

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**ELABORACION DE UN MANUAL DE PRACTICAS PARA LA  
MATERIA DE  
"BACTERIOLOGIA VETERINARIA"**

**TESIS PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PRESENTA :**

**HORI GALVAN ALEJANDRO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**QFB MARIA CRISTINA MORAN SALAS**

**LAS AGUJAS, NEXTIPAC, JALISCO. SEPTIEMBRE 1999.**

## DEDICATORIAS

A mis padres: Mario E. Hori Diaz y Martha M. Galvan de Hori por el constante apoyo y educación que recibí de ellos a lo largo de mi vida.

A mis hermanas: Elizabeth, Megumy, Hatsumi y Sayuri.

A mi esposa: Lupita, por haberme apoyado a lo largo de mi carrera y sentir el mismo cariño por esta profesión.

A mis hijos: Alejandro, Eduardo, Andrea y Fernanda, que son el motivo de mi superación.

A mi Director de Tesis: Q.F.B. Maria Cristina Moran Salas, por su ayuda, paciencia y toda la dedicación que me brindo para la realización de este trabajo.

A toda mi familia, en especial a mi tío Jaime Hori Díaz por su incondicional apoyo y comprensión de toda la vida.

Doy gracias a Dios, a la Universidad de Guadalajara, a la División de Ciencias Veterinarias y a todos los antes mencionados por tener que ver en mi formación profesional; A todos ellos MUCHAS GRACIAS...

## PROLOGO

A fines del siglo pasado con trabajos de Pasteur y Koch inicio el interés por identificar microorganismos causales de la enfermedad. El conocimiento de las bacterias toma sus bases en las características propias de las bacterias desde su estructura, hasta su crecimiento e inhibición ,así como los mecanismos hereditarios y su constitución de ADN que apoyan al sistema de clasificación taxonómica, que nos permite identificar a las bacterias basándose en sus necesidades nutricionales y metabólicas.

El motivo de elaboración del presente manual se debió a la necesidad que existe en poner en manos de estudiantes, una guía practica de bacteriología que facilite la comprensión de conceptos , que se lleve un seguimiento de estos y los englobe para un mejor aprovechamiento. Además de una introducción práctica a todos los interesados en bacteriología.

Es importante señalar que el presente manual tiene dos peculiaridades, una referidas conceptos bacteriológicos generales y otra que incluye la identificación de los géneros más frecuentes causantes de enfermedades infecciosas.

# CONTENIDO

## BACTERIOLOGIA GENERAL

Microscopia bacteriana .....	2
Metabolismo bacteriano .....	7
Inhibición al crecimiento bacteriano .....	16

## BACTERIOLOGIA DETERMINATIVA

Toma de muestras y su envío al laboratorio .....	21
Efecto biológico de los desinfectantes .....	23
Coprocultivo .....	26
Cultivo bacteriológico de pulmón .....	29
Diagnostico serológico de <i>Brucella abortus</i> .....	31
Cultivo bacteriológico de leche mamitosa .....	34
Cultivo de exudado otico .....	37

## APENDICE

Colorantes y reactivos .....	40
Tablas de identificación bacteriológica .....	44
Bibliografía .....	56

**BACTERIOLOGIA**

**GENERAL**

## MICROSCOPIA BACTERIANA. PRACTICA No. 1

### INTRODUCCION.

Las bacterias son seres unicelulares procarióticos pertenecientes al reino monera; son pequeñas y miden unas cuantas micras. Son incoloras si se les observa "in vivo", la observación al microscopio de campo claro no alcanza a poner de manifiesto sus estructuras. Además existen bacterias difíciles de teñir por su tamaño, para éstas se requiere microscopio de campo oscuro o contraste de fases (Campylobacter, Treponema, etc.).

Para determinar la forma, tamaño y agrupación de las bacterias se necesita realizar frotis fijos y utilizar diferentes técnicas de tinción según las necesidades del laboratorista.

La tinción de Gram es una técnica que revela detalles estructurales de las bacterias que ayuda a separarlas taxonómicamente en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas, esta basada en diferencias estructurales de las capas externas de las paredes celulares bacterianas, en forma universal se aplica como primer paso de identificación bacteriana.

Algunas bacterias difieren en su pared celular por contener un alto porcentaje de glicolípidos hidrofóbicos; un componente importante de estos es el ácido micólico, estas bacterias se conocen como alcohol-ácido-resistentes (BAAR) que se demuestran por el método de Ziehl-Neelsen.

El grupo de bacterias BAAR está representado por el género *Mycobacterium* sp. Pocos géneros bacterianos tienen la capacidad de esporular al encerrar su genoma en vehículo aislante que le permita germinar. Las esporas bacterianas mantienen un estado de vida latente resistiendo al calor, desecación, congelación etc.. Para teñir esporas se utiliza la técnica de Shaeffer y Fulton.

Para poder realizar las tinciones lo primero es realizar los frotis fijos ó frescos según lo conveniente y decisión del personal que labora en esta área.

### OBJETIVOS:

- Elaborar frotis frescos para la observación de bacterias in vivo.
- Realizar frotis fijos para la observación de bacterias teñidas y a realizar las técnicas de tinción de Gram, Shaeffer-Fulton y Ziehl-Neelsen.

**MATERIAL:**

- Porta objetos
- Mechero Bunsen
- Asa de nicromo
- Reactivos para T. Gram  
(Cristal violeta, safranina, alcohol-acetona , lugol).
- Reactivos para Ziehl Neelsen  
(Carbolfucsina, alcohol-ácido , azul de metileno).
- Reactivos para Shaeffer Fulton  
(Verde de malaquita, safranina).
- Cultivos bacterianos ( *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*)
- Vaselina

**METODOLOGIA:****A) Preparación de frotis frescos.**

- 1) Tomar un cubreobjeto y agregar vaselina en los cuatro bordes de las caras.
- 2) Flamear el asa de nicromo con la finalidad de esterilizarla (toma color rojo).
- 3) Agitar el tubo con caldo bacteriano destaparlo y tomar con el asa (asada) introduciéndola en el caldo.
- 4) Colocar la asada en el centro del cubreobjetos y flamear nuevamente el asa.
- 5) Depositar un portaobjetos sobre el cubreobjetos para que se quede adherido. Invertir la preparación y observar inmediatamente al microscopio con el objetivo seco fuerte (40 x)

**B) Elaboración de frotis fijos.**

- 1) Colocar una pequeña gota de agua destilada en los extremos de un portaobjetos.
- 2) Esterilizar el asa y tomar una asada de la cepa de *Staphylococcus sp*, mezclar con movimientos giratorios para hacer una suspensión, extender y repetir la operación en el otro extremo del portaobjetos con la cepa de *Escherichia coli*.
- 3) Esperar a que se seque y fijar a la flama del mechero con movimientos rápidos.



### **C) Tinción de Gram.**

- 1) Cubrir el frotis fijo con la solución de cristal violeta y dejarlo actuar por sesenta segundos, lavar con agua corriente y adicionar lugol (para fijar el colorante primario) durante sesenta segundos, lavar con agua.
- 2) Agregar alcohol acetona para hacer una decoloración durante quince segundos y lavar con agua.
- 3) Cubrir con el colorante de contraste ( safranina) durante treinta segundos, lavar la laminilla y esperar a que seque.
- 4) Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x). Las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul violeta, las Gram negativas se tiñen de un color rojo.

### **D) Tinción de Shaeffer-Fulton.**

- 1) Al frotis fijo aplicar verde de malaquita y calentar para forzar la entrada del colorante hasta tener emisión de vapores durante dos minutos, transcurrido el tiempo, lavar con agua corriente.
- 2) Contrastar con la solución de safranina por sesenta segundos, lavar con agua corriente y esperar a obtener un secado, observar al microscopio con el objetivo de inmersión. Las células vegetativas se tiñen de color rojo y las esporas de color verde.



### **E) Tinción de Ziehl-Neelsen.**

- 1) Cubrir con un pequeño papel filtro el frotis fijos y humedecerlo con fucsina fenolada (colorante primario) pasar por la parte inferior de la laminilla la flama de una lámpara de alcohol para emisión de vapores durante quince minutos, quitar el papel, dejar enfriar y lavar con agua
- 2) Decolorar con alcohol-ácido dejándolo actuar dos minutos se debe tener una decoloración completa.
- 3) Contrastar con azul de metileno durante un minuto, lavar con agua y esperar a que se seque a temperatura ambiente.
- 4) Observar el microscopio con el objetivo de inmersión. Los BAAR se tiñen de color rojo y los no BAAR de un color azul.

### **RESULTADOS:**

### **CONCLUSIONES:**

**CUESTIONARIO:**

- 1.- ¿Qué utilidad diagnóstica tienen las preparaciones húmedas?
- 2.- Enlistar tres géneros bacterianos móviles de importancia en Medicina Veterinaria.
- 3.- ¿Qué utilidad tienen los frotis fijos en laboratorio de bacteriología?
- 4.- ¿Cuáles son las diferentes formas de las bacterias y como se puede agrupar?
- 5.- ¿Qué diferencias estructurales existen entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas?
- 6.- Enlistar tres géneros de Gram positivas y tres de Gram negativas.
- 7.- Mencionar los géneros bacterianos que tienen capacidad de alcohol-ácido-resistencia.
- 8.- ¿Cuál es la utilidad diagnóstica de la tinción de Ziehl-Neelsen?
- 9.- ¿En qué géneros bacterianos de importancia en Medicina Veterinaria encontramos esporas?

## METABOLISMO BACTERIANO. PRACTICA No 2

### INTRODUCCION:

A la integración de todas las reacciones químicas que ocurren dentro de la bacteria se le conoce como metabolismo, este comienza con los nutrientes captados del medio ambiente y por reacciones metabólicas son desdoblados para obtener fuentes de energía química para la célula (catabolismo) y el producto final del metabolismo es una célula nueva formada por sustancias celulares nuevas con la utilización de energía obtenida en el catabolismo (anabolismo), por lo tanto si no se conoce el metabolismo de las bacterias es difícil su identificación.

Existe un procedimiento muy minucioso para desarrollarse en el área de bacteriología, debe aprenderse desde tener limpieza y orden en el laboratorio hasta realizar pruebas de identificación bacteriana.

Se deben seleccionar los medios de cultivos adecuados según el tipo de muestra para proceder a realizar el aislamiento, después de la incubación se procede a un estudio de la morfología macroscópica colonial para así iniciar una identificación preliminar de los microorganismos aislados. Sólo se debe describir aquellas colonias que están separadas unas de otras. Una vez identificadas las colonias se procede a realizar una tinción de Gram con la finalidad de iniciar su primera clasificación taxonómica, después se procede a realizar pruebas bioquímicas específicas que nos permiten conocer el metabolismo de las bacterias ya que la mayoría se realiza con medios que contienen los elementos requeridos por las bacterias en forma aislada y los cuales contienen indicadores de pH que nos apoyan a visualizar las reacciones. Los medios de cultivo son utilizados para el crecimiento de bacterias "in vitro", existen una gran gama de medios de cultivo debido a que los requerimientos nutricionales de las bacterias son variados.

Hay medios de cultivo básico que promueven el desarrollo de microorganismos nutricionalmente poco exigentes, medios enriquecidos suplementados con nutrientes que proporcionan factores de crecimiento, medios selectivos los cuales contienen sustancias inhibitoras para suprimir a los microorganismos no deseados, medios de transporte utilizados para evitar que las muestras clínicas se sequen.

Existen varios métodos de siembra de las bacterias en medios de cultivos esto

se relaciona con la consistencia del medio. Los medios líquidos se inoculan por medio de agitación de asa, por hisopos o pipetas, los medios semisólidos se siembran por picadura con el asa recta su utilidad es detectar la movilidad de las bacterias, los medios sólidos pueden sembrarse por cuatro formas: por estrías, por picadura y estrías, en forma masiva o por agotamiento de asa con la finalidad de obtener colonias.

### **OBJETIVOS:**

- ❖ Elaborar los medios de cultivo.
- ❖ Conocer los diferentes tipos de siembra.
- ❖ Observar la morfología colonial .
- ❖ Identificar las bacterias por medio de las pruebas bioquímicas.

### **MATERIAL:**

- |                        |                          |
|------------------------|--------------------------|
| - Medios deshidratados | - Asas de nicromo        |
| - Matraz erlenmeyer    | - Portaobjetos           |
| - Espátulas            | - Microscopio            |
| - Cajas de petri       | - Kit de tinción de gram |
| - Balanza              |                          |
| - Agua destilada       |                          |
| - Mechero bunsen       |                          |
| - Pruebas bioquímicas  |                          |
| - Autoclave            |                          |

### **METODOLOGIA:**

#### **A) Elaboración de medios de cultivo.**

- 1.- Leer las instrucciones que acompañan al medio de cultivo.
- 2.- Calcular la cantidad necesaria del medio a preparar para 50 ml.
- 3.- Pesar la cantidad calculada del medio.
- 4.- Hidratar el medio con veinticinco ml. de agua destilada contenida previamente en un matraz, mezclar bien y adicionar veinticinco ml. de agua teniendo cuidado de que resbale por las paredes del matraz.
- 5.- Colocar en el tripie el matraz y calentar suavemente a la flama del

mechero, agitar a diferentes intervalos hasta llegar a un punto de ebullición teniendo cuidado de que no se derrame.

6.- Retirar el matraz del fuego y colocar un tapón de algodón (para medios en caja). Para medios de cultivo en tubo colocar cinco ml. Del medio en cada tubo con la pipeta y tapar con algodón.

7.- Esterilizar en autoclave los tubos y el matraz a 121° C durante quince minutos.

8.- Dejar enfriar los medios esterilizados.

a) Los tubos se dejan solidificar dependiendo el tipo de siembra que se realiza en ellos ya sea inclinada o vertical.

b) El medio contenido en el matraz se deja enfriar un poco ( 50 a 55°)

9.- Vertir en las cajas de petri esterilizadas cerca del mechero en un volumen aproximado de quince ml. de medio para una capa uniforme y homogénea, dar pequeños giros a las cajas y dejar solidificar.

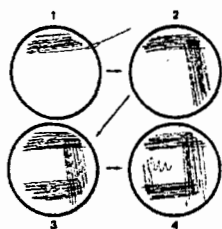
10.- Continuar con la prueba de esterilidad incubando los medios a 37° C durante veinticuatro horas , transcurrido este tiempo se observan los medios de cultivo para descartar la presencia de colonias (medio estéril) . Refrigerar los medios que pasen a la prueba de esterilidad hasta su empleo.

## **B) Tipos de siembra:**

En ésta práctica se inocularán dos medios sólidos en caja por la técnica de agotamiento de asa, uno en forma masiva, dos medios sólidos en tubo por picadura y estría, un semisólido por picadura y un líquido por agitación.

### 1.- Técnica por agotamiento de asa.

Esterilizar el asa de nicromo de punta redonda a la flama del mechero, dejar enfriar el asa cerca del mechero y tomar inculo (cepa bacteriana). Depositar en el cuadrante uno de la caja (observar diagrama) y deslizar el asa sobre la superficie del agar en líneas paralelas, flamear y enfriar el asa, dar un cuarto de giro a la caja e iniciar a estriar de nuevo comenzando con el contacto de las estrías del cuadrante uno, repetir la operación dos veces más.



Siembra por agotamiento de asa

## 2.- Siembra masiva.

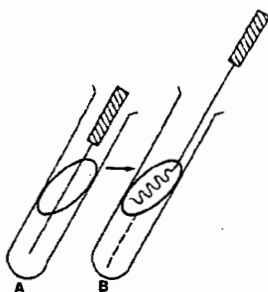
Realizar un estriamiento continuo en toda la superficie del medio con un hisopo, de giro y repita la operación.(siembra útil en antibiogramas)

## 3.- Siembra por picadura y estrías.

Los tubos de agar de hierro y lisina (LIA) agar de hierro y triple azúcar (TSI) serán sembrados por picaduras y estrías. Se esteriliza el asa de punta recta y se deja enfriar para tomar el inóculo, pique el medio hasta el fondo del tubo tratando de que el trayecto de entrada sea el mismo que de salida, y prosiga a estriar en la superficie del viscel comenzando de la parte inferior y terminando en la parte superior.

## 4.- Siembra por estrías

El agar citrato de Simons (Urea, Reducción de nitratos) será siémbrelo por estrías iniciando en la parte inferior del viscel y terminando en la parte superior



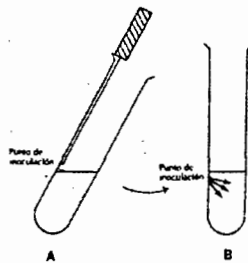
Siembra por estrías y picadura

### 5.- Siembra por picadura.

El medio semisólido (MIO, SIM, OF) se siembra hasta tres cuartas partes del tubo por picadura.

### 6.- Siembra por agitación.

El MR-VP es un caldo que se siembra por agitación, introducir el asa en el caldo y agitar ligeramente, todos los medios incuban veinticuatro horas a 37°C.



## LECTURAS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS.

### Agar de hierro y lisina.

Es un medio utilizado para demostrar la habilidad de la bacteria para descarboxilar la lisina o desaminarla.

Interpretación de resultados:

- El tubo positivo a la descarboxilación de la lisina es todo de color morado.
- El tubo negativo a la descarboxilación de la lisina contiene partes del medio de color amarillo. Se tiene una desaminación de la lisina cuando el tubo toma un color rojo.

### Agar citrato de Simmon's .

Es útil para determinar la capacidad bacteriana para utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Interpretación de resultados:

Se considera como positivo el cambio de color del medio de verde a azul.

Agar de hierro y triple azúcar.

Se determina la oxidación o fermentación de lactosa y glucosa, así como la producción de ácido sulfídrico. ( $H_2S$ )

Interpretación de resultados:

Positivo a lactosa y glucosa cuando todo el tubo toma un color amarillo.

Negativo a lactosa y positivas a glucosa cuando solo vira a color amarillo del viscer del medio hacia abajo.

Negativo a lactosa y glucosa sino hay cambio de color del medio.

Positivo a la producción de  $H_2S$  cuando toma un color negro el medio.

Agar urea.

El agar urea se siembra por estrias y es utilizado para demostrar si la bacteria tiene la capacidad para utilizar la urea como fuente de  $N_2$ .

Interpretación de resultados:

La prueba se considera positiva si toma un color rosa mexicano.

MR-VP.

La prueba rojo de metilo (MR). Determina el grado de acidez que algunos gérmenes producen por hidrólisis de la glucosa.

Voges proskauer (VP) es una prueba que detecta si la bacteria produce acetil metil carbinol después de la degradación de la glucosa en presencia de peptonas.

Procedimiento de lectura: dividir el medio en dos tubos

1.- A uno agregar cuatro gotas de reactivo rojo de metilo.

Interpretación de resultados:

Es positiva a rojo de metilo si el tubo toma un color rojo intenso.

2.- Colocar en el segundo tubo 0.2ml de NaOH 40%

0.6 ml de Alfa Naftol.

Interpretación de resultados:

Se interpreta positivo a voges proskauer si el medio cambia a rosa, la suspensión del medio se deja reposar hasta 14 minutos para su lectura.

Medio MIO:

Se detecta la movilidad, indol y descarboxilación de la ornitina.

La producción del indol se lleva acabo cuando la bacteria produce triptofanasa



y oxida el triptofano.

Interpretación de resultados:

- a) La descarboxilación de la ornitina se lee como positiva cuando el tubo permanece de color morado.
- b) La movilidad se puede detectar por opacidad del medio y lo precipitado.
- c) El indol se detecta al agregar cinco gotas de reactivo de Kovacs, si forma un anillo rojo la prueba es positiva.

#### Medio OF:

Empleado para determinar la oxidación o fermentación de la glucosa.

La prueba utiliza un par de tubos con la diferencia de que uno contiene un sello de aceite.

Interpretación de resultados:

- a) Si los medios de los tubos viran a un color amarillo se tiene una fermentación.
- b) Cuando vira sólo el medio del tubo sin sello y el otro permanece verde la prueba se considera que existe una oxidación.
- c) Cuando los dos medios de los tubos están en color verde la reacción se considera negativa.

#### **RESULTADO:**

#### **CONCLUSIONES :**

## ESTUDIO DE LA MORFOLOGIA MACROSCOPICA COLONIAL

La morfología colonial se interpreta en base a la forma, elevación, margen o bordes, tamaño, color, luz reflejada, luz transmitida y consistencia.

### Forma

puntiforme



irregular



circular



rizoide



filamentosa



tesiforme



### Elevación

plana



monocular



elevada



umbeliforme



convexa



umbilicada



### Margen

entero



aserrado



ondulado



filamentoso



lobulado



rizado



**CUESTIONARIO.**

- 1.-¿Cuáles son los requerimientos mínimos indispensables que necesita una bacteria para su crecimiento?
- 2.-¿Qué factores influyen el crecimiento bacteriano?
- 3.-¿Por qué es importante la utilización de indicadores de pH?
- 4.- Mencione el requisito indispensable para identificar las colonias bacterianas.
- 5.- Investigue las siembras bacterianas utilizadas en los cultivos bacteriológicos cuantitativos.

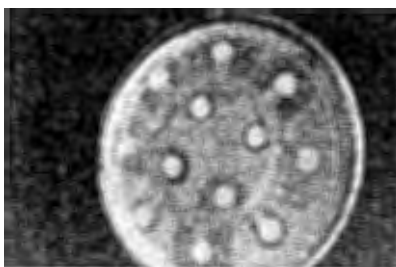
## INHIBICION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO. Práctica No. 3

### INTRODUCCION:

La inhibición del crecimiento bacteriano se puede efectuar mediante métodos físicos y químicos. Dentro de los métodos físicos se tiene la ebullición, vapor a presión, flameado, incineración, filtración y radiaciones.

Los métodos químicos son utilizados para desinfección o esterilización, los más utilizados óxido de etileno y formaldehído. Los desinfectantes involucran agentes químicos diversos, algunos de ellos dependiendo su concentración, varía el efecto de inhibición bacteriana como halógenos, detergentes, alcoholes, fenoles, agentes oxidantes, colorantes y metales pesados.

Existe otro grupo de sustancias químicas más específicas en cuanto su acción es llamado antibióticos porque originalmente se elaboraban de microorganismos vivos. Actualmente existe una técnica utilizada para detectar la acción de los antibióticos "in vitro" llamada Kirby-Bauer; son pruebas cualitativas que se apoyan en la utilización de agares de difusión. Es importante realizarla ya que muchas cepas que eran susceptibles a ciertos antibióticos ahora son resistentes.



Antibiograma

### OBJETIVOS:

- ❖ Conocer los efectos de los agentes físicos sobre los cultivos bacterianos.
- ❖ Determinar las susceptibilidad "in vitro" de las bacterias a los antibióticos.

**MATERIAL:**

- 3 cajas de petri con medio de Mueller-Hinton.
- 1 hisópo estéril
- 1 mechero bunsen
- 1 pinzas
- 8 ml. de Muller-Hinton a 56°C
- discos de antibióticos
- Moneda de cobre
- Lámpara de luz ultravioleta
- Estufa de incubación a 37°C
- Tubo con agua destilada
- Tubo de Mac Farland (0.5)
- Cepas bacterianas.
- Agua destilada estéril.

**METODOGIA:****A) Efectos de la luz ultravioleta sobre las bacterias.**

- a) Destape el tubo con la cepa bacteriana cerca del mechero bunsen e introduzca el hisópo estéril.
- b) Tome una caja con medio Mueller Hinton (MH) y siémbrela por estrias con el hisópo toda la caja cuidando que las estrias estén una muy cerca de la otra, dé medio giro a la caja y repita la operación (siembra masiva).
- c) Incinere el hisópo y deposítelo en un bote.
- d) Coloque un pequeño cartón de fondo negro con la finalidad de cubrir la mitad de la caja y expóngalo a la luz ultravioleta de longitud de onda corta por cinco minutos.
- e) Incube a 37°C durante 24 hrs.

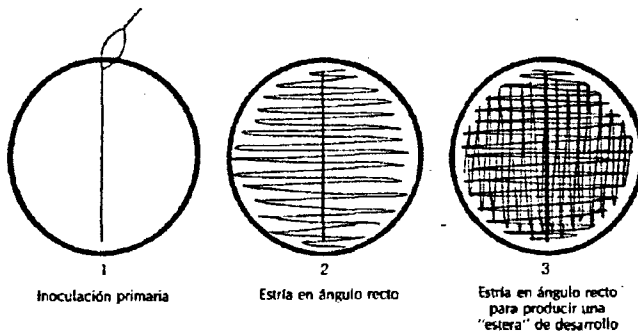
**B) Efectos del cobre sobre las bacterias.**

- a) Lave la moneda y séquela, tómelala con las pinzas y colóquela sobre el medio de MH en el centro de la caja.
- b) En el medio de MH a 56°C coloque una asada bacteriana, homogeneice y agite con cuidado, viértalo en la caja anterior, no olvide esterilizar el asa una vez realizada la siembra.
- c) Esperar a que solidifique y después incubar a 37°C durante 24 hrs.

### C) Antibiograma.

- a) Agregue cepa bacteriana al tubo con agua destilada estéril hasta ajustarlo a la turbidez del tubo de Mac Farland que corresponde a una concentración de  $5 \times 10^7$  a las 7 unidades formadoras de colonias (UFC)
- b) Inocule la caja de MH por siembra masiva con ayuda del hisopo previamente impregnado de la suspensión bacteriana estandarizada.
- c) Tome los discos de papel filtro con antibióticos ayudándose con las pinzas y depositándolos en el medio ya sembrado.
- d) Incube por 24 hrs. a  $37^\circ\text{C}$ .

#### Siembra masiva



### RESULTADOS:

### CONCLUSIONES :

**CUESTIONARIO:**

- 1.-¿Qué actividad presentó la luz ultravioleta en las células bacterianas?
- 2.- Describa la importancia de la susceptibilidad de las bacterias a diferentes agentes.
- 3.-¿A qué se le llama resistencia bacteriana?
- 4.- Mencione las diferentes pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos.
- 5.-¿En qué casos se utiliza la filtración como método de esterilización?

**BACTERIOLOGIA**  
**DETERMINATIVA**



## TOMA DE MUESTRAS Y SU ENVIO AL LABORATORIO

Un problema común en el laboratorio es consecuencia del envío inadecuado de muestras, las que además carecen de historia clínica o comentarios del médico que las envía. El diagnóstico en el laboratorio está determinado por la selección de una muestra apropiada, condiciones de manejo y el envío al laboratorio. Aunado a esto es importante conocer datos clínicos que le permitan al laboratorista optimizar técnicas de aislamiento bacteriano y así proceder a su identificación y como última fase el reto a antibióticos.

Las muestras deberán tomarse de casos clínicos representativos de la enfermedad que está causando el problema, para exámenes bacteriológicos es ideal tomarse en condiciones de aséptica, en recipientes de boca ancha, limpios y estériles, o en una bolsa de nylon nueva, dependiendo el caso con hisopo o jeringa. Para evitar la pérdida de humedad algunas muestras deben de ser enviadas con medio de transporte.

Las muestras deben de ir acompañadas de datos que las identifiquen y permitan facilitar su estudio:

- a) Nombre y dirección del M.V.Z. o remitente.
- b) Nombre y dirección del propietario.
- c) Ubicación de la granja
- d) Actitud zootécnica
- e) Especie, edad, sexo, raza.
- f) Número de animales en la granja, número de enfermos.
- g) Morbilidad, mortalidad.
- h) Tiempo de evolución de la enfermedad
- i) Signos clínicos
- j) Que vacunas se administraron y su calendario de vacunación.
- k) Tratamientos aplicados y fecha de aplicación.
- l) Problemas de las granjas circunvecinas.
- m) Tipo de muestra y análisis solicitado.
- n) Hora de obtención de la muestra y vehículo empleado.

Es importante enviar las muestras al laboratorio lo más pronto posible y preservarlas en frío 4 C, no congelar solo que utilice nitrógeno líquido.

Algunas recomendaciones se describen a continuación dependiendo el tipo de muestra:

- a) **Leche** : debe tomarse antes de la ordeña previa desinfección del pezón, mandar como mínimo 15 ml.
- b) **Absceso** : Tomar con jeringa estéril 1ml aproximado o en su defecto tomar con hisopo.
- c) **Heces fecales** : **No tomar del suelo**, enviar en recipiente estéril o bolsa de nylon nueva, en pequeñas especies se puede usar un hisopo que se introduce en el recto y en grandes especies un guante de palpación.
- d) **Organos** : Enviar zonas de órganos con lesiones características, estos deben enviarse por separado en frasco estériles o bolsas nylon nuevas. El intestino antes de seccionarlo ligar las extremidades para evitar la salida del contenido.  
En casos de septicemia se recomienda mandar bazo, hígado, pulmón, cerebro y corazón. Si hay aborto enviar el feto completo o contenido intestinal, sangre y placenta.
- e) **Sangre** : Tomar en forma aséptica, utilizar como desinfectante yodo-alcohol, obtener no menos de 5ml de sangre, e introducirla en un tubo estéril con anticoagulante dejando que resbale en forma suave por las paredes del tubo tape y homogeneice, con la finalidad de evitar la coagulación.
- f) **Suero** : Realizar la técnica anterior pero sin anticoagulante, después de vaciar la sangre no homogeneice sólo deje el tubo inclinado para que libere más suero. Si no puede transportarlo de inmediato después de 2 hrs, separe el suero separar el suero en otro tubo estéril y refrigere.
- g) **Aislamiento de anaerobios** : Las muestras que pueden ser hisopos u órganos de los que se pretende aislar bacterias anaerobias deben transportarse en frascos herméticos con medio de transporte y enviar rápido al laboratorio.

Todo laboratorio debe contar con libros y hojas de registro para anotar los datos de las muestras que son remitidas a este, es importante que todos los datos obtenidos así como los resultados queden registrados para posteriores estudios epizootiologicos o de investigación.

## EFFECTO BIOLÓGICO DE LOS DESINFECTANTES PRACTICA # 1

### INTRODUCCION

La desinfección es una de las medidas más importantes de saneamiento que tiene como propósito específico la eliminación o destrucción de los microorganismos patógenos sobre superficies inanimadas. La desinfección ha tenido diversas etapas en la evolución del hombre, inicia con el descubrimiento del fuego, el cual fue empleado para conservar alimentos, cauterizar heridas y cremar cadáveres. Con el descubrimiento de los antibióticos y el uso de biológicos la desinfección es relegada a un segundo plano para después emerger como una primera necesidad dentro del saneamiento del medio, que tiene como propósito fundamental prevenir la presencia de enfermedades.

### MATERIAL :

- Cajas con medio Mueller Hinton
- Sustancias químicas (alcohol 70%, yodo 2%, formaldehído 5%, fenol 5%, agua oxigenada, hipoclorito de sodio 2%, sulfato de cobre 5%, benzaldehído 5%, merthiolate).
- Mechero bunsen
- Pinzas
- Gradilla
- Discos de papel filtro
- Caja de petri estéril
- Pipeta estéril
- Caldos nutritivos
- Cepa bacteriana
- Heces fecales
- Estufa bacteriológica
- Marcador
- Lápiz
- Tubos con agua destilada

### OBJETIVOS:

Evidenciar la acción "in vitro" de algunas sustancias químicas sobre las bacterias.

## METODOLOGIA :

### a) Susceptibilidad de las bacterias a los desinfectantes.

- 1.- Con un lápiz marque los discos de papel filtro con contraseñas que correspondan a las sustancias químicas empleadas.
- 2.- Esterilizar su asa de nicromo y tomar una asada bacteriana con la finalidad de realizar una dilución al introducirla al tubo con agua destilada.
- 3.- Tomar un hisopo e impregnarlo con la suspensión bacteriana para proseguir a la siembra utilizando el medio Mueller Hinton y sembrarlo en forma masiva .
- 4.-Sujetar un disco ya marcado de papel filtro con las pinzas y sumergirlo en la sustancia química que le corresponde a la clave.
- 5.- Colocar el disco en el medio ya sembrado y cuidar que la clave este en el fondo de la caja. Repetir la operación con cada sustancia química.
- 6.- Incubar la caja a 37° C por un tiempo de 18 -24 hrs.

Interpretación de resultados:

Observar los halos de inhibición que demuestran la susceptibilidad de las bacterias al agente químico.

### b) Coeficiente fenolico:

Para esta prueba se cuenta con una serie de 4 tubos los cuales contienen agua destilada y serán utilizados para realizar dilusiones (1:10, 1:50, 1:100, 1:1000) del desinfectante a probar .

- 1.-Tomar el tubo 1 que contiene 4.5ml de agua destilada y agregar 0.5ml del desinfectante que se desea probar, agitar y tomar 2.5 ml del tubo 1 y depositarlo en el tubo 2 homogenice y repita la operación con los tubos 3,4.
- 2.- Depositar 5ml de fenol al 2% en un tubo de vidrio estéril.
- 3.- Colocar en cada tubo 0.25ml de la suspensión bacteriana previamente ajustada.
- 4.- Incubar los tubos 10 min a una temperatura de 20 °C, con la finalidad de que actúen los desinfectantes contra las bacterias.
- 5.- Transcurrido este tiempo observar si existe turbidez y en que tubo. Tomar el medio de gelosa sangre y dividir el fondo de la caja en seis partes con un marcador.
- 6.- Esterilizar el asa de nicromo y sembrar el contenido de cada tubo por estrías, no olvidar marcar la parte que le corresponda a cada tubo. Incubar a 37° C durante 24 hrs.

**c) Inactivación de algunos desinfectantes por materia orgánica.**

- 1.- Colocar en cuatro cajas de petri restos de heces fecales.
- 2.- Adicionar a cada una un desinfectante diferente escogido al asar, dejar actuar 30 min.
- 3.- Transcurrido el tiempo tome un papel filtro con las pinzas e imprégnelo con la suspensión de la caja , deposite el papel en el medio MH.
- 4.- Repita la operación con las cajas 2, 3, 4; cuidar que los discos de papel impregnado no estén cerca uno de otro. Incubar a 37° C durante 24 hrs.

Interpretación de resultados:

Si el desinfectante no actuó en presencia de materia orgánica se observará crecimiento alrededor del papel filtro.

**RESULTADOS :****CONCLUSIONES :****CUESTIONARIO :**

- 1.- ¿Cuál es la diferencia entre un desinfectante, antiséptico y antibiótico?
- 2.- ¿Qué características tiene un desinfectante ideal?
- 3.- ¿Cuáles elementos se deben tomar en cuenta para seleccionar el desinfectante a utilizar?
- 4.- Mencione que pruebas “in vitro” existen para probar antibióticos.
- 5.- ¿Qué elementos se deben de tomar en cuenta para la administración de antibióticos?.
- 6.- ¿ Por qué las bacterias son resistentes a los antibióticos?

## COPROCULTIVO PRACTICA # 2

### INTRODUCCION :

El excremento es el producto de descarga intestinal, contiene bacterias, células exfoliadas del intestino, secreciones principalmente hepáticas y pequeñas cantidades de alimento residual. Una de las manifestaciones más frecuentes de infección intestinal bacteriana es generalmente la presencia de heces acuosas (diarrea). En animales jóvenes principalmente porcinos, bovinos, ovinos, equinos y aves las causas más comunes de muertes se deben a problemas respiratorios y digestivos, siendo en este caso las diarreas la manifestación y secuencia del proceso infeccioso. Cuando se presentan infecciones intestinales las manifestaciones clínicas son enteritis, diarrea, deshidratación, dolor abdominal, fiebre, septicemia, toxemia los cuales varían dependiendo el agente etiológico, la edad, especie y resistencia individual. Entre los agentes bacterianos que ocasionan trastornos en intestino y los cuales se pueden encontrar en heces fecales con mayor frecuencia están: *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Campylobacter sp*, *Clostridium perfringens*, *Serpulina hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis*.

El diagnostico de los problemas entericos incluye el análisis por parte del clínico de los cambios patológicos y funcionales de los animales, así como problemas de higiene para el manejo de excretas, agua y alimento; como posibles fuentes de contaminación y del análisis bacteriológico que nos apoya a determinar el agente infeccioso involucrado con el fin de establecer un control epidemiológico y evitar perdidas económicas.

La correcta identificación de las bacterias dependerá básicamente de la toma de muestras, su transporte, técnicas laboratoriales y medios diferenciales a utilizar para descartar los microorganismos saprofitos y flora normal del tracto gastrointestinal.

### OBJETIVOS:

- Conocer la importancia de los cultivos bacteriológicos y poder realizarlos.
- Adiestrar al alumno en técnicas de aislamiento e identificación bacteriana.
- Reconocer la flora bacteriana patógena en la mucosa intestinal.

**MATERIAL :**

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asas de nicromo (redonda y recta)
- Juego de tinción Gram
- Medios de cultivo (Selenito, Eosina y azul de metileno, Verde brillante, MacConkey, Sulfito de bismuto).
- Medios para identificación de pruebas bioquímicas.
- Microscopio
- Estufa de incubación.

**PROCEDIMIENTO :****a) Microscopia. \***

- 1.-Hacer un frotis fresco con las heces fecales y observar al microscopio.
- 2.- Realizar un frotis fijo y teñirlo por la tinción de Gram, esperar a que seque y observar al microscopio.

\*Referencia en practicas anteriores

**b) Aislamiento**

- 1.-Sembrar por agotamiento de asa en las cajas de petri que contienen los medios sólidos excepto el verde brillante y sulfito de bismuto.
- 2.- Al caldo selenito agregar ½ gramo de heces fecales.
- 3.- Incubar las cajas y el tubo en aerobiosis a 37° C por 24 hrs.
- 4.- Reportar crecimiento, identificar colonias, diferenciarlas , hacer frotis y teñir con la técnica de Gram.
- 5.- Resembrar a partir del caldo selenite en el medio de verde brillante por la técnica agotamiento de asa, incubar 37 °C por 24 hrs.

**c) Identificación**

- 1.- Realizar pruebas bioquímicas según el aislamiento.  
Incubarlas 24- 48 hrs. a 37° C; tomar lectura.
- 2.- Comparar con tablas de identificación.



Cultivo de *Escherichia coli*

## RESULTADOS :

## COCLUSIONES :

## CUESTIONARIO :

- 1.- ¿Cómo identifica al género *Salmonella sp?*
- 2.- ¿Cuáles son los requerimientos nutritivos para el aislamiento de *Campylobacter?*
- 3.- ¿ Que ambiente atmosférico requiere el género *Treponema sp?*
4. - Mencione las principales diferencias bioquímicas entre el género *Salmonella sp* y *Escherichia coli*.
- 5.-Desde el punto de vista económico que géneros bacterianos que afectan el sistema digestivo causan más pérdidas.
- 6.- Mencione tres géneros bacterianos que ocasionen cuadros diarreicos y sean importantes por ser zoonoticos.
- 7.- ¿A que especies animales afecta el género *Campylobacter sp.?*



## CULTIVO BACTERIOLOGICO DE PULMON PRACTICA # 3

### INTRODUCCION :

La neumonía no es una enfermedad única, sino el nombre por el que se designan diversos tipos de inflamaciones pulmonares causadas por microorganismos infecciosos como las bacterias. Entre los géneros bacterianos más importantes por inducir problemas respiratorios están : *Haemophyllus sp.*, *Pasteurella sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Bordetella sp.*, *Clamydea psittasi*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Streptococcus sp.*

Entre las muestras idóneas para el aislamiento de bacterias que afectan el aparato respiratorio están los pulmones, se requiere aproximadamente 4 cm de tejido. También se puede realizar el cultivo de lavados traqueobronqueales (5 ml), ganglios linfáticos mediastínicos. La elección de las muestras dependerá de la experiencia clínica, del diagnóstico presuntivo y hallazgos a la necropsia

### MATERIAL :

- Pulmón
- Agar sangre, agar Macconkey, agar chocolate
- Tijeras, pinzas de disección, espátula
- Caja de petri estéril
- Mechero bunsen
- Asa de nicromo punta redonda y punta lisa
- Juego de colorantes para tinción de Gram
- Pruebas bioquímicas necesarias para identificación.

### OBJETIVOS:

- ❖ Realizar cultivos bacteriológicos de pulmón
- ❖ Adiestrar al alumno en técnicas de aislamiento e identificación bacteriana.
- ❖ Reconocer la flora bacteriana patógena en vías respiratorias.

### METODOLOGIA :

1.- Depositar una parte del pulmón en la caja de petri estéril, tomar la espátula y calentarla al rojo vivo con la finalidad de esterilizarla, una vez estéril colocarla sobre la superficie del tejido cauterizándolo.

- 2.- Sumergir las pinzas y tijeras en alcohol , sacarlas y pasarlas por la flama del mechero , ya estériles retirar la superficie del tejido quemado.
- 3.- Tomar un trozo de muestra de la superficie que fue previamente descontaminada y frotar en cada caja de medio de cultivo en un cuadrante.
- 4.- Resembrar la caja por la técnica de agotamiento de asa ; cuidar el iniciar la siembra en el cuadrante donde se froto parte del órgano.
- 5.- Si el caso lo requiere agregue una cepa de *Staphylococcus (Actynobacillus pleuroneumoniae, Haemophyllus paragallinarum , etc)*.  
Incubar los medios sembrados a 37 C durante 24 –48 hrs.
- 6.- De las colonias aisladas describir la morfología macroscópica colonial , realizar frotis fijos de cada colonial diferente.
- 7.- Realizar tinción de Gram y observar morfología bacteriana.
- 8.- Realizar las pruebas de identificación bioquímica necesarias para la determinación de género y especie.

## RESULTADOS :

## CONCLUSIONES :

## CUESTIONARIO :

- 1.- ¿ Que características presenta el género *Haemophyllus sp?*
- 2.- ¿ Cuales son los medios especificos para el aislamiento de *Mycobacterium sp?*
- 3.- Las bacterias que afectan las vías respiratorias de los cerdos son :
- 4.- En bovinos ¿Cuáles son las principales bacterias que afectan el aparato respiratorio?
- 5.- ¿ Por que vías las bacterias llegan a colonizar pulmones?
- 6.- De los géneros bacterianos que afectan el aparato respiratorio ¿Cuales se consideran zoonoticos?

## DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE *Brucella abortus* PRACTICA # 4

### INTRODUCCION :

La brucelosis o enfermedad de Bang es causada por bacterias del género *Brucella* sp. provoca aborto, disminución de la producción láctea, orquitis, epididimitis entre otras. Es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los animales y al hombre por lo que se considera una zoonosis.

Las pruebas de diagnostico clínico más utilizadas son las pruebas serológicas basadas en pruebas inmunológicas en cuyo caso se requiere suero del animal no hemolisado y el cultivo bacteriológico de tejidos, órganos, sangre y leche.

El diagnostico serológico se prefiere por su rapidez, entre las pruebas para la detección de *Brucella abortus* aceptadas por la campaña de erradicación de la brucelosis se tienen : anillo en leche, tarjeta, rivanol y fijación del complemento.

### OBJETIVOS :

- ❖ Conocer los métodos de diagnostico serológico más comunes e identificar cuales se pueden realizar a nivel de campo.
- ❖ Percatarse de las ventajas y desventajas de cada método.

### MATERIAL :

- Aglutinoscopio
- Pipetas graduadas de 0.1 ml
- Sueros
- Leche no pasteurizada
- Rivanol
- Antígenos elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* teñido con rosa de bengala en ácido láctico a un pH 3.65 (+/-0.05 ) concentración celular del 8%.
- Antígeno elaborado con cepa 1119-3 de *B. abortus* teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta con pH 5.8-6.2 a concentración celular del 4%.

## METODOLOGIA :

### a) Prueba de la Tarjeta:

- 1.- Depositar 0.03 ml de suero problema en un cuadro del vidrio y adicionar 0.03 ml de antígeno teñido con rosa de bengala.
- 2.- Mezclar con un palillo de madera en una área de 20 a 22 mm de diámetro y realizar movimientos rotatorios a la placa lentamente por un periodo de 4 min.
- 3.- Realizar lectura.

Los resultados de esta prueba son cualitativo. La presencia de aglutinación indica positividad y la ausencia negatividad.

### b) Prueba de Rivanol :

- 1.- Colocar 0.2 ml de suero en un tubo de vidrio previamente identificado
- 2.- Adicionar 0.2 ml de solución de rivanol ,mezclar y dejar reposar 20 min. a temperatura ambiente.
- 3.- Centrifugar a 1000 r.p.m. cabezal de 23 cm durante 5 min. el precipitado debe de quedar bien compacto en el fondo y el sobrenadante adquiere un color amarillo .
- 4.- Con la pipeta colocar cantidades de 0.08, 0.04 , 0.02 y 0.01 ml del sobrenadante sobre la placa de vidrio.
- 5.- Agregar 0.03 ml del antígeno de rivanol a cada cantidad, mezclar con un palillo comenzando con la dilución más pequeña, inclinar la placa girándola varias veces, esperar 12 min.
- 6.- Rotar nuevamente la placa y leer la reacción.

Lectura : la presencia de aglutinación nos indica una prueba positiva, en la primera dilución corresponde un título 1:25 , y sucesivamente 1:50, 1: 100, 1: 200.

Los bovinos se consideran positivos en dilución igual o mayor a 1:50

## RESULTADOS :

## CONCLUSIONES :

**CUESTIONARIO :**

- 1.- ¿Qué morfología tiene el género *Brucella sp?*
- 2.- ¿Por qué es poco utilizado el cultivo de *Brucella sp?*
- 3.- ¿Cuántas especies bacterianas conforman el género *Brucella sp?*
- 4.- ¿El aborto es el único signo del género *Brucella sp?*
- 5.- ¿Cuántos tipos de morfología colonial presenta el género *Brucella sp?*
- 6.- ¿Cuales sectores de la población están expuestos a la *Brucella sp?*
- 7.- Mencione otros géneros bacterianos que provoquen aborto.

CUORNA

BRUCELLA

## ANALISIS BACTERIOLOGICO DE LECHE MAMITOSA PRACTICA # 5

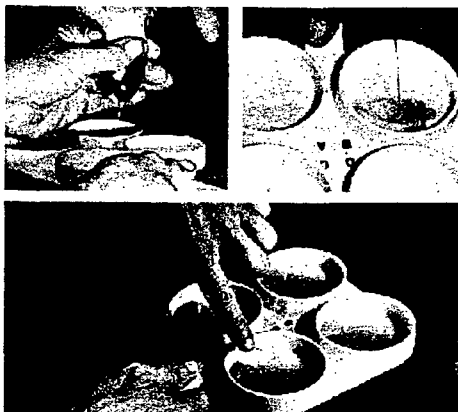
### INTRODUCCION :

La inflamación de la glándula mamaria (mastitis) está asociada a diversos factores como traumatismos, agentes químico e infecciosos. Entre los agentes infecciosos predominan las bacterias y los hongos . La enfermedad se presenta en todas las especies de mamíferos. La infección puede alterar la composición, cantidad, aspecto y calidad de la leche.

Desde el punto de vista económico la mastitis bovina opaca a las demás y a menudo se presenta cuando la resistencia de la vaca esta disminuida por estrés. Los factores como practicas incorrectas de ordeño, permanencia de la leche en la ubre y la falta de higiene son los más importantes. Un papel importante es la transmisión por las manos de los ordeñadores, por pezoneras de la maquina ordeñadora, cuando la vaca se hecha sobre la cama o piso contaminado, además factores genéticos, nutricionales y fisiológicos.

Las mastitis bacterianas pueden ser endógenas y exógenas. Las primeras tienen su origen en el organismo y a través de la circulación sanguínea afecta a la glándula mamaria tanto como a otros órganos, la evolución de estos tipos de mastitis depende de las propiedades patogénicas de los respectivos gérmenes. El mayor porcentaje de mastitis es del tipo exógeno, las bacterias llegan a la glándula del medio ambiente donde se encuentra la vaca y penetran por el orificio del pezón.

El diagnostico de la mastitis por pruebas de campo como la de California, el principio de esta prueba se basa en la utilización de un detergente con indicador (Reactivo de California) este actúa como agente tensioactivo destruyendo la membrana de los leucocitos y en ese momento, el ácido desoxirribonucleico que contienen en su núcleo al mezclarse con la leche forma un gel. Observación clínica (dolor, inflamación, calor, alteración funcional, etc.) y análisis bacteriológico de la leche.



Prueba de California.

## OBJETIVOS :

- ❖ Realizar prueba de California para la detección de mastitis subclínica.
- ❖ Aislar el agente etiológico causante de mastitis en la vaca.

## MATERIAL :

- Muestra de leche mamitosa (15 ml).
- Caja de agar sangre, agar macconkey.
- Mechero bunsen, asas bacteriológicas.
- Portaobjetos.
- Juego de colorantes tinción de Gram.
- Juego de colorantes tinción Ziehl-Neelsen.
- Medios para pruebas bioquímicas las necesarias para identificar a los microorganismos aislados.
- Marcador punta fina, agua destilada.

## METODOLOGIA :

- 1.- Exponer la leche a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo agitar hasta homogeneización.

- 2.- Realizar dos frotis fijos, uno se tiñe con Gram y otro con Ziehl-Neelsen, observar y anotar resultados.
- 3.- Mezclar la leche y tomar una asada para inocular los agares por la técnica de agotamiento de asa, incubar 24 hrs. a 37° C.
- 4.- Observar morfología colonial, realizar tinción de Gram de cada tipo de colonias diferente, observar laminilla y anotar resultados.
- 5.- Sembrar pruebas bioquímicas para determinar género bacteriano, incubar a 37° C de 18-24 hrs.
- 6.- Lectura de pruebas bioquímicas y comparación con tablas para su identificación.

### **RESULTADOS :**

### **COCLUSIONES :**

### **CUESTIONARIO :**

- 1.- Mencione tres géneros bacterianos que cause mastitis exógena.
- 2.- De las mastitis endogenas los principales géneros bacterianos responsables son:
- 3.- ¿Cuáles son las bacterias que tienen importancia en salud pública y son transmitidas por la leche?
- 4.- ¿Qué recomendaciones daría para evitar contraer infecciones bacterianas por el consumo de leche contaminada?
- 5.- Sugerir algunos métodos de control de mastitis.



## ANALISIS BACTERIOLOGICO DE EXUDADO OTICO. PRACTICA # 6

### INTRODUCCION :

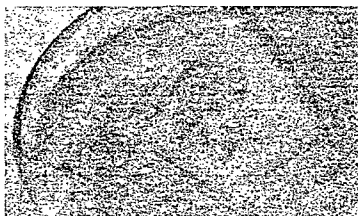
La otitis externa resulta de cualquier inflamación del conducto auditivo externo. Existen numerosos agentes etiologicos como bacterias, levaduras, parásitos y virus, como causa primaria o secundaria en el canal auditivo predispuesto por otra enfermedad o anomalías.

En la otitis bacteriana una vez que se establecen y colonizan las bacterias perpetúan la otitis y contribuyen a cambios crónicos dentro del canal. Algunos signos clínicos son el prurito, secreción o mal olor. El prurito en el canal auditivo y en el pabellón se observa cuando el animal sacude la cabeza, se rasca las orejas contra el piso u objetos; la evidencia del prurito se observa en el examen físico del pabellón y canal auditivo, hay alopecia, excoriaciones, el pelo se enreda y ocasionalmente áreas con dermatitis, generalmente los signos se limitan a eritema y aumento del cerumen. Cuando se complica la cantidad de secreción aumenta llega a ser purulentas, húmedas y fétidas, la inflamación es grave y dolorosa quejándose el animal a la palpación. En algunos casos el grado de inflamación es subclínico.

El canal auditivo normal aloja microorganismos como *Staphylococcus sp*, *Streptococcus beta hemolíticos*, *Micrococcus sp*. En la mayoría de las infecciones crónicas del oído se aísla *Proteus mirabilis*, *Pseudomona sp.*, *Pasteurella multocida*. Las infecciones mixtas por lo general se componen de *Staphylococcus sp.* y bacilos gram negativos.

La mayoría de las infecciones del canal auditivo son secundarias a otra enfermedad o hay situaciones que hacen susceptible el canal a las infecciones por microflora oportunista o normal. Muchos factores predisponentes son afecciones de la queratinización, atopías, estrechamiento u obstrucción del canal por anomalías anatómicas, hipersensibilidad y endocrinopatías.

Cultivo de *Staphylococcus aureus*



**OBJETIVOS :**

- ❖ Aislar e identificar un género bacteriano que este causando problemas de otitis externa en caninos.

**MATERIAL :**

- Hisopo con exudado otico de un canino
- Agar sangre, agar macckonkey, caldo casoy.
- Asas de nicromo punta redonda y punta recta.
- Mechero bunsen, portaobjetos.
- Juego de colorantes para tinción de Gram.
- Pruebas bioquímicas las necesarias para la identificación de microorganismos aislados.

**METODOLOGIA :**

- 1.- Estriar con el hisopo una parte de los medios sólido en caja introducir el hisopo en el caldo casoy.
- 2.- Esterilizar el asa de nicromo punta redonda , espere a que se enfríe y siembre las cajas por agotamiento de asa iniciando con el sitio donde paso el hisopo.
- 3.- Incubar a 37 C durante 24 hrs.; observar la morfología macroscópica colonial e identificar las diferentes colonias.
- 4.- Realizar tinción de Gram ,pruebas de catalasa, y oxidasa a cada colonia diferente observada.
- 5.- Sembrar pruebas bioquímicas las necesarias para determinar el género aislado, incubar a 37 C por 24 hr.
- 6.- Leer las pruebas bioquímicas y los resultados compárelos con las tablas para su identificación.

**RESULTADOS :**

**CONCLUSIONES :****CUESTIONARIO :**

- 1.- ¿Que especies animales son más susceptibles a sufrir cuadros de otitis
- 2.- Las bacterias que afectan el conducto auditivo se consideran zoonoticas.
- 3.- En casos de otitis que recomendaciones daría para prevenirlas.

**APENDICE****A) COLORANTES Y REACTIVOS.****1.- TINCION DE GRAM MODIFICADO POR HUCKER****a) Cristal violeta**

Solución A	
Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico 95%	20 ml

Solución B	
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80 ml

Mezclar la solución A y B , almacene 24 hrs en un frasco de vidrio ámbar. Transcurrido este tiempo filtre la mezcla.

**b) Lugol**

Yodo cristales	0.5 g
Yoduro de potasio	1.0 g
Agua destilada	150 ml

Guardar en frasco ámbar y protegerse de la luz

**c) Alcohol-acetona**

Acetona	100 ml
Alcohol etílico 95%	100 ml

**d) Safranina****Solución Stock**

Safranina O	0.25 g
Agua destilada	10 ml

**Solución de trabajo**

Solución stock	10 ml
Agua destilada	90 ml

**Ziehl-Neelsen (Mycobacterias)****a) Carbol Fucsina**

Fucsina básica	0.15 g
Alcohol etílico 95%	5 ml
Fenol cristales	2.5 g
Agua destilada	47.5 ml

Disolver la Fucsina en alcohol, el fenol disuélvalo en agua y Mezcle ambas soluciones.

**b) Alcohol Acido**

Alcohol etílico 95%	97 ml
Acido clorhídrico	3 ml

**c) Azul de Metileno**

Azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	100 ml

**REACTIVO VP.****Solución alfa Naftol**

*Alfa Naftol	5.0 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml

**Solución NaOH al 40%**

Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua destilada	100 ml

**REACTIVO ROJO DE METILO**

Rojo de metilo	0.04 g
Alcohol etílico	40 ml
Agua destilada	100 ml

**REACTIVO KOVACS**

P- dimetil aminobenzaldehido	5 g
Alcohol isoamilico	75 ml
Acido clorhídrico concentrado	25 g

Disolver por calentamiento suave en baño maría (50-55 C)  
Enfriar, agregar el ácido . Proteger de la luz y refrigerar.

**PRUEBA DE NITATOS****a) Solución A**

Acido sulfanilico	0.8 g
Acido acético	100 ml

Disolver por calentamiento suave

**b) Solución B**

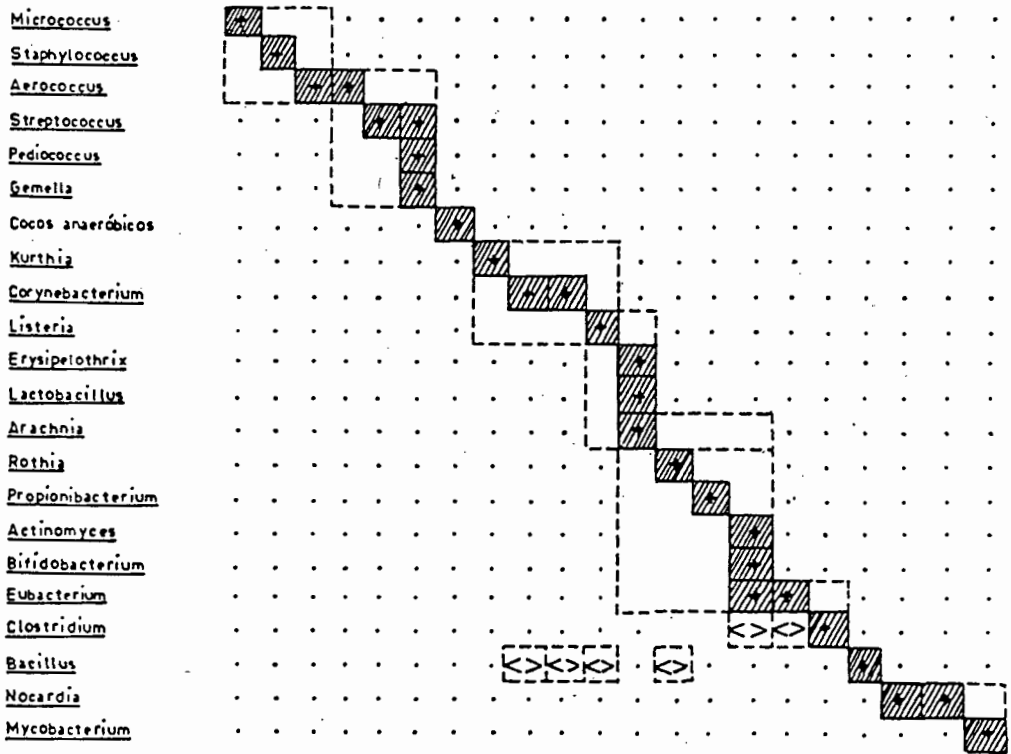
*Alfa Naftilamina	0.5 g
Acido acético	100 ml

**TABLAS DE IDENTIFICACION  
BACTERIOLOGICA**



# PRIMERA ETAPA PARA IDENTIFICAR BACTERIAS GRAM POSITIVAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21.	
FORMA	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ACIDO RESISTENCIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	+
ESPORAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
MOVILIDAD	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	D	D	-	-	-
CRECIMIENTO AEROBIO	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
CRECIMIENTO ANAEROBIO	-	+	W	W	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	-	-	-	X
CATALASA	+	+	W	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
OXIASA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	d	-	-	-	-
GLUCOSA (PROD.ACIDO)	D	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	D	D	+	+	+	+
O <sub>2</sub>	0 <sub>L</sub>	F	F	F	F	F	F <sub>L</sub>	-	-	F	F	F	F	F	F	-	F <sub>r</sub>	F <sub>h</sub>	O	O	O	QNT



PRIMERA ETAPA PARA IDENTIFICAR BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
FORMA	R	S	S	S	S/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MOVILIDAD	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	D	-	-	+	-
CRECIMIENTO AEROBIO	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
CRECIMIENTO ANAEROBIO	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CATALASA	d	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	-	D	-
OXIDASA	-	X	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
GLUCOSA (PROL ACIDO)	D	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	D	-	-	+
CARBOHIDRATOS $F_{60}$	FL	-	0	-	0	-	0	-	0	0	F	F	F	F	NT	-	-	F

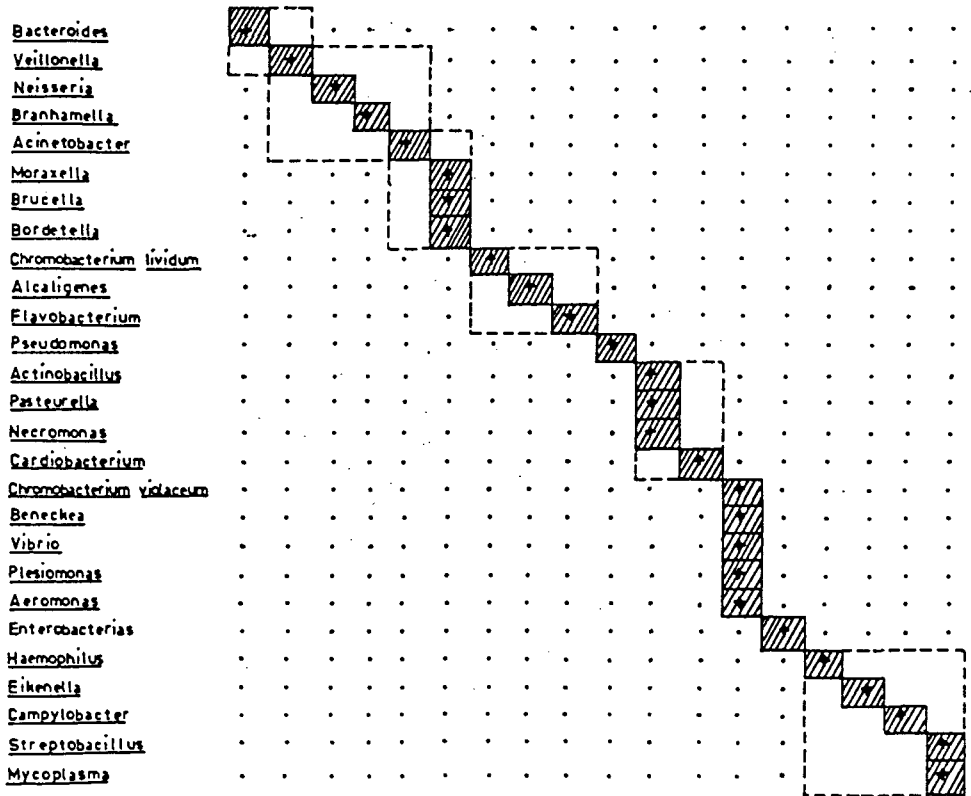


TABLA # 1: DETERMINACION DE GENEROS GRAM POSITIVOS

ESPECIE	ESPORAS	MOVILIDAD	CATALASA	OXIDASA	GLUCOSA (ácido)	O-F (glucosa)	AEROBICO	ANAEROBICO
<b>COCOS</b>								
Streptococcus	-	-	-	-	+	NR	+	+
Micrococcus	-	-	+	-	(+)	O/-	+	-
Staphylococcus	-	-	+	-	+	-/F	+	+
<b>BACILOS</b>								
Corynebacterium	-	-	(+)	-	(+)	NR	+	+
Listeria	-	+	+	-	+	NR	+	+
Erysipelotrix	-	-	-	-	+	NR	+	+
Bacillus	+	(+)	+	(+)	(+)	NR	+	V
Lactobacillus	-	-	-	-	+	NR	+	+
Kurthia	-	+	+	-	-	NR	+	-
Nocardia	-	-	+	-	+	O/-	+	-

+ = POSITIVA REACCION; (+) LA MAYORIA POSITIVAS CON ALGUNAS EXCEPCIONES; - = NEGATIVO; NR = NO REQUERIDO; O = GLUCOSA OXIDADA; F = GLUCOSA FERMENTADA

TABLA # 2. DIFERENTES CARACTERISTICAS DE Staphylococcus Y Micrococcus

Genero y Especie	Coagulasa	Hemolisis	Pigmento	Catalasa	Maltosa	PAB	Manitol	Dnasa	Noboviocina	Glucosa	Oxidasa
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+/-	+/-	+	+	+	-	-	S	+	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	+/-	+	+	NA	+/-	-	R	-	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	+	+	-	+	+/-	+	+/-	+/-	S	+	-
<i>Saphylococcus hycus subsp hycus</i>	+/-	-	-	+	-	-	-	+	S	+	-
<i>Micrococcus sp</i>	-	-	+/-	+	-	NA	-	-	S	-	+/-

TABLA # 2a DIFERENTES CARACTERISTICAS DE ALGUNOS Streptococcus

Genero y Especie	Grupo	Hemolisis	Trehalosa	Sorbitol	Manitol	Salicin	Lactosa	Raffinos	Inulina	Esculina	Sol Hipur
<i>Strptococcus pyogenes</i>	A		+	-	+/-	+	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus zooepidermicus</i>	C		-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus equisimilis</i>	C		+	-	-	+	+/-	-	-	-	-
<i>Streptococcus equi</i>	C		-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B		+	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	C		+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>			+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	D		+	+	+	+	+	-	-	+	+/-
<i>Streptococcus bovis</i>	D		+/-	-	+/-	+	+	+	+	+	-

TABLA # 3. DIFERENTES CARACTERISTICAS DE ALGUNAS ESPECIES DE Bacillus

Especies	Movilidad	Ureasa	Citrato	Hidrólisis almidon	Gelatinasa	Producción de ácido			VP	Crecimiento 65 C
						Glucosa	Arabinosa	Manitol		
B.anthraxis	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
B.subtilis	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
B.cereus	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
B.megaterium	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
B.stearothermophilus	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
B.licheniformes	+	V	+	+	+	+	+	+	+	-
B.lentus	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
B.firmus	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B.coagulans	+	-	-	+	-	+	V	V	V	-
B.pumilus	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-

V = variable; + = positivo; - = negativo

TABLA # 4. DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DE *Corynebacterium*

ESPECIES	Catalasa	Hemolisis	Ureasa	Gelatina licuefacción	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sucrosa	Trehalosa	Arginina dihidrolasa
<i>C. pyogenes</i> **	-	+	-	+	+	+	+	V	V	-
<i>C. renale</i>	+	V	+	-	+	V	V	-	-	+
<i>C. equi</i>	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	V	V	V	+	V	+	V	-	+
<i>C. suis</i> *	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-
<i>C. bovis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>C. kutsheri</i>	+	-	V	-	+	-	+	+	+	-
<i>C. ulcerans</i>	+	V	+	-	+	-	+	V	+	-
<i>C. haemolyticum</i>	+	+	-	+	+	+	+	V	V	-
<i>C. xerosis</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>C. hofmannii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i>	+	V	-	-	+	-	+	-	-	-

TABLA # 5. DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DE *Actynobacillus*

Especies	Hemolisis	Indol	Ureasa	Ac.sulfidrico	Catalasa	Trehalos	Arabinosa	Sorbitol	Manitol
<i>A. lignieresii</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>A. equuli</i>	-	-	+	V	-	+	-	-	+
<i>A. suis</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>A. capsulatus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>A. seminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Actualmente *Actynomices pyogenes*

\*\* Actualmente *Eubacterium suis* (anaerobico)

TABLA # 6. GENEROS GRAM NEGATIVOS

GENERO	O - F	MacConkey's	OXIDASA	CATALASA	MOVILIDAD	
BACILOS						
Enterobacteriaceae	F	+	-	+	(+)	
Yersinia	F	+	-	+	-	Y.pestis
	F	+	-	+	+	Y.pseudotuberculosis,Y.enterocolitica
Pseudomonas	O	+	+	+	+	Ps.aeruginosa
	O	+	+	(V)	+	Ps.pseudomallei
	O	+	-	+	-	Ps.mallei
Aeromonas	F	+	+	+	+	A.hydrophila
	F	+	+	+	-	A.salmonicida
Chromobacterium	F	-	-	+	+	pigmento violeta
Flavobacterium	O	-	+	+	-	pigmento amarillo
Pasteurella	F	-	+	+	-	P.multocida,P.pneumotropica
	F	+	+	+	-	P.haemolytica
	-	-	+	+	-	P.anatipestifer
Actinobacillus	F	+	+	+	-	
Bordetella	-	+	+	+	+	B.bronchiseptica
Alcaligenes	-	+	+	+	+	A.faecalis
Brucella	-	-	+	+	-	
Moraxella	-	-	+	+	-	
Haemophilus	NT	-	+	-	-	requiere factor V y/o X
COCOS						
Acinetobacter	O	+	-	+	-	
Neisseria	O	-	+	+	-	usualmente no patógeno en animales

TABLA # 7 DIFERENTES CARACTERISTICAS DE ALGUNAS BACTERIAS NO FERMENTADORAS

GENERO	Hemolisis	Movilidad 37 C	Glucosa oxidación	Oxidasa	Reducción nitratos	Gelatinasa	Ureasa	MacConkey's	SS agar	Citrato	Indol	Ac.sulfúrico
<i>A.lwoffii</i>	-*	-	-	-	-	-	-*	+	-*	V	-	-
<i>A.calcoaceticus</i>	-*	-	+	+	-	V	-*	+	-*	+	-	-
<i>Al.faecalis</i>	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>B.bronchiseptica</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>M.bovis</i>	+	-	-	+	-*	+	-	-	-	-	-	+
<i>M.lacunata</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M.nonliquefaciens</i>	-	-	-	+	+	-	-	V	-	-	-	-
<i>M.phenylpyruvica</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>M.osloensis</i>	-	-	-	+	-*	-	-*	V	-	-	-	+
<i>M.urethralis</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-

TABLA # 8 .DIFERENTES CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE Pasteurella

	MacConkeys	Indol	Ureasa	Fermentación			
				Glucosa	Lactosa	Sucrosa	Manitol
<i>P.multocida</i>	-*	+	-	A	-	A	A
<i>P.haemolytica</i>	+	-	-*	A	A	A	A
<i>P.pneumotropica</i>	-*	+	+	A	A	A	-
<i>P.gallinarum</i>	-	-	-	A	-	A	-
<i>P.anatipestifer</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.ureae</i>	-	-	+	A	-	A	A
<i>P.aerogenes</i>	+	-	+	A/G	-	A/G	-



TABLA # 9. DIFERENCIACION DE ESPECIES DE Haemophilus

ESPECIES	X	V	Indol	Ureasa	Omitina*	Arginina*	Hemolisis	CAMP	Gas de reacción glucosa	Acido de glucosa	fructosa	sucrosa	lactosa	manitol	Catalasa
H.parasuis	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	V	-	+
H.pleuroneumoniae	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	V	+	+
H.paragallinarum	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	V	+	-
H.avium	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	V	+	-
H.paracuniculis	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V	V	+
H.aphrophilus	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
H.haemoglobinophilus	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
H.ovis	+	-	-	-	O	O	-	-	O	+	O	-	+	V	V
H.influenzaemurium	+	-	-	-	O	O	-	-	O	+	+	+	-	+	+
H.somnus	-	-	+	-	-	-	V	-	-	+	+	-	-	+	+
H.agni	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
H.equinogenitalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

V = variable; O = no información

TABLA # 10. DIFERENCIACION DE ALGUNAS ESPECIES DE Pseudomonas

ESPECIES	Fluorescencia	Piocianina Sol. Cloroformo	Hidrólisis Gelatina	Oxidasa	Reducción Nitratos	Crecimiento SS	Oxidación Maltosa
Ps.aeruginosa	(+)*	+	+	+	+	+	-
Ps.fluorescens	(+)*	-	+	+	-	+	V
Ps.maltophilia	-	-	+	-	-	-	+
Ps.putida	+	-	-	+	-	+	V
Ps.stutzeri	-	-	-	+	+	(+)	+
Ps.cepacia	-	-	-	-	V	-	+
Ps.acidovorans	-	-	-	+	-	(+)	-
Ps.pseudomallei	-	-	+	+	+	-	+
Ps.mallei	-	-	+	-	+	V	V

\*Puede ser detectado con lampara de Wood

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Academia de Profesores del Laboratorio de Bacteriología Médica. Depto. De Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Cuarta edición. Manual de Bacteriología Médica. Instituto politécnico Nacional. Editorial de la SEP 1983.
- 2.- Alba F.J. Garza G.D. Manual de Micología Médica. Laboratorio de Micología. Depto. De Microbiología. Esc. Nacional de C.B. 1ra. Edición 1982.
- 3.- Avilés R.D. , Cortes G.A. Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Editorial de la SEP. Año 1983.
- 4.- Calderón J.E. conceptos Clínicos de Infectología. Editorial M.C. Editor. Año de 1982. Pág. 11-12.
- 5.- Cáster G.R. Bacteriología y Micología Veterinaria. Aspectos Esenciales. Editorial Manual Moderno. 1991. Pag. 104.
- 6.- Cottral G.E. Manual de Métodos Estandarizados en Microbiología Veterinaria. Ediciones Científicas. La Prensa Médica Mexicana S.A. 1986. Pag. 3-5.
- 7.- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "Plan de Estudios de la F.M.V.Z. de la U. De G. " Editorial F.M.V.Z. Año 1988 Pag. 8-15.
- 8.- Frappe Muciño Rene C, Manual de Infectología Veterinaria, Editor Francisco Mendez Oteo, México DF, 1981.
- 9.- Gibbons W.J. Diagnóstico Clínico de las Enfermedades del Ganado. Editorial Interamericana S.A. Año 1967 Pág. 1- 207.
- 10.- Ministerio de Agricultura Dirección General de la Producción Agraria. Subdirección General de sanidad Animal. Servicios de Defensa contra Epizootias y Zoonosis. Recientes aportaciones Veterinarias sobre Brucelosis 1977 de México.
- 11.- Universidad de Guadalajara "Consejo de Planeación: C.U.C.B.A Modelo Académico General " Editorial Comisión Especial del Consejo de planeación Guad. Jal. 14 de junio de 1994.

12.- Universidad de Guadalajara "Red Universitaria en Jalisco de la U.de.G.  
(Proyecto inicial. Guadalajara. Jal. 30 de Octubre de 1992). Pag. 1-5.