así como de las respuestas asociadas a las preguntas planteadas en el presente guión, será de cuatro sesiones de laboratorio, programadas en lunes y miércoles o en martes y jueves. Algunas resiembras, incubaciones y lecturas podrán efectuarse fuera de las cuatro sesiones formales, ya que se trata de actividades muy sencillas que sólo requieren de 10 a 15 minutos por sesión “extraclase”, y su oportuna realización optimizará, tanto el tiempo de experimentación del alumno, como el tiempo global de la asignatura.

## **Procedimiento**

A partir de la primera muestra faríngea recolectada:

### **a) Preparar una extensión teñida al Gram y observarla a inmersión.**

Anote la respuesta a la siguiente pregunta

- a.1. ¿Cuáles fueron las características microscópicas de las diversas bacterias presentes y a que géneros podrían corresponder cada una?

A partir de la segunda muestra faríngea recolectada:

### **b) Descargar en gelosa sangre de carnero y en S110 o equivalente. Distribuir con una asa estéril y por agotamiento las descargas efectuadas en los 2 medios en placa. Incubar durante 48 h a 35°C.**

### **c) Introducir y dejar el hisopo en un tubo con caldo BHI. Incubar 24 h a 35°C y, posteriormente, resembrar en extraclase: del BHI en los agares MacConkey y Biggy.**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- c.1. De acuerdo con los medios sólidos utilizados, ¿qué microorganismos patógenos de faringe y amígdalas se podrían detectar?
- c.2. ¿Cuál es la función del caldo BHI?

A partir de los medios para aislamiento:

- d) Observar las características macroscópicas de las colonias obtenidas en cada placa y, a partir de las que sugieran la presencia de patógenos de vías respiratorias, e inclusive, de *Neisseria* o *Corynebacterium*, realizar las resiembras asociadas a la propagación de cada una. Los casos en los que el tamaño de la colonia lo permita, verificar al microscopio la pureza y confirmar

que se trata del género que se sospecha, antes de efectuar la resiembra señalada.

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- c.1. ¿En cuál medio propagará a cada posible patógeno, considerando que esta elección tiene que ver con las secuenciales pruebas para su identificación?
- c.2. ¿En qué medio propagará las colonias que sugieran a *Neisseria* o *Corynebacterium*?

A partir de las colonias propagadas:

- d) Llevar a cabo las pruebas de identificación correspondientes.
  - d.1. ¿Cómo elegirá las colonias propagadas que someterá finalmente a pruebas de identificación?
  - d.2. ¿Cuáles pruebas elegirá de acuerdo con los patógenos cuya presencia se pretende poner de manifiesto?
  - d.3. ¿De qué manera se asegurará de entregar al profesor las cepas de *Neisseria* y *Corynebacterium* asociadas a su problema.

### **Recomendaciones**

- Dado que los estafilococos crecen más rápido que los estreptococos, las neisserias, las corinebacterias y otros, los medios de aislamiento en los que puedan desarrollar dichos géneros deberán sembrarse con mayores cuidados para que los primeros no enmascaren la presencia de los restantes.
- Una vez realizadas las estrías asociadas al agotamiento en la gelosa sangre, antes de esterilizar el asa pueden practicarse algunas picaduras poco profundas en el agar; de esta manera será más fácil diferenciar en dichas zonas si la hemólisis de las colonias estreptocócicas es alfa o beta.
- Preparar el reactivo para oxidasas sólo 15 minutos antes de su empleo.
- Someter previamente a prueba de pureza –observación de frotis teñidos al Gram– las colonias que se seleccionen para realizar las pruebas de identificación.
- Recordar que la prueba de la coagulasa requiere de la previa neutralización del pH antes de agregar el plasma al cultivo de 24 h en el caldo manitol rojo de fenol y que las lecturas deben realizarse cada 30 a 60 minutos durante las primeras 4 h.

- Leer a las 18-24 h los resultados de las pruebas de la bacitracina y CAMP.

## **CUESTIONARIO**

1. ¿Cuáles fueron sus respuestas a las 8 preguntas asociadas al procedimiento?
2. Construya una tabla con 2 columnas: en la primera señale el nombre de los microorganismos patógenos que buscó y, en la segunda, marque si dicho microorganismo estaba presente o ausente en la muestra analizada.
3. ¿Qué géneros de los planteados como su problema 2 entregó al profesor?

**NOTA:** Las respuestas a las preguntas 2 y 3 del cuestionario deben entregarse aparte de las referentes a la pregunta 1.

## GUIÓN EXPERIMENTAL No. 5

### TÍTULO

Recolección de muestras sanguíneas para hemocultivo e identificación de las principales bacterias que ocasionan septicemia en humanos.

### PROBLEMA

Realice la recolección de una muestra sanguínea en condiciones asépticas y determine cuál especie bacteriana se encuentra presente en su “muestra problema” de hemocultivo.

### INFORMACIÓN ESTRICTAMENTE NECESARIA PARA EL ESTUDIANTE

#### Medios de cultivo disponibles

- a) Medio para cultivo de sangre: medio bifásico de Ruiz Castañeda.
- b) Medios para aislamiento: agar Mac Conkey, agar sangre y agar S110.
- c) Medios y reactivos para efectuar pruebas de identificación: agar citrato de Simmons, agar Kligler, agar sangre de carnero, agar SIM, caldo manitol rojo de fenol, caldo RMVP y caldo sacarosa-urea; etanol, N,N dimetil p-amino benzaldehído, N,N dimetil p-fenilendiamina, hidróxido de potasio,  $\alpha$ -naftol y rojo de metilo.

#### Precauciones

- Llevar a cabo la punción venosa con los guantes de látex puestos; evitar cualquier contacto directo con sangre ajena y tener mucho cuidado para no sufrir rosaduras, picaduras o punciones con la aguja de la jeringa previamente utilizada.
- Sólo emplear jeringas estériles nuevas para llevar a cabo la recolección de la muestra sanguínea.
- Efectuar la asepsia oportuna y adecuadamente de la zona a puncionar, empleando para ello etanol al 70%.
- Una vez realizada la recolección de la muestra sanguínea, colocar con precaución la tapa de la aguja de la jeringa y desechar esta última en el depósito que el profesor colocará para tal efecto.
- Recordar que las bacterias a identificar pertenecen a géneros oportunistas y muy virulentos: manipular las muestras y los cultivos con todo cuidado y, al finalizar cada sesión, lavarse perfectamente las manos y frotarlas con etanol; utilizar guantes y cubrebocas durante todas las actividades implicadas en el experimento; asegurarse de esterilizar todo el material en cuanto se obtengan los resultados requeridos.

#### Intervalos de operación

- Cada estudiante recolectará una muestra de sangre en condiciones asépticas, la depositará en un frasco con medio de Ruiz Castañeda y la entregará al profesor, quien llevará a cabo su incubación para comprobar que dicho espécimen fue obtenido en condiciones asépticas (en cuyo caso no deberá haber desarrollo 48 h después). Posteriormente, el profesor añadirá un microorganismo causante de septicemia a la mezcla sangre-Ruiz Castañeda, el cual deberá ser identificado por el estudiante.
- Cada alumno podrá utilizar hasta:
  - ✓ Un frasco de medio bifásico de Ruiz Castañeda.
  - ✓ Una placa de cada uno de los siguientes medios: agar Mac Conkey, S110 y gelosa sangre de carnero.
  - ✓ Dos juegos de pruebas bioquímicas para enterobacterias/*Pseudomonas*, cada uno con: agar citrato de Simmons, agar Kligler, agar SIM, caldo manitol rojo de fenol, caldo RMVP y caldo sacarosa-urea. Además, una segunda placa de gelosa sangre, un tubo con caldo BHI y un tubo con caldo manitol rojo de fenol.
- El lapso de tiempo con que contará el estudiante, entre la recolección de la muestra sanguínea y la entrega de la respuestas asociadas al cuestionario incluido en el presente guión, será de cuatro sesiones de laboratorio.

### **Procedimiento**

- a) Obtener 3 mL de sangre de un compañero del grupo en forma adecuada y depositarlos –en condiciones asépticas– en un frasco con medio de Ruiz Castañeda debidamente etiquetado. Mantener dicho frasco acostado de manera que la sangre entre en contacto con la fracción de medio sólido y entregar el medio al profesor.

**A partir del frasco con Ruiz Castañeda** (previamente inoculado por el profesor):

- b) Llevar a cabo la observación macroscópica correspondiente, preparar extensiones teñidas al Gram y observarlas a inmersión; en cuanto se haya realizado lo antes mencionado, reportar por escrito al profesor de qué microorganismo o grupo bacteriano se sospecha su presencia en el frasco de Ruiz Castañeda.
- c) Sembrar en medios para aislamiento a partir de la porción líquida del medio Ruiz Castañeda. Incubar a 35°C.

Anote la respuesta a la siguiente pregunta.

- c.1. ¿Qué medios de aislamiento seleccionó usted, considerando las respuestas asociadas a los planteamientos del inciso anterior?

**A partir de los medios para aislamiento:**

- d) Observar las características macroscópicas de las colonias obtenidas en cada placa y seleccionar las más representativas a fin de verificar a inmersión su morfología microscópica y su pureza, antes de resembrarlas en medios relacionados con su identificación.

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- d.1. ¿Cuántas clases de colonias (diferentes) asocia usted a su “cultivo problema” considerando las observaciones macroscópicas y microscópicas a las que se refiere el inciso “d”?
- d.2. ¿Qué tipo de colonias sometería usted a pruebas de identificación, considerando que sólo contará con un número limitado de juegos de pruebas bioquímicas? ¿Porqué?

**CUESTIONARIO**

1. ¿Cuáles son el material y los medios con que debe contarse en la mesa de trabajo antes de realizar la toma de una muestra sanguínea para hemocultivo?
2. ¿Cuáles considera como las dos principales complicaciones al realizar la recolección de una muestra sanguínea para hemocultivo?
3. ¿Cuáles de sus decisiones resultaron determinantes para detectar la presencia del microorganismo presente en su “cultivo problema”? Señálelas en orden de prioridad.
4. ¿En cuáles de los medios de aislamiento desarrollaron las colonias bacterianas que sometió a pruebas de identificación? Señale las razones implicadas en su respuesta inmediata anterior.
5. ¿Podría haber prescindido de algunos de los medios de aislamiento empleados? ¿Cuáles son las razones implicadas en su respuesta?
6. ¿Cuál de las principales bacterias causantes de septicemia estaba presente en su “cultivo problema”? Entregue en otra hoja por separado lo referente a esta pregunta, haciendo alusión a cada “muestra problema” –según su respectivo distintivo (número y letra)–.

## GUIÓN EXPERIMENTAL No. 6

### TÍTULO

Aislamiento, cuantificación e identificación de bacterias uropatógenas, a partir de muestras de orina.

### PROBLEMA

Identifique y cuantifique (en unidades formadoras de colonias –UFC– por mililitro) la(s) bacteria(s) uropatógena(s) que se encuentra(n) presente(s) en cada una de sus dos “muestras problema” de orina. Considere que cada muestra puede contener 1 ó 2 bacterias uropatógenas.

### INFORMACIÓN ESTRICTAMENTE NECESARIA PARA EL ESTUDIANTE

#### Medios de cultivo disponibles

- a) Medios en placa: agar Brolacín, agar Mac Conkey, agar S110 y agar sangre.
- b) Medios y reactivos para efectuar pruebas de identificación: agar citrato de Simmons, agar Kligler, agar sangre, agar SIM, caldo manitol rojo de fenol y caldo sacarosa-urea; etanol, N,N dimetil p-amino benzaldehído, N,N dimetil p-fenilendiamina, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, a naftol, rojo de metilo, plasma de conejo.

#### Precauciones

Manipular las muestras y los cultivos con todo cuidado y, al finalizar cada sesión, lavarse perfectamente las manos y frotarlas con etanol; utilizar guantes y cubrebocas durante todas las actividades implicadas en el experimento; asegurarse de esterilizar todo el material, en cuanto se obtengan los resultados requeridos.

#### Intervalos de operación

- Cada estudiante recibirá, en tubos de ensayo, una “muestra problema”, la cual se encontrará debidamente marcada.
- Las bacterias uropatógenas y sus respectivas cantidades, presentes en las “muestras problema”, representan un dato conocido por el profesor.
- El estudiante deberá reportar el nombre y la cantidad de bacterias uropatógenas presentes en su “muestra problema”.
- Cada estudiante podrá utilizar hasta:
  - ✓ Una placa de cada uno de los siguientes medios: agar Brolacín, agar Mac Conkey y agar S110, así como dos placas de agar sangre (una para aislamiento y recuento y, la otra, para las pruebas de bacitracina, optoquina y/o CAMP).

- ✓ Dos juegos de pruebas bioquímicas para bacilos Gram negativos, cada uno integrado por: agar citrato de Simmons, agar Kligler, agar SIM, caldo manitol rojo de fenol y caldo sacarosa-urea.
- ✓ Un tubo con caldo manitol rojo de fenol, para prueba de la coagulasa.
- ✓ Dos tubos con caldo infusión cerebro y corazón.
- El lapso de tiempo con que contará el estudiante, entre la recepción de su “muestra problema” y la entrega (al profesor) de sus respuestas asociadas a las preguntas que se plantean en el cuestionario del presente guión, será de cuatro sesiones de laboratorio, programadas en lunes y miércoles o en martes y jueves. Algunas resiembras, incubaciones y lecturas podrán efectuarse fuera de las sesiones formales, ya que se trata de actividades muy sencillas que sólo requieren de 10 a 15 minutos.

## **Procedimiento**

A partir de cada “muestra problema”:

### **a) Preparar extensiones teñidas al Gram y observarlas a inmersión:**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- a.1. ¿Cuáles fueron las características microscópicas de las bacterias presentes en cada una de sus “muestras problema”? ¿Cuáles de ellas sugieren la posible presencia de bacterias uropatógenas, respectivamente?

### **b) Homogeneizar el contenido de su “muestra problema” y sembrar en medios para aislamiento, con asa calibrada. Incubar a 35°C.**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- b.1. ¿Qué medios de aislamiento seleccionará usted, considerando las respuestas asociadas a la pregunta a.1.?
- b.2. ¿Cuáles hechos le indicaron que usted efectuó correctamente el aislamiento correspondiente?

A partir de los medios para aislamiento:

### **c) Observar las características macroscópicas de las colonias obtenidas en cada placa y reconocer las que puedan pertenecer a bacterias uropatógenas; cuantificar estas últimas y verificar a inmersión su morfología microscópica y pureza, antes de resembrarlas en medios relacionados con su identificación.**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- c.1. ¿Cuántas clases de colonias (diferentes) asocia usted a cada una de sus “muestras problema” considerando las observaciones macroscópicas y microscópicas a las que se refiere el inciso “c”?
- c.2. ¿Observa usted predominio de alguna clase de colonias? ¿existe un desarrollo importante en los medios selectivos?
- c.3. ¿Cuántas colonias asociadas a bacterias uropatógenas crecieron en cada placa?
- c.4. ¿Qué tipo de colonias someterá usted a pruebas de identificación? ¿porqué?
- c.5. ¿A cuáles pruebas de identificación someterá respectivamente las colonias elegidas? ¿porqué?

### **Recomendaciones**

- Siembre las muestras a la mayor brevedad posible; recuerde que las principales bacterias uropatógenas se reproducen cada 20 a 30 minutos, tiempos en los que se duplica su cantidad.
- Homogeneice adecuadamente sus muestras antes de recoger las alícuotas a sembrar.
- Emplee el asa calibrada sólo para recoger la alícuota correspondiente y descargarla en la superficie del medio en turno; la distribución de la suspensión sobre la superficie del agar debe efectuarse con otra asa común.
- Recuerde que la observación de las características macroscópicas y las lecturas de las pruebas de identificación deben realizarse a las 24 h.

### **CUESTIONARIO**

1. ¿Cuáles de sus decisiones resultaron determinantes para definir la cantidad de bacterias uropatógenas presentes en sus “muestras problema”? Señálelas en orden de prioridad.
2. ¿Cuáles son las características que lo condujeron a identificar a las bacterias uropatógenas presentes en sus “muestras problema”? Para cada microorganismo uropatógeno identificado, escriba su nombre completo en latín y, a continuación, en forma de columna, señale las características que se le solicitan.

3. ¿En cuáles medios de aislamiento se aislaron mejor las colonias obtenidas?  
¿Porqué?
4. ¿En cuáles medios de aislamiento desarrollaron las colonias que sometió a pruebas de identificación? ¿En alguno(s) de ellos seleccionó más de una colonia para someterlas a dichas pruebas? Señale las razones implicadas en su respuesta anterior.
5. ¿Podría haber prescindido de algunos de los medios de aislamiento empleados? ¿Cuáles son las razones implicadas en su respuesta?
6. ¿En cuáles medios de aislamiento realizó la cuenta de UFC? ¿La cantidad de UFC resultó igual en todos ellos? Amplíe su respuesta.
7. ¿Cuál(es) bacteria(s) uropatógena(s) estaba(n) presente(s) en cada una de sus dos “muestras problema”? Señale la cantidad de UFC/mL correspondientes a cada bacteria uropatógena detectada y la interpretación que se le daría a esa cifra según los criterios de Kass. Entregue en otra hoja por separado lo referente a esta pregunta, haciendo alusión a cada “muestra problema” –según su respectivo distintivo (número y letra)–.

## GUIÓN EXPERIMENTAL No. 7

### TÍTULO

**Aislamiento, diferenciación e identificación de *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y *Shigella*, a partir de poblaciones mixtas.**

### PROBLEMA

Determine cuál de los microorganismos en estudio se encuentran presentes en cada una de sus tres “muestras problema” de materia fecal. Considere que cada muestra puede contener 0 ó 1 de las 3 bacterias enteropatógenas en cuestión.

### INFORMACIÓN ESTRICTAMENTE NECESARIA PARA EL ESTUDIANTE

#### Medios de cultivo empleados

- a) Medios de enriquecimiento: caldo selenito, caldo tetracionato y caldo peptonado alcalino.
- b) Medios para aislamiento: Agar SS, agar XLD y agar TCBS.
- c) Medios para efectuar pruebas de identificación: Kligler, citrato de Simmons, SIM, caldo manitol rojo de fenol, caldo sacarosa-urea, RMVP.
- d) Sueros anti-*Salmonella*, anti-*Shigella* y anti-*V. cholerae* O1.

#### Precauciones

Recordar que los microorganismos en estudio son muy virulentos y que el hidróxido de potasio es muy cáustico y puede ocasionar quemaduras al entrar en contacto con la piel; manipular las muestras y los cultivos con todo cuidado y, al finalizar cada sesión, lavarse perfectamente las manos y frotarlas con etanol; utilizar guantes y cubrebocas durante todas las actividades implicadas en el experimento; esterilizar todo el material, en cuanto se obtengan los resultados requeridos.

#### Intervalos de operación

- Cada estudiante recibirá, en tubos de ensayo, tres “muestras problema” de materia fecal (diluidas aproximadamente 1:10 en solución salina isotónica estéril), cada una de las cuales se encontrará marcada con un número-letra diferente; en las “muestras problema” “a” y “b” deberá buscarse la presencia de *Salmonella* y *Shigella*, mientras que en la “c” se realizará lo conducente para evidenciar si contiene o no a *V. cholerae*.
- Las bacterias presentes en las “muestras problema” representarán un dato conocido por el profesor; las tres “muestra problema” contendrán sus microorganismos originales –correspondientes a la flora intestinal– y, probablemente, alguna bacteria enteropatógena seleccionada entre: *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*.
- El estudiante sólo deberá reportar el contenido de bacterias enteropatógenas de sus “muestras problema”.

- Cada estudiante podrá utilizar hasta:
  - ✓ 2 tubos con caldo tetratonato, 2 con caldo selenito y 1 con caldo peptonado alcalino.
  - ✓ 4 placas de Agar SS, 4 de XLD, 1 de agar chocolate y 1 de TCBS.
  - ✓ 6 juegos de pruebas bioquímicas para bacilos Gram negativos y 1 tubo con RMVP para determinar la variedad de *V. cholerae*.
- El lapso de tiempo con que contará el estudiante, entre la recepción de sus “muestras problema” y la entrega (al profesor) de sus respuestas asociadas a las preguntas planteadas en el presente guión, será de 4 sesiones de laboratorio, programadas en lunes y miércoles o en martes y jueves. Algunas resiembras, incubaciones y lecturas podrán efectuarse fuera de las 4 sesiones formales, ya que se trata de actividades muy sencillas que sólo requieren entre 10 y 15 minutos por sesión “extraclase”, y su oportuna realización optimizará, tanto el tiempo de experimentación del alumno, como el tiempo global para llevar a cabo el total de ejercicios programados para la asignatura.

## **Procedimiento**

### **A partir de la “muestra problema”:**

a) Sembrar en medios de enriquecimiento. Incubar a 35°C.

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- a.1. ¿Qué medios de enriquecimiento seleccionará usted para cada “muestra problema”?
- a.2. ¿Cuáles tiempos de incubación destinará a cada uno?

### **A partir de los medios de enriquecimiento:**

b) Sembrar los medios para aislamiento. Incubar a 35°C.

Anote la respuesta a la siguiente pregunta:

- b.1. ¿Cuáles medios selectivos elegirá usted para ser resembrados a partir de los medios de enriquecimiento?

### **A partir de los medios para aislamiento:**

c) Observar las características macroscópicas de las colonias obtenidas en cada placa y, a partir de las que sugieran la presencia de bacterias enteropatógenas,

verificar a inmersión su morfología microscópica y su pureza, antes de resembrarlas en medios destinados a la identificación de enterobacterias.

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- c.1. ¿Qué tipo de colonias someterá usted a pruebas de identificación considerando las observaciones macroscópicas a las que se refiere el inciso “c”?
- c.2. ¿Cuántos juegos de pruebas bioquímicas conservará para rectificar o confirmar posteriormente los resultados obtenidos?

A partir del crecimiento en Kligler (para *Salmonella* y/o *Shigella*) y del desarrollo en agar chocolate (previa programación de las probables colonias de *V. cholerae*):

#### **d) Realizar las pruebas serológicas correspondientes.**

Anote las respuestas a las siguientes preguntas:

- d.1. ¿Cómo se efectúa y se lee una prueba de aglutinación?
- d.2. ¿Bajo qué criterios selecciona usted el(los) suero(s) a utilizar?
- d.3. ¿Qué clase de información le proporcionan, para cada caso, los sueros cuyo empleo seleccionó?

#### **Recomendaciones**

- Una vez inoculados los medios de enriquecimiento, incubarlos durante un tiempo máximo de 18 h.
- No olvidar adicionar el lugol de doble concentración al caldo tetrionato, inmediatamente antes o después de sembrar la muestra en dicho medio.
- Sólo someter a reacciones de aglutinación con suero anti-*V. cholerae*, las colonias cuyas pruebas bioquímicas (sacarosa y oxidasa) resulten compatibles con *V. cholerae*.

#### **CUESTIONARIO**

1. ¿Cuáles son las características que lo condujeron a identificar a cada una de las bacterias enteropatógenas presentes en sus “muestras problema”?
2. ¿Obtuvo un mayor número de colonias de *Shigella* y/o *Salmonella* en las placas resembradas a partir del caldo tetrionato que en las asociadas al caldo selenito? Amplíe su respuesta.

3. ¿En cuáles medios selectivos obtuvo un mayor número de colonias Lac-¿
4. ¿Qué criterios aplicó para seleccionar las colonias que sometió a pruebas de identificación?
5. ¿Cómo discriminó las colonias de las bacterias que conforman la población habitual del intestino?
6. ¿Cuál bacteria enteropatógena estaba presente en cada una de sus tres “muestras problema” (si es que todas contenían algún enteropatógeno)? Entregue en otra hoja por separado lo referente a esta pregunta, haciendo alusión a cada “muestra problema” según su respectivo distintivo (número y letra).