

Manual práctico de bacteriología general

Ana C. Ramírez A.
Enrique García Amor
Aurora Longa
Kiralba Sánchez
María Eugenia Nieves
Judith Volasco
María del Carmen Araque
Noraidá Mosqueda G.



PUBLICACIONES
VICERRECTORADO ACADÉMICO
COEPR

Manual práctico de bacteriología general

Manual práctico de bacteriología general

- Ana C. Ramírez A.
- Enrique García Amor
- Aurora Longa
- Kiralba Sánchez
- María Eugenia Nieves
- Judith Velasco
- María del Carmen Araque
- Noraida Mosqueda G.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Autoridades Universitarias

- *Rector*
Mario Bonucci Rossini
- *Vicerrectora Académica*
Patricia Rosenzweig Levy
- *Vicerrector Administrativo*
Manuel Aranguren Rincón
- *Secretario*
José María Andrés

PUBLICACIONES
VICERRECTORADO
ACADÉMICO

- *Dirección editorial*
Patricia Rosenzweig Levy
- *Coordinación editorial*
Víctor García
- *Coordinación del Consejo editorial*
Roberto Donoso
- *Consejo editorial*
Rosa Amelia Asuaje
Pedro Rivas
Rosalba Linares
Carlos Baptista
Tomás Suárez Litvin
Ricardo Rafael Contreras
- *Producción editorial*
Yelliza García A.

*Los trabajos publicados
en la Colección Textos
Universitarios han sido
rigurosamente seleccionados
y arbitrados por especialistas
en las diferentes disciplinas.*

COLECCIÓN

Textos Universitarios

Publicaciones
Vicerrectorado
Académico

Manual práctico de bacteriología general

Primera edición, enero 2006

Primera edición digital 2010

- © Universidad de Los Andes
Vicerrectorado Académico
- © Ana C. Ramírez, Enrique García Amor, Aurora Longa,
Kiralba Sánchez, María Eugenia Nieves, Judith Velasco,
María del Carmen Araque, Noraida Mosqueda G.

- *Concepto de colección*
Kataliñ Alava
- *Corrección*
Freddy Parra Jahn
- *Diseño y diagramación*
Marian A. Saavedra / Raylú Rangel.
- *Diseño de portada*
Marian A. Saavedra

HECHO EL DEPÓSITO DE LEY

Depósito legal:

ISBN:

Derechos reservados
Prohibida la reproducción total
o parcial de esta obra sin la autorización
escrita del autor y el editor

Universidad de Los Andes
Av. 3 Independencia
Edif. Central del Rectorado
Mérida, Venezuela
publicacionesva@ula.ve
publicacionesva@gmail.com
<http://viceacademico.ula.ve/publicacionesva>

Prefacio

Hoy día, el conocimiento en el área de la bacteriología, como rama de la microbiología se ha transformado en un conocimiento de primera necesidad, debido a que las enfermedades infecciosas se han mantenido en un lugar preferencial en el área médica. En muchos casos, el médico tratante se enfrenta a cuadros clínicos inespecíficos cuyo verdadero diagnóstico no es fácilmente discernible, razón por la cual debe recurrir al laboratorio en búsqueda de hallazgos que le permitan orientar el diagnóstico y proceder a la pronta instauración de una terapia antimicrobiana adecuada.

Al estudiar bacteriología el estudiante deberá enfrentarse a muchas preguntas, para cuyas respuestas deberá consultar una gran cantidad de libros de texto en esta área. Sin embargo, la carencia de textos escritos en español a los que el estudiante de Bioanálisis y profesionales de ciencias de la salud, puedan recurrir con la plena certeza de encontrar en ellos explicaciones y metodologías actualizadas y concretas, ha generado la inquietud de desarrollar un texto que cumpla con las necesidades requeridas por el estudiantado y profesionales del área.

Por lo tanto, hemos intentado recopilar y presentar de forma clara y concisa los conceptos básicos fundamentales que el estudiante debe conocer en la práctica diaria en el laboratorio de bacteriología, de tal manera que este manual pretende ser una guía de consulta fácil y permanente no sólo para los estudiantes de Bioanálisis y carreras afines, sino también para los profesionales que trabajan en el área de la microbiología.

El texto ha sido redactado de manera sencilla siguiendo una secuencia lógica en la actividad práctica, además, se introdujeron ilustraciones a color para un buen aprendizaje visual, así como también una autoevaluación en la que se exponen algunos aspectos importantes de cada práctica.

Para la elaboración del presente manual se contó con el conocimiento y la experiencia de varios profesionales del área de la microbiología, docentes del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, lo que sin duda aporta mayor valor a su contenido, evidenciando el esfuerzo y dedicación de cada uno de ellos en la docencia universitaria, cuyo único norte es abrir el camino a la comprensión científica de cuanto emana la ciencia microbiológica.

MSc. Ana C. Ramírez A.
Prof.^a de la Cátedra de Bacteriología.

A nuestros estudiantes de la escuela de Bioanálisis,
por ser la piedra angular que impulsó la redacción
del presente manual de prácticas de laboratorio,
el cual esperamos sirva de apoyo y
fortalecimiento en el aprendizaje de la bacteriología.

práctica 1

Organización de un laboratorio de microbiología y normas de bioseguridad

Judith Velasco C.

Objetivo general

Describir la organización de un laboratorio de microbiología y las normas de bioseguridad que se establecen en el mismo.

Objetivos específicos

1. Describir la estructura general de un laboratorio de microbiología clínica.
2. Aplicar las normas de bioseguridad que deben establecerse en el laboratorio para evitar la transmisión de infecciones.
3. Reconocer la importancia que tiene llevar a cabo estas normas para la protección personal y de la comunidad.

Aspectos teóricos

1. Organización de un laboratorio de microbiología

La organización de un laboratorio de microbiología depende del tamaño y características del mismo, disponibilidad del personal y espacio físico. Puede tratarse de un laboratorio asistencial con investigación o de referencia.

El laboratorio de microbiología puede constituir una sección dentro de un laboratorio general de análisis clínico o ser un servicio aparte.

Estructura de un laboratorio de microbiología

Dependiendo de las características de cada laboratorio, el mismo cuenta con las siguientes secciones o áreas básicas o más especializadas:

- **Sección de toma de muestras:** destinada a la obtención de muestras de pacientes ambulatorios. En esta sección existe el material necesario para tal fin, dicho material debe ser revisado y repuesto periódicamente. En esta área se debe disponer de buena luz y un baño.
- **Sección de recepción y registro de muestras:** es donde se reciben y numeran las muestras a medida que se van recibiendo, independientemente del lugar de su obtención, siempre que cumplan con los requisitos establecidos para su recolección.
- **Sección de siembra de muestras:** puede estar anexa o no a la sección anterior. En esta área se realiza el procesamiento inicial de las muestras, sembrándolas en los diferentes medios de cultivo y preparándolas para las tinciones, técnicas especiales, etc., de acuerdo a los esquemas de procesamiento rutinario de las muestras (Manual de Procedimientos).
- **Sección de medios de cultivo:** es el área donde se preparan los medios de cultivo y reactivos.
- **Sección de lavado y esterilización:** en esta sección se lleva a cabo el lavado del material, esterilización en seco y esterilización con vapor (autoclave) del material nuevo y contaminado.
- **Área de almacén o depósito:** los medios de cultivo y reactivos pueden estar en un depósito ubicado dentro de la sección de medios de cultivo o separado de ella, y organizados de acuerdo a las pautas establecidas para el correcto almacenamiento de sustancias químicas e inflamables. Suele existir una nevera o refrigerador para almacenar los productos que requieran temperaturas entre 2 - 8 °C para su conservación.
- **Sección de Bacteriología:** en esta sección es donde se interpretan los cultivos, tinciones y otras técnicas, además de la identificación y pruebas de susceptibilidad de los microorganismos aislados y técnicas de diagnóstico rápido basadas en la detección de antígenos directamente en las muestras.

Esta sección suele dividirse en las siguientes áreas:

- Urocultivos
- Coprocultivos
- Exudados y anaerobios
- Hemocultivos y otros
- **Sección de Micobacterias:** dado el riesgo que conlleva el aislamiento e identificación de las micobacterias, es imprescindible que esta sección esté separada de las demás en un cubículo o habitación cerrada. Debe estar restringido el acceso a ella tanto del propio personal del laboratorio como del resto.
- **Sección de Micología:** es donde se lleva a cabo el aislamiento e identificación de los hongos patógenos.
- **Sección de Antibióticos:** es la sección donde se desarrollan las técnicas de sensibilidad antimicrobiana y se llevan a cabo los ensayos de antibióticos y los estudios epidemiológicos de sensibilidad antimicrobiana.
- **Sección de Serología o Inmunomicrobiología:** en ella se realizan las técnicas de detección

- de antígenos y anticuerpos fundamentalmente en el suero y otras muestras. Esta sección dependiendo del grado de desarrollo que alcance, necesita normalmente un espacio aparte.
- **Otras secciones como Virología o Biología Molecular:** se desarrollan sólo en algunos laboratorios ya que se requiere mayor grado de especialización, personal entrenado, infraestructura, etc.

2. Normas de bioseguridad

La bioseguridad en el laboratorio se refiere al conjunto de medidas preventivas destinadas a evitar el riesgo de infección del personal que trabaja en él, así como su extensión a la comunidad. El propósito básico es obtener un ambiente de trabajo seguro y ordenado.

Para el microbiólogo clínico, el mayor riesgo está asociado al procesamiento de las muestras clínicas y manipulación de los patógenos aislados en ellas. De los elementos básicos necesarios para iniciar un proceso infeccioso, vale decir, hospedero susceptible, agente infeccioso, concentración del agente y vía de transmisión, el más controlable es este último.

Al respecto, Guzmán (2001) describe los siguientes elementos de contención:

Equipos de seguridad
Diseño del laboratorio
Prácticas de trabajo

Equipos de seguridad (Contención primaria):

Los elementos de contención primaria deben permitir al operador la preparación y transferencia del material potencialmente infeccioso sin romper la barrera. Éstos, incluyen elementos simples como guantes, delantal, mascarilla, tubos de centrífuga con tapón, propipeteadores y otros elementos de mayor tecnología e importancia como las cámaras de bioseguridad.

Cámaras de bioseguridad: También conocidas como gabinete o campana de seguridad biológica, las cuales son barreras de contención primaria que se usan para:

- Contener aerosoles producidos durante el trabajo.
- Separar al trabajador de los agentes infecciosos manipulados.
- Separar el material del trabajador y de la contaminación del área de trabajo.

El aire que contiene el material infeccioso es esterilizado al pasar a través de un filtro de alta eficiencia para partículas aéreas (HEPA: *High efficiency particulate air*), el cual remueve las partículas mayores de 0,3 μm de diámetro. De acuerdo al grado de contención biológica que logran, las cámaras son clasificadas en:

- Clase I: Permiten al aire del ambiente pasar a través de la cámara, esterilizando el aire que va a ser eliminado. Protegen al operador, al ambiente, pero no al producto del proceso.
- Clase II: Esterilizan el aire que pasa por el interior de la cámara, como también el aire que va a ser eliminado. El aire fluye en “láminas” que sirven de barrera a las partículas del exterior de la cámara y dirigen el flujo del aire contaminado hacia los filtros HEPA. Se les

denomina cámaras o campanas de flujo laminar y son las más utilizadas en los laboratorios de microbiología clínica.

- Clase III: Obtienen la máxima protección para el operador ya que son totalmente cerradas, con presión negativa.

Diseño del laboratorio (Contención secundaria):

El diseño debe estar pensado para proteger al personal del laboratorio, a las personas que trabajan en otras áreas de la institución y a la comunidad.

Debe estar localizado fuera del área de atención a los pacientes, visitas y con acceso limitado. El diseño y los materiales del laboratorio deben permitir una fácil limpieza. Cada sección requiere además un lavamanos. Según el nivel de bioseguridad que el laboratorio requiera deben cumplirse otras especificaciones que se describen posteriormente.

Prácticas de trabajo:

Corresponde a la utilización estricta de los procedimientos y técnicas especialmente diseñadas para disminuir el riesgo. Para ello, el personal debe estar consciente de los riesgos de la manipulación de agentes infecciosos. Es el elemento de contención más importante en cuanto a la prevención de infección en el laboratorio, además, es importante la aceptación y compromiso de cada uno de los miembros del laboratorio acerca de las medidas de seguridad que sean implementadas.

Niveles de seguridad biológica:

Existen 4 niveles establecidos según las técnicas utilizadas, los equipos de seguridad y la estructura del laboratorio:

Nivel 1:

Válido para laboratorios de enseñanza en los que se trabaja con microorganismos no patógenos bien conocidos y patógenos oportunistas (Tabla 1). En este nivel se observan las siguientes normas:

- a) Las puertas del laboratorio permanecerán cerradas mientras se trabaja.
- b) Las mesas de trabajo se desinfectan diariamente al terminar el trabajo y cada vez que sea necesario (derrame de productos contaminados).
- c) Todo material contaminado debe ser esterilizado antes de desecharlo.
- d) No pipetear aspirando directamente con la boca, sino utilizar propipeteadores.
- e) No comer, fumar, aplicarse cosméticos, morder los lápices o bolígrafos o tener alimentos en el laboratorio.
- f) Lavarse las manos después de trabajar con microorganismos y al terminar la jornada.
- g) Realizar las técnicas correctamente, evitando la producción de aerosoles.
- h) Llevar bata durante el trabajo la cual debe quitarse al salir del laboratorio.
- i) Los materiales que no puedan ser esterilizados en el propio laboratorio se transportarán en contenedores cerrados para el traslado hasta su descontaminación. Debe existir un autoclave para descontaminar en el mismo edificio.

- j) Deben existir programas de desinfección y desratización.
- k) El diseño del laboratorio debe permitir una fácil limpieza, incluso, entre los muebles, que deben ser resistentes a los ácidos, álcalis y relativamente al fuego, así como de superficie impermeable.
- l) Cada laboratorio o sección debe tener un lavamanos.
- m) En los laboratorios donde las ventanas se pueden abrir, deben estar protegidas con mosquiteros.

Nivel 2:

Permite el trabajo con microorganismos de peligrosidad potencial moderada (Tabla 1). Es el caso de laboratorios de hospitales o centros de salud de nivel primario. Este nivel comprende además de las del nivel 1, las siguientes normas:

- a) Es obligatorio el uso de bata que no debe usarse fuera del laboratorio, especialmente en el comedor o cafetería o salidas fuera del edificio.
- b) Las técnicas serológicas con antígenos sin capacidad infectante pueden realizarse en las mesas de trabajo.
- c) El acceso al laboratorio debe estar limitado. No está permitida la entrada de personas ajenas al laboratorio, especialmente, niños, embarazadas o personas con cualquier tipo de inmunosupresión. En las zonas donde se trabaja con animales o productos potencialmente peligrosos se deben colocar carteles de peligro biológico.
- d) Se deben utilizar guantes en todas las técnicas en que se manejan productos potencialmente peligrosos o animales.
- e) Cuando ocurra algún accidente de exposición a productos contaminados (derrame, pinchazos, etc.): comunicar inmediatamente al responsable del laboratorio; escribir un informe sobre lo ocurrido; realizar una evaluación médica de lo sucedido y tratamiento o profilaxis cuando se requiere.
- f) Se debe tomar una muestra de suero de todo el personal cuando comienza a trabajar en el laboratorio que se archivará como suero base.
- g) Existirá un Manual de Normas de Bioseguridad en el laboratorio que todo el personal debe conocer y donde se explique lo que se debe hacer ante un accidente.
- h) Se trabajará con cabinas o campanas de seguridad de clase I, II ó III cuando se realicen técnicas que suponen gran producción de aerosoles como centrifugación, homogeneización de muestras, agitación vigorosa, sonicación. Apertura de recipientes con microorganismos liofilizados, inoculación de animales, siembra o procesamiento de muestras en general.

Nivel 3:

Este nivel es adecuado para trabajar con microorganismos de alto riesgo (ver tabla 1) y comprende las normas de los niveles 1 y 2, y además:

- a) Todas las actividades con microorganismos o productos potencialmente patógenos se realizarán en campanas de seguridad. Ningún trabajo se realizará en las mesas de trabajo.
- b) Se utilizarán batas abiertas por la espalda, que no deben llevarse fuera del laboratorio. Utilizar guantes cuando se trabaja con material contaminado o animales que se desinfectarán antes de desecharlos. En las habitaciones donde se tienen los animales se utilizarán mascarillas rígidas.
- c) En el laboratorio no debe haber plantas o animales que no se utilicen en el trabajo.

- d) El laboratorio debe estar aislado de la circulación general, existiendo una doble puerta de entrada con una habitación para cambiarse de ropa y con ducha.
- e) Las superficies y los muebles deben ser de fácil limpieza. Las ventanas deben cerrar herméticamente. Las puertas se cerrarán automáticamente.
- f) Cerca de las puertas de salida deben existir lavamanos que se puedan accionar con el pie, codo o rodilla.
- g) Existirá un autoclave para descontaminar en el propio laboratorio.
- h) Existirá un sistema especial de extracción de aire con circulación del mismo de la puerta de entrada hacia el interior del laboratorio. Regulación de la entrada y salida del aire acondicionado. El aire de salida de las cabinas de seguridad tipo III saldrá directamente al exterior. El aire de las cabinas tipo I y II se elimina directamente al exterior o al sistema general del edificio pasando previamente por filtros HEPA.

Nivel 4:

Este nivel sólo se establece en laboratorios de experimentación y no en laboratorios de microbiología clínica. Se necesita este nivel cuando se manejan microorganismos de altísimo riesgo o que son exóticos a ese país, especialmente virus (Tabla 1).

TABLA 1

Niveles de seguridad biológica en relación con algunos microorganismos y tipos de laboratorio

Nivel de seguridad biológico	Ejemplos de tipo de laboratorio	Ejemplos de microorganismo
1	Laboratorios de enseñanza	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>
2	Laboratorios de hospital 1°, enseñanza universitaria	<i>Salmonella typhi</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Virus Hepatitis B
3	Laboratorios de diagnóstico especializado	<i>Brucella</i> sp <i>Histoplasma capsulatum</i>
4	Laboratorios de máxima seguridad	Virus de Lassa, Marburg, Ebola, Junin

Tomado de: Delgado y col., 1994

3. Descontaminación y eliminación de desechos

En los laboratorios la descontaminación y la eliminación de desechos son operaciones íntimamente relacionadas. En el trabajo cotidiano hay que eliminar parte del material que se utiliza y el resto se aprovecha para volver a utilizarlo, como ocurre con la cristalería, el instrumental y la ropa de laboratorio.

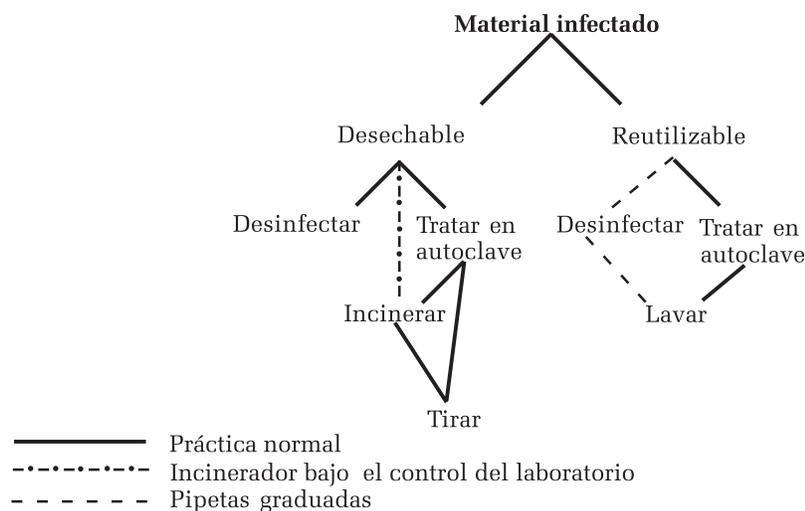
Descontaminación: El material destinado a la descontaminación y eliminación debe introducirse en recipientes, por ejemplo, en bolsas de plástico susceptibles de tratamiento con autoclave que tengan un código de color que indique si el contenido ha de pasar al autoclave o a la incineración.

El tratamiento con autoclave constituye el método de elección para todos los procesos de descontaminación.

Eliminación de desechos: Hay que establecer un sistema de identificación y separación de material contaminado (y sus recipientes). Puede hacerse la siguiente división:

- Desechos no contaminados que pueden eliminarse con la basura.
- Objetos cortantes: agujas hipodérmicas, bisturís, vidrios rotos.
- Material contaminado para el tratamiento en autoclave y reutilización.
- Material contaminado para eliminación.
- Desechos anatómicos: tejidos humanos y animales.

Flujograma para el tratamiento de material infectado



Tomado de: Organización Mundial de la Salud, 1994.

1 Actividad práctica

Esta práctica se desarrollará tipo taller. El profesor dará las instrucciones para el desarrollo de la actividad y entregará a cada grupo un formato que deberán llenar y entregar al final de la sección.

Autoevaluación

1. Elabore un plano de un laboratorio de microbiología clínica y señale las áreas y secciones con las que debe contar el mismo.
2. Mencione 4 normas de bioseguridad que se deben seguir en un laboratorio de nivel 1 y otras 4 que deberían seguirse, además de las anteriores, en un nivel 2.
3. Indique qué nivel de seguridad se requiere para trabajar con los siguientes microorganismos:
 - *Escherichia coli*
 - *Brucella* sp
 - Virus de la fiebre Lassa
 - Virus de la Hepatitis B
 - *Salmonella typhi*

Bibliografía

- Delgado, A., Amich, S., Prieto, S. y Salve, M. (1994). *Laboratorio de microbiología* (pp. 2–13). España: Interamericana McGraw-Hill.
- Finegold, S. y Baron, E. (1996). *Bailey Scott. Diagnóstico microbiológico* (7^a ed., pp. 21–28). Argentina: Médica Panamericana.
- Guzmán, A. (2001). *Seguridad biológica en el laboratorio de microbiología*. En F. Montiel y M. Lam. Manual de microbiología clínica (pp. 11–16). Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda.
- Montiel, F. y Lam, M. (2001). *Manual de microbiología clínica* (pp. 11–15). Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda.
- Organización Mundial de la Salud. (1994). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (2^a ed). Ginebra: Autor.

práctica 2

El microscopio. Técnica de enfoque y cuidados

Ana C. Ramírez
Noraida del C. Mosqueda

Objetivo general

Manejar adecuadamente el microscopio.

Objetivos específicos

1. Identificar los elementos que componen un microscopio compuesto.
2. Manejar adecuadamente el microscopio óptico aplicando una correcta técnica de enfoque.
3. Mencionar los cuidados del microscopio óptico.

Aspectos teóricos

El microscopio

Los microorganismos son tan pequeños que resulta imposible observarlos individualmente a simple vista, por lo que se hace necesario disponer de un instrumento que nos permita visualizarlos para distinguirlos y estudiarlos, dicho instrumento es el microscopio, el cual se define como un sistema óptico formado por una combinación de lentes para conseguir imágenes aumentadas de tamaño que sean visibles al ojo humano.

La palabra se deriva del griego antiguo *micros* que significa pequeño, y *skopein*, observar. El primer microscopista fue Anthony Van Leewenhoek, quien observó por primera vez la vida

microscópica en el agua de lluvia, agua de mar, sarro dentario y muchos otros materiales; su minucioso trabajo abrió las puertas a un mundo que finalmente condujo al dominio de muchas enfermedades y a un conocimiento más profundo de diversas estructuras.

Un microscopio simple presenta una sola lente o cristal de aumento, mientras que el microscopio compuesto consiste en dos juegos de lentes, uno cerca del objeto a estudiar y, por lo tanto, se denomina objetivo; el otro juego, ocular, se encuentra cerca de nuestro ojo, como el nombre lo indica.

Además del aumento, una propiedad importante de un microscopio es su poder de resolución, definido como la capacidad de mostrar distintos y separados dos puntos muy cercanos entre sí. El límite absoluto del poder de resolución es casi la mitad de la longitud de onda de la luz que se usa para iluminar el objetivo, es por ello que los microscopios ópticos convencionales son incapaces de proporcionar información sobre la estructura interna de las células. Por tanto, se usan principalmente para visualizar la morfología celular y su reacción a diferentes procesos de tinción.

Partes de un microscopio

La parte mecánica está constituida por:

- a) **Base o pie:** pieza que asegura la estabilidad del microscopio.
- b) **Brazo o columna:** pieza colocada sobre la base del microscopio que sirve de soporte a las diferentes partes del mismo y para su transporte.
- c) **Tornillo macrométrico:** es un tornillo de precisión que permiten el acercamiento o enfoque basto.
- d) **Tornillo micrométrico:** permite el ajuste fino de la imagen.
- e) **Tubo:** soporta la parte óptica, tiene una longitud variable según el fabricante; en su parte superior se encuentra el ocular y en la parte inferior el revólver.
- f) **Platina:** sirve de soporte para las preparaciones y presenta un orificio central que permite el paso de los rayos luminosos.
- g) **Subplatina:** base donde va instalado el condensador, consiste en un pistón y una cremallera.
- h) **Carro:** compuesto por 2 tornillos estriados que permiten desplazar la preparación en dirección lateral y antero-posterior, con lo cual se logra recorrer toda la preparación.
- i) **Revólver o portaobjetivos:** pieza giratoria donde van enroscados los objetivos.

La parte óptica está constituida por:

- a) **Fuente de luz:** es proporcionada por lámparas de halógeno o tungsteno.
- b) **Condensador:** es un sistema de lentes que concentra la luz en el objeto examinado. Está situado entre la fuente de luz y la platina, exactamente en el eje óptico.
- c) **Objetivos:** son un juego de lentes enroscados en el **revólver** (pieza giratoria) con distintas potencias amplificadoras. Cada objetivo está marcado con su poder de amplificación en diámetros y está indicado por un número seguido de una "X".

Existen 2 tipos de objetivos: **secos**, que son aquellos que están diseñados para ser usados, sin la interposición de otro medio entre la lente frontal del objetivo y el objeto, los más usados son 10X y 40X. Los de inmersión se utilizan sumergidos en un medio como aceite de cedro, agua o glicerina, y su aumento es de 100X.

- d) **Ocular:** es un lente colocado en la parte superior del tubo portaocular. Su función es aumentar la imagen dada por el objetivo. Puede ser único o doble y su potencia amplificadora suele ser: 5X, 8X, 10X, 12,5X ó 20X.

Cálculo del poder de amplificación de un microscopio

El aumento o magnificación de la imagen está dado por el producto de los aumentos del ocular por el objetivo. Ejemplo: Si el ocular es de 10X y estamos utilizando un objetivo de 40X, el objeto que estamos observando se ha amplificado 400 veces.

Técnica de enfoque con el microscopio

1. Ajustar la iluminación del campo, para lo cual se coloca el objetivo de menor aumento, bajar completamente el condensador y el diafragma no muy abierto.
2. Montar la preparación sobre la platina, colocarla de tal modo que el centro de la preparación coincida con el orificio central de la platina.
3. Observar lateralmente y con el tornillo macrométrico, subir la platina hasta que la preparación quede cerca del objetivo de menor aumento.
4. Para iniciar el enfoque se debe accionar primero el tornillo macrométrico lentamente de manera que el objetivo se separe lentamente de la preparación, es decir, hacer el enfoque por alejamiento y nunca por acercamiento, cuando se observe la muestra se termina de enfocar con el tornillo micrométrico.
5. Si se requiere observar más detalles utilizar un objetivo de mayor aumento para ello girar el revólver hasta que la lente ocupe el lugar de la lente anterior, previamente, se debe centrar en el campo la parte que se desee estudiar, ya que al cambiar el objetivo el campo se reduce. Rectificar el enfoque con el micrométrico y ajustar la iluminación.

En la medida en que se incrementan los aumentos, la cantidad de luz requerida es mayor por lo que debe corregirse el diafragma y el condensador.

Cuando se va a utilizar el objetivo de inmersión se procede así:

1. Abrir el diafragma y subir al máximo el condensador.
2. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación.
3. Colocar el objetivo en su posición efectiva y observar a través del ocular y rectificar el enfoque con el micrométrico.

Cuidados del microscopio

1. Si no se está usando debe cubrirse con un protector o guardarse en un sitio destinado para tal fin.
2. Cualquier líquido que se derrame sobre el microscopio se debe limpiar de inmediato.
3. La parte mecánica debe limpiarse con productos destinados para ello.
4. El objetivo de inmersión debe limpiarse inmediatamente después de ser usado, para ello usar papel especial para lentes o un paño o gasa que no dejen pelusa, luego humedecerlo ligeramente con una mezcla etanol-metanol y secarlo con el mismo papel.
5. Los oculares se limpian con papel seco especial para lentes, gasa o paño suave.
6. Nunca use aceite de inmersión en objetivos no destinados para ello.
7. Nunca coloque el microscopio cerca del mechero encendido.
8. Guarde el microscopio con el objetivo de menor aumento en posición de enfoque.
9. El microscopio, para ser trasladado, deberá sujetarse por la parte del brazo y apoyarlo en la palma de las manos.

2 Actividad práctica

Materiales:

- Microscopio
- Preparaciones teñidas
- Aceite de inmersión

Procedimiento:

1. Enfocar una preparación siguiendo la técnica explicada anteriormente.
2. Observe y dibuje lo observado en la preparación con objetivos de diferentes aumentos:



Indique el aumento o magnificación de la imagen observada:



Indique el aumento o magnificación de la imagen observada:



Indique el aumento o magnificación de la imagen observada:

Autoevaluación

1. Defina poder de resolución.
2. Identifique cada una de las partes del microscopio y sus funciones.



Microscopio óptico

3. ¿Cuál es el aumento o magnificación de una imagen observada en un microscopio óptico, cuyo ocular es 12,5X y el objetivo utilizado es de 40X?
4. Señale la alternativa correcta en relación con la técnica correcta de enfoque:
 - a) Se realiza por acercamiento nunca por alejamiento
 - b) Se realiza con el objetivo de mayor aumento
 - c) Se realiza con el diafragma abierto completamente
 - d) Se realiza por alejamiento nunca por acercamiento
5. Mencione el cuidado que debe hacerse al microscopio luego de usar el lente de inmersión.

Bibliografía

- Lynch, M. J., Raphael, S., Mellor, L. D., Spare, P. D. e Inwood, M. J. H. (1977). *Métodos de Laboratorio* (Tomo 1). México: Interamericana.
- Steaman. (1993). *Diccionario de Ciencias Médicas* (25ªed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Tarazón, S. y Flores, T. (1996). *Parasitología. Manual de trabajos prácticos*. Venezuela: Ediluz.
- Volk, W. (1996). *Microbiología básica*. (7ª ed.). México: Harla. S.A.

práctica 3

Preparaciones en fresco y realización de frotis y extensiones

Aurora Longa B.

Objetivo general

Comprender la importancia del examen microscópico de los microorganismos y los distintos métodos de observación de las bacterias *in vivo*.

Objetivos específicos

1. Mencionar los métodos de observación bacteriana más utilizados, como las preparaciones en fresco.
2. Realizar preparaciones en fresco sin teñir para observar morfología y motilidad bacteriana tales como: montaje en solución salina fisiológica, gota pendiente y examen en fresco a partir de un cultivo bacteriano; y teñidas como la coloración vital con azul de metileno.
3. Preparación y fijación de extensiones y frotis a partir de medios sólidos y líquidos.
4. Realizar las formas más habituales de fijación: por calor y alcohol en frío.

Aspectos teóricos

El diagnóstico bacteriológico tiene gran importancia, ya que es esencial la detección del agente causal para el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades infecciosas, éste va a depender fundamentalmente de una apropiada selección de la muestra clínica, forma de obtenerla y el transporte de la misma. El examen bacteriológico implica: observación microscópica, cultivo y aislamiento, identificación del microorganismo y susceptibilidad a las drogas antimicrobianas (prueba de susceptibilidad).

La observación microscópica constituye el primer paso en el examen bacteriológico y nos informa de la presencia o no de bacterias lo que permitirá conocer la morfología microbiana: forma, motilidad, presencia de flagelos, cápsula, esporas, etc., y sus características tintoriales. Ésta permite orientar el resto del examen, que se completará con el cultivo y aislamiento de las bacterias en los medios adecuados, el examen bioquímico, etc.

Para el estudio microscópico de los microorganismos existen diversos métodos, cada uno de los cuales va a proporcionar información sobre distintos aspectos y propiedades de los microorganismos. Dependiendo del objetivo que se pretenda alcanzar, se seleccionará uno u otro método. Dentro de estos tenemos:

1. Examen de los microorganismos vivos

Este tipo de montajes hace posible la observación de los microorganismos vivos y es llamado **observación vital**.

Este tipo de examen se utiliza principalmente para la investigación de la motilidad bacteriana, también en estudios de morfología (especialmente bacterias en espiral cuya morfología se altera al secarse y teñirse), agrupación, estructuras bacterianas, observación de huevos y quistes de algunos parásitos, etc.

La motilidad se pondrá de manifiesto al microscopio con el movimiento de los microorganismos en todas las direcciones del campo (no debe confundirse con las corrientes líquidas cuyo movimiento es en una sola dirección).

Para este tipo de estudio, se pueden utilizar tanto directamente los productos patológicos obtenidos de una muestra, como cultivos en medios sólidos o líquidos de los microorganismos. Para ello, es suficiente con la suspensión del microorganismo en un medio líquido consiguiendo su visibilidad al microscopio de campo claro por el distinto índice de refracción entre el medio y el microorganismo.

Los métodos que se emplean para este tipo de examen son:

- **Preparaciones en fresco**

estas a su vez se dividen en:

- a) Examen en fresco entre lámina y laminilla
- b) Examen en fresco en campo oscuro
- c) Examen en fresco con tinta china
- d) Método de la gota pendiente

- **Coloraciones vitales**

- **Preparaciones en fresco**

La mayor parte de estas observaciones se realizará mediante la microscopía de campo claro, aunque la utilización de microscopía de contraste de fases facilita la visualización de los microorganismos.

Las preparaciones deben obtenerse de material clínico fresco o de cultivos recientes y realizados en medios adecuados (en caso contrario, es posible que se produzcan modificaciones en la morfología y motilidad bacteriana). Muestras como sedimentos urinarios, esputos o exudados pueden utilizarse directamente, mientras que si el material es demasiado denso puede diluirse con solución salina estéril.

La preparación se observa al microscopio con objetivos de 10X y 40X, con poca intensidad de luz para facilitar la observación microscópica. En ocasiones, para la observación de bacterias muy delgadas, como es el caso de las espiroquetas (*Borrelia* y *Treponemas*), en las que es de gran importancia la observación de su característico movimiento, es muy útil la utilización del microscopio de campo oscuro.

a) Examen en fresco entre lámina y laminilla

Se obtiene colocando una gota de líquido que contiene los microorganismos sobre un portaobjetos (limpio y seco), sobre el que se coloca un cubreobjetos. Si se parte de un producto sólido, se deposita primero una gota de agua estéril o solución salina estéril sobre el portaobjetos, para posteriormente, con ayuda del asa (previamente flameada y enfriada) realizar una suspensión del producto a estudiar. El borde entre el porta y el cubre se puede sellar con parafina o una sustancia similar, para disminuir la evaporación. El tamaño de la gota debe tener relación con el del cubreobjeto, para evitar que traspase los bordes del mismo.

Si se trata de un cultivo en medio líquido, se deposita directamente sobre la lámina una gota de cultivo extraído con el asa de platino o una pipeta Pasteur.

Cuando se trata de un producto patológico (muestra proveniente de un paciente), la técnica a seguir depende de su estado físico. Si es líquido se procede como si se tratara de un cultivo en medio líquido y si es denso, se diluye en una gota de agua estéril o solución salina fisiológica estéril.

Después de enfocada la preparación, es conveniente a veces esperar unos minutos antes de proceder al examen microscópico propiamente dicho, ya que por razones físicas (capilaridad, tensión superficial, etc.) se producen corrientes más o menos violentas en el seno del líquido contenido entre lámina y laminilla ocasionándose movimientos extraños que dificultan la observación correcta.

La motilidad de las bacterias es debida a la presencia de flagelos. No se deben confundir los movimientos de locomoción con los movimientos brownianos o movimientos moleculares que presentan todas las partículas sólidas que no exceden de un tamaño de 3 micras, cuando están suspendidas en un líquido. Los movimientos brownianos son movimientos oscilatorios de las partículas suspendidas en el medio por lo cual no hay desplazamiento de un punto a otro en el campo microscópico.

Cuando se trata de movimientos determinados por corrientes, las partículas suspendidas en el líquido se desplazan todas en la misma dirección. Cuando se nos presentan dudas acerca de la motilidad de una bacteria, podemos puntualizar este dato haciendo una nueva preparación utilizando como líquido de emulsión una gota de solución de bicloruro de mercurio al 2%. El verdadero movimiento bacteriano desaparece en esta preparación y el browniano persiste; o se puede realizar el método de la gota pendiente.

b) Examen en fresco en campo oscuro

Este método permite visualizar microorganismos como el *Treponema pallidum* (agente causal de la sífilis), que no puede ser visto en preparaciones en fresco utilizando un condensador corriente. En el examen sobre fondo oscuro se aplican los principios que rigen el conocido fenómeno de Tyndall de la observación de partículas de polvo en un cuarto oscuro cuando penetra lateralmente un rayo de luz.

Para este examen se requieren condensadores especiales llamados condensadores de fondo oscuro, por medio de los cuales se evita utilizar en la observación microscópica, los rayos centrales que después de haber iluminado la preparación directamente pasarían al objetivo. De esta manera la preparación queda iluminada únicamente por los rayos que le llegan lateralmente, que solo pueden penetrar en el objetivo después de haber sido reflejados por las partículas y microorganismos contenidos en la preparación que aparecen al observador como puntos intensamente iluminados sobre el fondo oscuro.

c) Examen en fresco con tinta china

Mediante este examen, se obtienen imágenes en las que se destacan las bacterias incoloras sobre un fondo negro–parduzco. Se utiliza principalmente para el estudio de detalles estructurales como cápsulas. La tinta china o nigrosina permite observar células levaduriformes capsuladas (*Cryptococcus neoformans*) sobre todo en líquido cefalorraquídeo. Los polisacáridos capsulares rechazan la tinta china y la cápsula aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos.

d) Método de gota pendiente

Se utilizan unos portaobjetos especiales con una o varias excavaciones. Se coloca una gota de la suspensión en el centro de un cubreobjeto (limpio y seco) con un asa previamente esterilizada. A continuación, se coloca el portaobjetos sobre el cubreobjetos, de forma que la gota de suspensión coincida con el centro de la excavación. Después se dará la vuelta rápidamente al portaobjeto, manteniendo el cubreobjeto en su posición. El tamaño de la gota debe ser el adecuado, para evitar una rápida evaporación, y lo suficientemente pequeña para evitar su contacto con el portaobjeto.

• Coloraciones vitales

Estos tipos de exámenes pueden considerarse como preparaciones en fresco o como técnicas intermedias entre éstas y las preparaciones fijadas y coloreadas. Las coloraciones o tinciones vitales son montajes de materia viva teñida. En lugar de agua, se utiliza una solución de colorante diluida que, sin matar al microorganismo, hace que aumente el contraste.

Su objetivo es facilitar la observación de la morfología y la estructura bacteriana, pero sin provocar alteraciones celulares ni destruir la bacteria.

Uno de los colorantes más utilizado en este tipo de examen es el azul de metileno, el cual es un buen colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y que no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales, puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe.

Con estos tipos de preparaciones detalladas arriba solo se puede observar la motilidad y la forma de los microorganismos, por lo tanto, para poner de manifiesto otras características celulares es necesario el uso de tinciones que precisan una fijación previa del microorganismo.

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. Debido a que el índice de refracción de las bacterias es similar al de la mayoría de los medios acuosos, las células bacterianas no se ven con facilidad a menos que estén tenidas. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, etc.

Las preparaciones fijadas y coloreadas son las más frecuentemente utilizadas, tanto las obtenidas directamente a partir de muestras clínicas como las obtenidas a partir del desarrollo de cultivos.

2. Preparación y fijación de extensiones y frotis

En general, el proceso seguido en todas las tinciones, conlleva las siguientes etapas: extensión, desecación, fijación, coloración, desecación y observación.

En esta práctica sólo nos referiremos a las tres primeras etapas.

• Preparación del extendido o frotis

A esta etapa se le denomina generalmente extensión. Se realiza sobre un portaobjetos que ha de estar totalmente limpio y desengrasado (si es de un producto biológico se denomina frotis). Consiste en extender una delgada película del material que contiene el microorganismo sobre la superficie del portaobjeto.

Puede prepararse a partir de productos líquidos o sólidos:

a) Producto líquido:

Para prepararlo se coloca sobre un portaobjetos de vidrio limpio y seco, una gota de material a estudiar y se extiende con ayuda del asa de platino.

b) Producto sólido:

Si el material es sólido, se pasa sobre la superficie del portaobjetos el hisopo con el que se ha tomado la muestra. También puede prepararse una suspensión del material en una gota de agua o solución salina colocada previamente en el portaobjetos, extendiéndola con ayuda del asa de platino.

• Desecación

Se realiza a temperatura ambiente o pasando la muestra repetidamente a 10 cm de la llama de un mechero, hasta comprobar por el cambio de aspecto de la preparación, que ésta se ha secado.

• Fijación

La fijación es un proceso que se realiza antes de teñir las células bacterianas y tiene como objeto adherir la muestra al portaobjeto, inmovilizando las estructuras del material a estudiar en un estado lo más próximo posible al estado vivo. Consiste en una muerte rápida del microorganismo al desnaturalizar sus proteínas y coagular el protoplasma para facilitar la acción posterior del colorante. Se puede llevar a cabo con distintos agentes: calor, compuestos inorgánicos (tetraóxido de osmio), compuestos orgánicos (formol, metanol, etc.) o sales metálicas (fijador de Schaudinn).

Las formas más habituales de fijación son:

Por calor: consiste en pasar varias veces, la parte inferior de la preparación por la llama azul de un mechero (sujetando el portaobjetos con unas pinzas), hasta que al colocarlo en el dorso de la mano se sienta caliente, pero sin que queme.

Alcohol en frío: consiste en cubrir la preparación con etanol o metanol. Se deja actuar durante varios minutos. Se escurre y se deja secar.

3 Actividad práctica

I PARTE:

Realización y observación de preparaciones en fresco

a) Montaje con solución salina

Materiales:

- Cepa de *Escherichia coli* en agar BHI (Infusión cerebro corazón)
- Portaobjeto
- Cubreobjeto
- Asa de platino
- Solución salina fisiológica (SSF)

Procedimiento:

1. Depositar con el asa en aro una gota de SSF en el centro del portaobjeto.
2. Tomar una pequeña muestra de la cepa y emulsionarla con la gota de SSF.
3. Colocar de inmediato un cubreobjeto sobre la gota de cultivo.
4. Observar al microscopio con objetivos de 10X y 40X.
5. Describir e interpretar lo observado.

b) Preparación en fresco a partir de un medio de cultivo líquido

Materiales:

- Cepa de *Staphylococcus aureus* en caldo nutriente
- Portaobjeto
- Cubreobjeto
- Asa de platino

Procedimiento:

1. Depositar con el asa en aro una gota de cultivo de *S. aureus* en el centro del portaobjeto.
2. Colocar de inmediato un cubreobjeto sobre la gota de cultivo.
3. Observar al microscopio con objetivo de 10X y 40X.
4. Describir e interpretar lo observado.

c) Preparación en fresco a partir de una muestra biológica

Materiales:

- Muestra de orina patológica
- Cubreobjeto
- Portaobjeto
- Pipeta Pasteur

Procedimiento:

1. Tomar con una pipeta Pasteur una gota de la muestra de orina y depositarla en el centro de la lámina.
2. Cubrir la preparación con una laminilla.
3. Observar con objetivos de 10X y 40X.
4. Describir e interpretar lo observado

d) Preparación de gota pendiente

Materiales:

- Cepas de *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus* en caldo BHI
- Portaobjeto especial para gota pendiente.
- Cubreobjeto.
- Asa de platino.

Procedimiento:

1. Colocar una gota de los caldos con cada una de las cepas en estudio sobre cubre objetos con un asa previamente esterilizada.
2. Se coloca el portaobjeto sobre el cubreobjetos, de forma que la gota de suspensión coincida con el centro de la excavación del portaobjeto.
3. Dar una vuelta rápida al portaobjeto, manteniendo el cubreobjeto en su posición.
4. Observar con objetivos de 10X y 40X.
5. Describir e interpretar lo observado.

e) Coloración vital con azul de metileno

Materiales:

- Muestra de heces
- Portaobjeto
- Cubreobjeto
- Palillos
- Solución de azul de metileno al 1%

Procedimiento:

1. Colocar una o dos gotas del colorante en el centro del portaobjeto.
2. Introducir el palillo en la muestra y agarrar una mínima cantidad de la misma.
3. Emulsionar la muestra con el colorante.
4. Colocar una laminilla encima de la preparación.
5. Observar con objetivos de 10X y 40X.
6. Describir e interpretar lo observado.

II PARTE:**Preparación y fijación de extendidos y frotis****a) Preparación de extendidos a partir de medios sólidos****Materiales:**

- Cepa de *Escherichia coli* en agar BHI
- SSF
- Portaobjeto
- Asa de platino

Procedimiento:

1. Coloque una o dos gotas de SSF en el centro de la lámina.
2. Con el asa tome una pequeña cantidad de muestra y extiéndala suavemente sobre la lámina, tratando en lo posible de que quede una película delgada y homogénea
3. Deje secar la preparación a temperatura ambiente.

b) Preparación de extendidos a partir de medios líquidos**Materiales:**

- Cepa de *Staphylococcus aureus* en caldo BHI
- Portaobjeto
- Asa de platino

Procedimiento:

1. Colocar una o dos gotas del caldo y extenderla suavemente por la lámina.
2. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente.

c) Preparación de frotis

Materiales:

- Muestra de orina y de secreción nasal
- Portaobjetos
- Asa de platino
- Hisopos estériles

Procedimiento:

1. Realizar el frotis de muestra de orina siguiendo las mismas indicaciones dadas en la preparación de extensiones a partir de medios líquidos.
2. Tomar muestra de secreción nasal de uno de los compañeros siguiendo las indicaciones del profesor, realizar el frotis extendiendo la muestra en una porción de la lámina hasta obtener una película delgada.

d) Fijación de extendidos y frotis

Materiales:

- Extendidos y frotis realizados en la parte anterior
- Alcohol al 90%, metanol
- Mechero

Procedimiento:

1. Dividir el número de extendidos y frotis realizados en la parte anterior para su fijación por:
2. Calor: pasar de dos a tres veces la lámina (con el lado de la extensión hacia arriba) por la llama del mechero
3. Frío: utilizando alcohol al 90% o metanol y dejándola actuar entre 3 y 10 minutos.

Aspectos a considerar para la preparación de extendidos o frotis

1. Utilizar láminas y laminillas limpias, secas y desgrasadas
 2. Cuando coloque la laminilla sobre la suspensión bacteriana, procure no tocar con los dedos el material y no formar grandes burbujas de aire. Haga presión suavemente.
 3. Enfoque por alejamiento para evitar romper la laminilla, manipule convenientemente el condensador y el diafragma, baje el condensador y cierre un poco el diafragma hasta lograr una luminosidad apropiada que permita destacar los elementos microbianos.
 4. Luego de colocar la laminilla espere algunos minutos para que la suspensión se asiente.
 5. La fijación de los extendidos y frotis se hace generalmente por calor; solo para coloraciones especiales se recurre a la fijación con alcoholes u otros métodos.
-

Autoevaluación

1. Explique la importancia del examen microscópico de los microorganismos
2. ¿Cuál es la utilidad de las preparaciones en fresco?
3. ¿Cuáles son los métodos para la observación *in vivo* de los microorganismos?
4. ¿Qué es una coloración vital?
5. Señale las fases para la preparación y fijación de extendidos y frotis
6. ¿Con qué finalidad se fijan los extendidos y frotis?
7. ¿Cuáles son las formas habituales de fijación?
8. ¿Por qué son más útiles las preparaciones fijadas y coloreadas que las preparaciones en fresco?

Bibliografía

- Delgado-Iribarren, A., Amich, S., Pietro, S. y Salve, M. (1994). *Laboratorio de microbiología* (1ª ed.). Madrid España: McGraw Hill.
- Koneman, E., Allen, S., Jandon, W., Schreckenberger, P. y Winn, W. (1999). *Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color*. (5ª ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (1993). *Introducción a la microbiología* (3ª ed.). España: ACRIBIA.
- Universidad Central de Venezuela. Cátedra de Microbiología. (2000). *Guía de trabajos prácticos de microbiología*. Caracas-Venezuela: Vicerrectorado Académico. Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti.