



**FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

---

# **MICROBIOLOGIA ORAL**

**PASOS PRACTICOS**

**CUARTO SEMESTRE**

**PRIMAVERA 2010**

**Prof. Responsable del Curso:  
Coordinador de Pasos Prácticos:**

**Prof. Prof. Leyla Gómez Carranza  
Prof. Nora Silva Steffens**

## TRABAJO PRACTICO N° 1

### ECOLOGÍA BUCAL I

#### I. Introducción

Comprender la salud bucal y las enfermedades que pueden afectar la boca requiere estudiar los diferentes factores involucrados no enfocándose sólo en la importancia de cada factor individual, sino desde la perspectiva de la complejidad de sus interacciones. (Ecology of oral health: a complexity perspective. Eriksen HM y Dimitrov V. 2003. *European Journal Of Oral Sciences*.111(4):285).

Es posible abordar este estudio desde el punto de vista de la Ecología, ciencia que estudia la dinámica de las interacciones de los organismos entre sí y con el medio que habitan, su abundancia relativa, su distribución, el uso de los recursos disponibles y las modificaciones que imponen en su ambiente. Desde el punto de vista de la Ecología interesa conocer la abundancia relativa y la distribución de cada especie, cuantas hay y donde viven, el uso de los recursos disponibles (nutrientes y factores ambientales) y las modificaciones que cada especie impone dentro de él.

El ecosistema bucal, ecosistema abierto, puede ser definido como la comunidad organizada de microorganismos que comparten un mismo hábitat, constituyendo una red compleja, dinámica e interrelacionada, en la que participan todos sus constituyentes: bióticos y abióticos. En este ecosistema hay sitios con diferentes características, que constituyen microambientes con diferentes propiedades: mucosas, dientes (zonas supra y subgingival), saliva, lengua, cuerpos extraños. En general, se caracteriza por una temperatura relativamente constante de 37°C; humedad constante, pH neutro, potencial redox variable y suministro nutricional abundante. Cada sitio es colonizado según el nicho ecológico de las especies involucradas, el cual queda definido por todos los aspectos del estilo de vida propio de la especie (su hábitat y su forma de obtener los nutrientes). Cada especie ocupa un nicho ecológico único pero diferentes especies pueden compartir diferentes aspectos de su nicho con otras. Cualquier factor que afecte la abundancia y distribución de una especie en el ecosistema se conoce como determinante ecológico.

La microbiota bucal es, en muchos aspectos, única y compleja. Se ha establecido que más de 500 especies de bacterias agrupadas en alrededor de 22 géneros, habitan en la boca humana. Un grupo pequeño de ellas, son consideradas patógenos potenciales en base a sus mecanismos de virulencia conocidos.

En el ecosistema bucal, las especies microbianas se encuentran organizadas en comunidades de poblaciones que cohabitan en un sitio y tiempo determinados, y que pueden o no conformar redes tróficas entre sí. Estas poblaciones se suceden en el tiempo según cambia el ecosistema bucal debido a variaciones de las condiciones externas o internas, y se reemplazan unas a otras (sucesiones ecológicas) hasta lograr una comunidad climax, autosustentada y mantenida en el tiempo.

Las comunidades organizadas más conocidas dentro del ecosistema bucal son la microbiota de placa supragingival, en la que predominan bacterias cocáceas facultativas Gram positivo, y la microbiota de placa subgingival, caracterizada por especies de bacilos anaerobios estrictos, Gram negativo. Ambas se estructuran como biopelículas (biofilms) en las que todos los miembros de la comunidad, quedan protegidos de los factores defensivos del hospedero, de antibióticos y de la microbiota competidora, al mismo tiempo que sus características de virulencia quedan potenciadas.

Así, el estudio de la microbiota bucal desde el punto de vista de la Ecología, da información sobre la distribución y la cantidad relativa de cada especie microbiana participante en el proceso infeccioso, como también de posibles asociaciones entre ellas. Permite conocer los factores que sustentan el equilibrio hospedero-microbiota compatible con salud, los factores que pueden perturbar ese equilibrio y como restablecerlo. También permite conocer la presencia, cantidad y distribuciones de especies inusuales, patógenas o no, involucradas en el proceso infeccioso que se estudia.

## II. Objetivos

1. Conocer y evaluar *in vitro* la acción digestiva de la amilasa salival.
2. Conocer y evaluar la propiedad tampón de la saliva.
3. Conocer el pH salival de cada estudiante del grupo e interpretar los valores obtenidos en el contexto de ecología bucal.
4. Evidenciar la presencia de microorganismos sobre superficies dentarias y mucosales de la cavidad bucal.
5. Comprender la descamación celular como un mecanismo de defensa natural de la cavidad bucal.

## III. Actividades

1. A partir del anexo N° 1-A y con las indicaciones del docente, determine la acción digestiva de la amilasa salival, sobre almidón.
2. A partir del anexo N°1-B y con las indicaciones del docente, determine la propiedad tampón de la saliva.
3. Corte un trozo de papel indicador de pH y humedézcalo con saliva, compare con el patrón de color y determine el valor del pH.
4. Con un raspador metálico estéril y cuidadosamente, tome una muestra de placa bacteriana supragingival de las caras vestibulares de los molares superiores y extiéndala sobre un portaobjetos. Tíñalo con Gram y observe al microscopio.
5. Con un raspador metálico estéril y cuidadosamente, tome una muestra de mucosa de la cara interna de la mejilla, extienda sobre un portaobjetos, tiña con Gram. Observe al microscopio.
6. Siguiendo las instrucciones del docente recolecte saliva estimulada en un tubo estéril, diluya la muestra 1/10 en buffer fosfato estéril, siembre 100 microlitros de la dilución en agar TYCSB, rotule e incube las placas a 37° C en jarra de anaerobiosis,
7. Discuta los resultados obtenidos en cada una de las actividades realizadas en el paso práctico y comparta sus conclusiones.

## ANEXO N° 1

### A. Digestión del almidón por la amilasa salival

El almidón y el glicógeno son polisacáridos que están enrollados sobre sí mismos formando hélices, dentro de las cuales hay espacio suficiente para incluir yodo, los almidones que contienen entre 12 y 18, residuos dan color café con el yodo y los que tienen menos de 12 residuos no dan color con el yodo.

La amilasa salival es capaz de hidrolizar los enlaces a 1-4 de la molécula de almidón, dando como productos disacáridos y algunos polisacáridos de menor tamaño que la molécula original.

Si preparamos una solución con almidón y enzima amilasa, la dejamos actuar por un tiempo determinado y finalmente agregamos gotas de yodo diluido, veremos una coloración amarilla, lo cual indica ruptura de las moléculas de almidón.

#### Reactivos:

- ✓ Almidón 1%
- ✓ Buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 6.9
- ✓ Na Cl 0.025 M.
- ✓ Amilasa salival: enjuagarse la boca con agua de la llave. Luego mantener en la cavidad bucal unos 40ml de agua destilada tibia durante dos minutos y vaciar en un vaso de precipitado. Filtrar esta solución que contiene la amilasa salival y mantenerla en hielo hasta el momento de usar.
- ✓ Solución de Lugol diluida 1:3

**Nota:** La amilasa salival requiere un pH óptimo de 6.9. y la presencia de iones Cl para su máxima actividad.

#### Procedimiento:

1. Preparar dos tubos, A y B, cada uno con los siguientes reactivos, de acuerdo a la tabla.

Reactivos (ml)	TUBO A (control)	TUBO B (muestra)
Buffer Fosfato de Sodio 0.1M pH 6.9	0,4 ml	0,4 ml
Na Cl 0,025 M	0,4 ml	0,4 ml
Almidón 1%	1 ml	1 ml
Saliva diluida (amilasa salival)	-----	2,2 ml
Agua destilada	2,2 ml	-----
Volumen total	4,0 ml	<b>4 ml</b>

2. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Detener la reacción agregando 2 gotas de solución de Lugol diluida 1:3 .-

### **B. Estudio de la Propiedad Tampón de la Saliva**

**Introducción:** Se dice que en la saliva un alto poder de neutralización se asocia con un alto porcentaje de constituyentes inorgánicos. Se ha encontrado que en condiciones fisiológicas los niveles de fosfato y bicarbonato constituyen los principales buffers.

#### **Reactivos:**

- ✓ HCl 0,01 N
- ✓ Rojo metilo
- ✓ Saliva (1 ml)
- ✓ Agua de la llave (1 ml)

#### **Procedimiento:**

Titular un determinado volumen de saliva (1ml) al que se le agregan 3 gotas de rojo de metilo (vira de amarillo pH 6.3 a rojo pH 4.2) con HCl 0,01 N gota a gota hasta que el indicador vire de amarillo a rojo intenso. Anotar los ml de ácido ocupados.

Repetir la misma operación con 1 ml de agua de la llave. Comparar ambos resultados.

### **C.- Agar TYCSB:**

Es un medio selectivo para aislar Estreptococos bucales como *S.mutans* y *S.sobrinus*. En su fórmula encontramos Bacitracina, que es un antibiótico que inhibe el desarrollo de otras especies de Estreptococos, además éste medio tiene sacarosa al 5% que permite el desarrollo de Estreptococos bucales, y también se demuestra su poder de adherencia al medio de cultivo debido a que estos producen polisacáridos de alto peso molecular (glucanos y levanos), a partir de la sacarosa.

Formula:

- |                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| - Bactocasitone    | - Extracto de levadura |
| - L. Cistina       | - Sulfito de Sodio     |
| - Cloruro de Sodio | - Fosfato disódico     |
| - Sacarosa         | - Bacitracina          |
| - Agar             |                        |

## Trabajo Práctico N°2

### Caries Dentaria

#### I. Introducción

La Caries dentaria es una enfermedad infecciosa, multifactorial y transmisible que afecta a los tejidos duros del diente, específicamente el esmalte, la dentina y el cemento dentarios. Esta enfermedad comienza con una descalcificación del esmalte e invasión bacteriana de estos tejidos, una posterior destrucción de los tejidos calcificados, con pérdida de tejido o cavitación que no es recuperable. Al profundizarse el proceso de Caries, se comprometen los tejidos que aportan nutrición, defensa y sensibilidad a las piezas dentarias como el órgano pulpar, el que reacciona ante la agresión bacteriana inflamándose, esto provoca un intenso dolor en el diente afectado y si la infección del tejido pulpar continúa esta se necrosa, es decir, se muere, lo que trae aparejadas un sinnúmero de patologías derivadas del proceso de Caries.

Se ha reportado que esta enfermedad se asocia con cuatro especies bacterianas patógenas, las cuales en grado de asociación serían: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, especies del género *Lactobacilli* y *Actynomices viscosus*. Las dos primeras son las más importantes, no solo porque se encuentran presentes en todos los tipos de Caries como ser, las Caries de superficies lisas, las caries de puntos y fisuras del esmalte y las Caries de la raíz y del cuello del diente, sino también por sus características patogénicas, muy agresivos para los tejidos del diente: tienen un gran poder de adherencia a los tejidos dentario y una gran capacidad fermentativa de los hidratos de carbono, principalmente sacarosa, debido a lo cual, generan ácidos, que descalcifican las piezas dentarias. Por otra parte, estos microorganismos pueden vivir y multiplicarse en el ambiente ácido creado por ellos mismos (acidúricos).

*Streptococcus mutans* es la especie principal asociada con la caries dental, dada su mayor prevalencia en sitios activos, sus mecanismos de virulencia y su asociación con el inicio del proceso carioso. *Streptococcus mutans* es una especie de bacterias cocáceas, Gram positivo, agrupadas en cadenas, que crece en medios de cultivo con alta concentración de sacarosa. Uno de estos medios denominado TYCSB (Trypticase, yeast o extracto de levadura, casitona, sacarosa, y bacitracina) contiene sacarosa al 5% y bacitracina, constituyentes que le dan el carácter selectivo al medio: la sacarosa es el hidrato de carbono que aporta nutrición al microorganismo. Además es el sustrato de la enzima Glucosil transferasa (GTF) que cataliza la formación de dextranos, polímeros extracelulares que permiten la adherencia de este microorganismo a las superficies del diente. La bacitracina selecciona la especie *Streptococcus mutans* entre otros *Streptococcus* bucales.

Las colonias de *Streptococcus mutans* en el medio selectivo se pueden observar a ojo desnudo o bajo lupa. Se presentan de diversas formas: lisas, rugosas, grandes o pequeñas, pero lo más característico es su aspecto de vidrio esmerilado y al tocarlas con el asa de platino no se disgregan o se encuentran adheridas al agar.

Para aislar, identificar y cuantificar *Streptococcus mutans* se usan muestras de placa supragingival y de saliva estimulada, pero la más utilizada que entrega mejores resultados es la de saliva estimulada.

## II. Objetivos

1. Conocer las características coloniales del *S mutans*.
2. Conocer y analizar los principales mecanismos de virulencia de este microorganismo patógeno.
3. Observar el avance y el daño de los microorganismos cariogénicos sobre los tejidos del diente.

## III. Actividades

1.- Prueba de Ecología

2.- Bajo la supervisión del docente, a partir de cultivos bacterianos en medio de cultivo TYCSB, observe el aspecto de las colonias bacterianas compatibles con *S mutans*.

3.-Con el asa de platino arrastre y disgregue una colonia de *S. mutans*, compare la adherencia con otras colonias crecidas en el agar TYCSB.

4.-Con ayuda del asa de platino cuente las colonias compatibles con *S.mutans* y determine el riesgo de caries del paciente en estudio.

5.- Observe la acción enzimática de *S. mutans* sobre diferentes medios de cultivo hidrogenocarbonatos y sobre medios de cultivo con otros edulcorantes.

6.-Observe al microscopio cortes de diente con caries, con ayuda del docente efectúe un análisis de lo observado.

## Trabajo Práctico N°3

### Enfermedad Periodontal

#### I. Introducción

##### Enfermedad Periodontal

Es una familia de enfermedades que se caracterizan por la destrucción de los tejidos de soporte del diente como resultado de la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero a la agresión microbiana. Se considera como una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial que se inicia por la acción patogénica de un complejo de especies bacterianas organizadas en un biofilm (placa subgingival), las que interactúan con los tejidos del hospedero desencadenando su respuesta inmunoinflamatoria.

Muchos patógenos fueron descubiertos durante el siglo XIX y el conocimiento que se tiene actualmente de ellos ha permitido salvar a muchos pacientes. Ciertos criterios conocidos como los postulados de Koch se establecieron para asociar patógenos de importancia médica con una determinada enfermedad. Del mismo modo, en el caso de la enfermedad periodontal, se han propuesto los postulados de Koch modificados por Socransky (1979) para asociar periodontopatógenos con el inicio y/o progreso de la enfermedad periodontal. Así podemos enunciar que:

- a. El periodontopatógeno en estudio debe asociarse con la enfermedad y su eliminación del foco infeccioso debería dar como resultado la detención de la progresión de la enfermedad (criterio de asociación).
- b. El periodontopatógeno debe inducir una respuesta inmune detectable en el hospedero.
- c. El periodontopatógeno debe producir la enfermedad al ser inoculado en animales de experimentación.
- d. El periodontopatógeno debe presentar una capacidad patogénica demostrable.

Basados en los criterios propuestos, varios periodontopatógenos se han asociado con la etiología de esta enfermedad. Actualmente se han reportado más de 600 especies bacterianas, capaces de colonizar el área subgingival. La estrategia inicial para la identificación de bacterias periodontopatógenas, fue comparar la composición microbiana de muestras del biofilm subgingival, de individuos sanos, con gingivitis y con periodontitis, pudiéndose identificar algunos periodontopatógenos, tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad, esta microbiota presenta características muy particulares que les permiten colonizar el área subgingival. Se trata de una microbiota formada principalmente por bacilos Gram negativo, inmóviles (a excepción de *T.denticola*), proteolíticos y anaerobios obligados o aerotolerantes.

En 1998, Socransky y colaboradores establecieron la asociación de determinados complejos bacterianos con la etiología de la enfermedad periodontal. Así el complejo rojo, formado por: *P.gingivalis*, *T.forsythia* y *T.denticola*, es el más significativo en la progresión de la Enfermedad periodontal, ya que sus miembros aumentan en número y prevalencia en asociación directa con el aumento de los parámetros clínicos de la enfermedad. *P.gingivalis* y *T.denticola* presentan una serie de factores de virulencia que los hacen los primeros candidatos involucrados en la destrucción del tejido periodontal. Luego, el complejo naranja formado por *P.intermedia*, *P.nigrescens*, *P.micros*, *F.nucleatum*, *Campylobacter spp*, *E.nodatum* y *S. constellatus*, presenta una asociación menos fuerte, posiblemente determinada por mecanismos de patogenicidad menos agresivos. *Aggregatibacter*

*actinomycetemcomitans* serotipo b, no se encontró formando parte de ningún complejo, aún cuando es un patógeno asociado fuertemente a las formas agresivas de la enfermedad.

La mayoría de las bacterias periodontopatógenicas se pueden aislar mediante cultivo, a partir de muestras de sacos periodontales. Se requieren medios enriquecidos con sangre, hemina y menadiona. En general se trata de microorganismos proteolíticos, por lo que es esencial el aporte de nutrientes necesarios para su desarrollo. Miembros del complejo rojo y naranja, anaerobios obligados, deben ser cultivados en jarras con generador de anaerobiosis, a una temperatura entre 35 a 36°C por un periodo que va desde 7 a 14 días. Para el cultivo y aislamiento de *A. actinomycetemcomitans* se emplea un medio selectivo al que se le adiciona suero de caballo y antibióticos (Bacitracina y Vancomicina). Las diferentes especies bacterianas presentan características macromorfológicas (coloniales), que permiten orientar el diagnóstico microbiológico y es posible realizar pruebas rápidas que permitan identificar las especies de mayor relevancia en patología periodontal.

## II. Objetivos

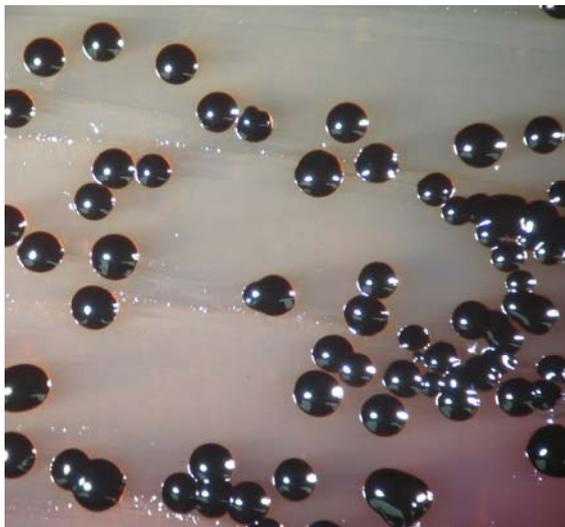
1. Conocer características macromorfológicas y fisiológicas de colonias de patógenos periodontales.
2. Estimar la relación porcentual de patógenos periodontales en la microbiota total de un sitio enfermo respecto de un sitio sano.

## III. Actividades

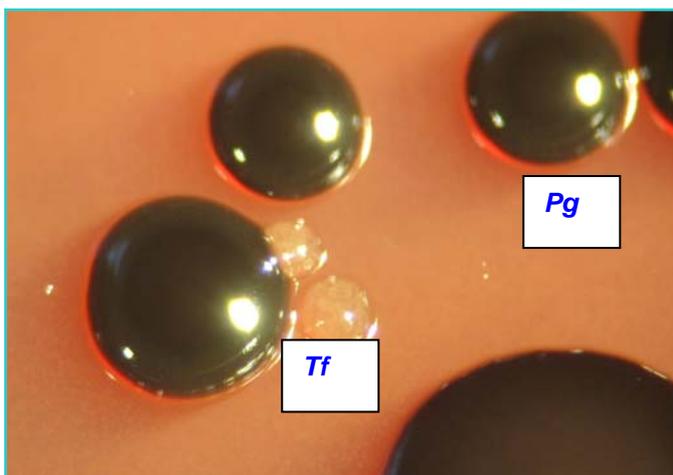
1. Observar a ojo desnudo y bajo lupa, placas de Petri con desarrollo colonial de patógenos periodontales. Con supervisión del docente identifique colonias características de patógenos periodontales determinados.
2. Observe y estime a ojo desnudo la cantidad relativa de colonias de patógenos periodontales provenientes de sitios sanos y de saco periodontal.
3. Observe al microscopio frotis con tinción de Gram de placa subgingival provenientes de pacientes con enfermedad periodontal y de pacientes sanos.

ASPECTO MACROMORFOLÓGICO DE COLONIAS DE ALGUNOS PATOGENOS PERIODONTALES

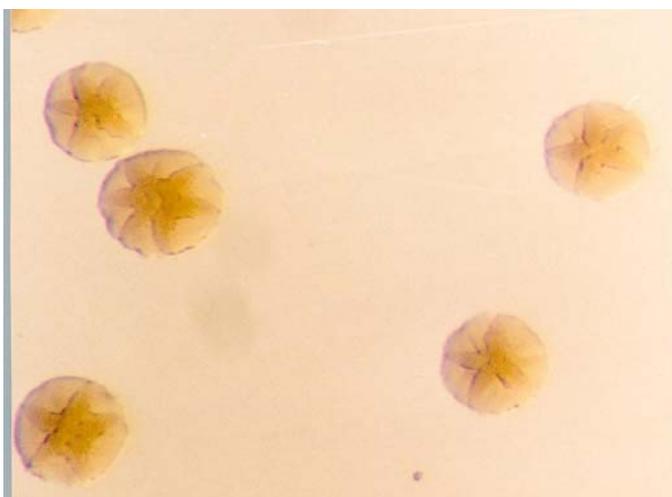
(Fotografías obtenidas con lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000C. Laboratorio de Microbiología Bucal. Fac. de Odontología, U. de Chile).



Colonias de *Porphyromona gingivalis* en agar sangre hemina -menadiona



Colonias de *P.gingivalis* y *T.forsythia* en agar sangre hemina-menadiona



Colonias de *A.actinomycetemcomitans* en medio selectivo TSBV

## Trabajo Práctico N°4

### Microorganismos Piógenos I

#### I. Introducción

##### ***Staphylococcus***

El Género *Staphylococcus* está formado por cocáceas Gram positivo, agrupadas en racimos, anaerobias facultativas, inmóviles y no esporuladas. Producen catalasa, pueden crecer en medios no enriquecidos y toleran altas concentraciones de sal. Este Género está formado por 32 especies, entre las cuales, las de importancia médica son:

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus saprophyticus*

*Staphylococcus aureus* se encuentra en procesos infecciosos de diferentes tipos en los que se comporta como especie patógena o formando parte de la microbiota de individuos que lo portan. Es la especie más patógena del género y presenta diversos mecanismos de virulencia para ejercer daño en los tejidos del hospedero, las que se pueden en: estructurales y no estructurales, los mecanismos de virulencia estructurales son aquellos que forman parte de la estructura bacteriana. No estructurales se refieren a enzimas y toxinas producidas por esta bacteria. Entre ellas producidas está la coagulasa, enzima que permite diferenciar *Staphylococcus* patógenos de no patógenos.

*Staphylococcus epidermidis* forma parte de la microbiota normal de piel y mucosas del organismo humano, presenta escasa virulencia y es capaz de adherirse a cuerpos extraños utilizados en un individuo como parte de tratamientos médicos (catéteres)

*Staphylococcus aureus* debe su nombre a la capacidad de generar colonias de color amarillo de diversa intensidad, debido a la producción de pigmentos carotenóideos. En cambio, las colonias de *Staphylococcus epidermidis* son de color blanco, de allí que este último también recibe el nombre de *Staphylococcus albus*.

Algunos grupos de personas son más propensos a ser colonizados por *Staphylococcus aureus*, como el personal de la salud, en los que se ha observado hasta un 50% de portación nasal.

La mayoría de las infecciones asociadas a *S.aureus* son cutáneas o subcutáneas como por ejemplo: forúnculos, impétigo o infección de herida operatoria. Esta especie puede diseminarse por vía hematógena a muchos órganos como huesos (osteomielitis), pulmones, corazón y cerebro.

Además es capaz de generar cuadros clínicos asociados a sus toxinas. Síndrome de shock tóxico, Síndrome de piel escaldada e intoxicación alimentaria.

##### Diagnóstico microbiológico:

El diagnóstico microbiológico de *S.aureus*, al igual que el de la mayoría de las bacterias, incluye:

1.-Gram directo de la muestra para buscar cocáceas Gram positivo.

2.-Siembra y cultivo: Son poco exigentes, crecen en la mayoría de los medios de cultivo.

En agar sangre (no selectivo) se puede ver colonias de color dorado (*aureus*) o de color blanco (*albus*) y algunas veces con un halo de hemólisis.

Agar manitol sal, otro medio utilizado, selectivo, permite sólo el crecimiento de *Staphylococcus* gracias a la alta concentración de Cloruro de Sodio (7,5%). Además contiene manitol (hidrato de carbono), rojo fenol como indicador de pH.

*S aureus* utiliza el manitol acidificando el medio, que, gracias al indicador, vira de color rojo a amarillo, *S.epidermidis*, en cambio, no utiliza el manitol por lo que el medio de cultivo permanece de color rojo. Los medios se incuban a 35°-37° Celsius en atmósfera aeróbica por 24-48 horas.

3.-Identificación: se basa en las características macroscópicas del cultivo, el Gram de las colonias y pruebas bioquímicas como la catalasa (positiva para los *Staphylococcus*) y la coagulasa (positiva para *S aureus*)

4.-Antibiograma :debe realizarse siempre, debido a la resistencia antimicrobiana de este microorganismo.

### ***Streptococcus***

El género *Streptococcus* está formado por cocáceas Gram positivo agrupados en cadenas o en diplos, anaerobios facultativos nutricionalmente exigentes. Algunos requieren un ambiente capnófilico para crecer y no producen catalasa. Gran número de especies son patógenas para el hombre. Existen hasta ahora 4 formas diferentes para clasificar a estos microorganismos, según los siguientes criterios:

1. Antígeno de pared celular específicos en grupos A ,B, C, F y G (Clasificación de Lancefield).
2. Tipos de hemólisis
  - α: hemólisis parcial
  - β: hemólisis total,
  - γ :ausencia de hemólisis
3. Pruebas Bioquímicas o Fisiológicas
4. RNA ribosomal (clasificación filogenética)

Las especies de importancia médica son:

*Streptococcus pyogenes* de Grupo A

*Streptococcus agalactiae* de Grupo B

*Streptococcus pneumoniae*

Estas tres especies son patógenas para el hombre. En este caso nos referiremos a *Streptococcus pyogenes* de Grupo A.

La virulencia de este microorganismo está determinada por una variedad de moléculas estructurales, toxinas y enzimas.

Las infecciones causadas por *S. pyogenes* pueden ser producidas por mecanismos de invasividad, toxicidad e hipersensibilidad, dependiendo del o los mecanismos de virulencia que estén actuando.

*S. pyogenes* se encuentra en orofaringe de alrededor de un 15%-20% de portadores. La transmisión es a través de gotitas de saliva de un individuo enfermo, o de un portador, a un individuo susceptible.

Diagnóstico Microbiológico:

Muestras: exudado faríngeo, secreción de lesiones de piel, líquidos estériles.

2. Gram directo de la muestra para búsqueda de cocos Gram positivos.

3. Siembra y cultivo: Las muestras se siembran en agar sangre y se incuban en ambiente capnófilico por 24-48 horas.

4.-Identificación: Las colonias son puntiformes, beta hemolíticas, con halo de hemólisis beta, catalasa negativas, prueba de sensibilidad a la bacitracina: *S. pyogenes* es sensible, *S. agalactiae* es resistente a la bacitracina. Al Gram se observan cocáceas en cadenas.

5.-No se realiza antibiograma, *S. pyogenes* es sensible a Penicilina.

## II. Objetivos

1. Determinar la presencia de microorganismos piógenos en muestras de fosas nasales y faringe.
2. Analizar en base a un documento científico aspectos particulares de los microorganismos piógenos

## III. Actividades

1. Prueba de Enfermedad Periodontal
2. Con hisopo estéril tomar muestras de fosas nasales y faringe. Sembrar en:  
Agar manitol –sal (muestra de fosas nasales)  
Agar sangre (muestra de faringe y de fosas nasales)  
Rotular y llevar a estufa a 36 °C
3. Leer, preparar y presentar apartado relacionado con microorganismos piógenos para la próxima sesión

**Paso Práctico N°5**  
**Microorganismos Piógenos II**

**I Objetivos**

1. Identificar colonias de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyógenes*.
2. Analizar la importancia de la portacion de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyógenes*.

**II Actividades**

1. Presentar y discutir los apartados entregados en la sesión anterior
2. Con las indicaciones del docente observe en agar manitol-sal el aspecto macromorfológico y las propiedades fisiológicas de microorganismos del género *Staphylococcus*.
4. Con las indicaciones del docente observe en agar sangre el aspecto macromorfológico y las propiedades fisiológicas que permiten hacer el diagnóstico presuntivo de *Streptococcus pyógenes*.
5. Con los resultados obtenidos discuta en el grupo de paso la importancia de la presencia de estos microorganismos en hospederos sanos.
6. Prueba Microorganismos Piógenos

## Trabajo Práctico Nº 6

### Hongos De Importancia En Infecciones De La Cavidad Bucal

#### I. Introducción

Las levaduras del Género *Candida* son microorganismos unicelulares eucarióticos imperfectos, aerobios que pertenecen al Reino Hongo. Poseen forma ovalada, se tiñen con el Gram de color violeta y forman parte de la microbiota normal de las mucosas (cavidad bucal, del intestino, la vagina y la zona perianal de algunos individuos).

Estos microorganismos se reproducen por medio de yemas; pueden aparecer bajo ciertas condiciones microambientales, como levaduras en su forma unicelular o bien, como pseudomicelio en su forma pluricelular. Sus extremos se pueden elongar en largos filamentos llamados pseudohifas; estos filamentos se originan por un simple proceso de yemación o brotación, sin unicelular separación de las células, quedando unidas por los polos. No está claro si está presente en boca como miembro de la microbiota normal, o se presenta como consecuencia de una invasión secundaria debida a la influencia de factores de tipo nutricional, traumáticos, fisiológicos o endocrinos, antibioticoterapias u otros. Sin embargo, hoy existe información de que un alto porcentaje de la población adulta está colonizada por alguna especie de *Candida*. Aproximadamente el 60% de los adultos sanos y el 45% a 50% de los niños sanos albergan alguna especie de *Candida* como microorganismo comensal, sin presentar ningún signo o síntoma de enfermedad en las mucosas. Por lo tanto, la sola presencia de levaduras no implica enfermedad, ya que esta ocurre como resultado de la interacción de diversos factores, tales como los mecanismos defensivos del hospedero, la capacidad patogénica del microorganismo y otros factores predisponentes, todos los cuales, normalmente se encuentran en equilibrio.

La Candidiasis oral es una de las presentaciones clínicas de mayor prevalencia entre las infecciones causadas por hongos unicelulares, sobre todo en pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La susceptibilidad de las levaduras a los antifúngicos es variable, por lo cual es relevante realizar un adecuado diagnóstico en el laboratorio de Microbiología, con el fin de instaurar una terapia adecuada a la especie o especies aisladas.

#### Diagnóstico Microbiológico de Levaduras del género *Candida*

**A. Cultivo:** Actualmente, se dispone de medios de cultivo comerciales deshidratados, o ya preparados, dispensados en placas o tubos.

El medio empleado rutinariamente en el laboratorio para la siembra y aislamiento de hongos es el agar Sabouraud, este es un medio selectivo con un pH entre 5,5 y 6,0. Además se puede adicionar antibióticos, para aumentar la selectividad del medio, se utiliza cloramfenicol (0,05 mg/ml).

En este medio de cultivo, podemos observar colonias similares a las bacterianas a las 24 a 48 hrs de cultivo a 37°C.

La introducción de un nuevo medio para el análisis de *Candida* ha sido de gran utilidad. Este medio el CHROMagar, es un medio de cultivo sólido que contiene sustratos cromogénicos, permite diferenciar distintas especies dentro del género, basándose en el color que adquiere la colonia. El color de la colonia de *Candida albicans* es verde color verde, que la diferencia claramente de las colonias de otras especies las cuales adquieren color violeta a blanco, pasando por distintos tonos según la especie.

## **B. Pruebas diferenciales:**

### **Tubo germinativo:**

Este se observa, al cultivar la especie a identificar en plasma humano a 37°C, en el cual se puede observar aproximadamente a las 2 hrs la producción de un apéndice elongado que crece hacia afuera de la blastospora y que tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble de largo de la célula de la levadura.

Esta es una característica que se observa tanto en *Candida albicans* como en *Candida dubliniensis*, dada la estrecha relación fenotípica y genotípica que existe entre ambas. Esto ha llevado a identificar incorrectamente la mayoría de los aislados de *Candida dubliniensis* como *Candida albicans* dificultando un análisis exhaustivo de esta especie. Ambas especies además son capaces de formar tubo germinativo y clamidosporas, debido a lo cual, hoy en día no es suficiente hacer estas pruebas para identificar *Candida albicans*, siendo necesario realizar nuevas técnicas diagnósticas

### **Microcultivo:**

Al interior de una placa de Petri se coloca un pedazo de papel filtro y dos varillas de vidrio como soporte, cortadas de un tamaño adecuado en forma de U. Se coloca un portaobjeto sobre las varillas y se esteriliza todo en Horno a 180°C durante 1 hr.

En ambiente estéril, se deposita sobre cada portaobjeto 2ml de agar maíz y se deja enfriar para permitir solidificar.

De una colonia de levadura crecida en agar Sabouraud, se siembra en líneas paralelas sobre la superficie del agar Maíz. La siembra se cubre con un cubreobjeto estéril y se agrega agua destilada estéril al fondo de la placa, mojando totalmente el papel filtro; la placa de petri se tapa (cámara húmeda); y se incuba a 25°C por 48 horas. Transcurrido este tiempo, se observa el portaobjeto con la siembra en el microscopio de transmisión a 10X y 40X, verificando la presencia de Clamidosporas terminales o subterminales, blastosporas y pseudohifas. Si se observaban Clamidosporas se considera la prueba es positiva para la identificación parcial de *Candida albicans*.

### **Auxonograma:**

Se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo. En este caso se utiliza medio de cultivo C (Sulfato amónico, Fosfato monopotásico, Sulfato de magnesio y Agar). como medio base y glusidiscos (discos de papel filtro embebidos en diferentes azúcares) para identificar las diferentes especies de levaduras de acuerdo al nutriente utilizado.

La turbidez alrededor de los discos, indica que la levadura asimila el azúcar correspondiente; por el contrario, si no se observa desarrollo de ésta alrededor de los glusidiscos, significa que no lo asimila.

Cada especie de levadura tiene un patrón de asimilación lo que permite su identificación.

### III Objetivos

1. Conocer el aspecto macro morfológico de colonias de levaduras del género *Candida*, cultivadas en agar Sabouraud y CHROMagar.
2. Observar el aspecto micro morfológico de las colonias de levaduras del género *Candida* y comparar con el aspecto de las colonias bacterianas.
3. Analizar y comprender la importancia de la presencia del tubo germinativo
4. Analizar y comprender el valor diagnóstico de un microcultivo y de la prueba del auxonograma

### IV Actividades

- 1.- A partir de un cultivo en agar Sabouraud y CHROMagar , observe el aspecto de las colonias de distintas especies de levaduras. Discuta lo observado con el Docente.
- 2.- Observe un frotis y tinción de Gram realizados a partir de colonias de levaduras del genero *Candida* y realice un análisis comparativo con células bacterianas.
- 3.- Observe una preparación al fresco realizada a partir de un cultivo de levaduras en plasma humano al 10%. Analice y discuta lo observado.
- 4.-Observe y analice los resultados obtenidos a partir de un microcultivo y auxonograma. Discuta con el docente el valor diagnóstico de estas pruebas de laboratorio.

## **Paso Práctico N°7**

### **Bioseguridad**

#### **I. Introducción**

El perfil de los pacientes que se atienden en los hospitales, centros médicos y centros de atención de salud, ha cambiado enormemente los últimos años, producto de la aparición de nuevas enfermedades e incorporación de nueva tecnología de diagnóstico o tratamiento. Entre los cambios más relevantes debe mencionarse la epidemia de VIH/SIDA y el creciente número de pacientes en tratamiento con drogas inmunosupresoras, entre otros. Las nuevas enfermedades producen nuevos problemas y desafíos.

La gran mayoría de los pacientes que ingresan a los hospitales y serán sometidos a algún tipo de procedimiento invasivo de distinta índole, desde una punción intravenosa simple a una intervención quirúrgica mayor con implantes permanentes. La esterilización o desinfección de los artículos de uso clínico constituyen mecanismos eficientes, actualmente indiscutibles, para prevenir infecciones asociadas a la atención en salud.

La Microbiología médica se preocupa tanto del estudio de la etiopatogenia y de la quimioterapia de las enfermedades infecciosas como de investigar la forma de prevenirlas. Un aspecto importante del control de las infecciones reside en la comprensión de los principios básicos de la esterilización, la desinfección y la antisepsia.

#### **1. Esterilización**

La esterilización es el resultado de un proceso y no sólo la exposición al agente esterilizante. Para conseguir material estéril se deben realizar una serie de procedimientos independientes como son: lavado/descontaminación, inspección, preparación/empaque, exposición al método de esterilización, almacenamiento y entrega.

Cada uno de estos procedimientos tiene importancia en el resultado y si existen fallas en cualquiera de ellos, el material no puede considerarse estéril aún cuando haya sido sometido a un método de esterilización.

Los procedimientos destinados a lograr material estéril en los hospitales o centros de salud pueden realizarse en forma centralizada o descentralizada. La centralización de la esterilización involucra que todos los procedimientos sean realizados en un mismo lugar físico y bajo una supervisión uniforme. En la actualidad esta es la forma que se considera más eficiente, segura y efectiva para el manejo del material debido a que es la única manera de garantizar uniformidad en todas las etapas del proceso.

#### **2. Etapas del proceso de esterilización:**

##### **A. Limpieza/descontaminación:**

Es la remoción mecánica de toda materia extraña en las superficies de objetos inanimados. En general se consigue con la utilización de agua y detergente. La materia orgánica e inorgánica presente en los artículos interfiere con los métodos de esterilización y desinfección ya sea impidiendo el contacto del agente esterilizante con todas las superficies o, en el caso de procesamiento por calor, prolongando los tiempos de exposición requeridos para lograr el mismo objetivo.

La limpieza disminuye la carga microbiana por arrastre pero no destruye microorganismos. Puede realizarse a través de métodos manuales o automáticos. Siempre debe realizarse una prolija limpieza antes de procesar los artículos.

Se entiende por descontaminación a la remoción de los microorganismos de los objetos o artículos contaminados durante la atención del paciente, por contacto con fluidos corporales o restos orgánicos, con el objeto de dejarlos seguros para su manipulación y prevenir exposiciones accidentales del personal que entra en contacto con ellos. "Todo material que ha estado en contacto con sangre o fluidos corporales debe tratarse como contaminado".

Para esos efectos el personal que manipula instrumental sucio, debe utilizar barreras protectoras que son guantes gruesos impermeables de goma, pechera plástica, escudos faciales o lentes protectores. (Norma General de Prevención y Control de las Infecciones Intrahospitalarias Ministerio de Salud 1993). El término también se aplica a material contaminado por uso en el laboratorio de Microbiología.

#### **B. Inspección:**

Corresponde a la evaluación visual de los artículos lavados en búsqueda de desperfectos o suciedad que pudieran interferir en los métodos de esterilización. Esta debe ser realizada en forma minuciosa con apoyo de una lupa en cada uno de los artículos antes de proceder a su preparación y empaque.

#### **C. Preparación/empaque:**

En esta etapa los artículos son preparados y empaquetados en condiciones que se facilite su uso y se eviten daños y deterioro del material. Cada artículo tiene requerimientos especiales en cuanto a preparación que deben ser considerados. El empaque requerido por cada artículo depende del método de esterilización, su naturaleza y el uso a que está destinado. Deben ser permeables al método de esterilización que se utilice y resistente al almacenamiento hasta el momento de uso a fin de otorgar seguridad al usuario.

#### **D. Esterilización:**

Es la eliminación completa de toda forma de vida microbiana de objetos inanimados incluyendo esporas bacterianas. Puede conseguirse a través de métodos físicos, químicos o gaseosos.

#### **E. Almacenamiento:**

Corresponde al proceso a través del cual, los artículos son conservados hasta su uso. Las condiciones de almacenamiento deben asegurar la esterilidad o desinfección del artículo al momento del uso.

#### **F. Entrega de materiales:**

Corresponde a la distribución de los materiales a los servicios usuarios en cantidad y calidad necesaria para sus requerimientos.

#### **G. Certificación de los métodos de esterilización:**

Constituyen indicadores que permiten verificar que los materiales fueron sometidos a procesos de esterilización y como resultado se encuentran estériles.

### **3. Métodos De Esterilización**

Existen métodos de esterilización por alta temperatura y por baja temperatura. Los métodos de esterilización por altas temperaturas son el autoclave a vapor y el horno por calor seco. El autoclave a vapor se considera el método de esterilización más efectivo en la actualidad debido a que es rápido, certificable y costo beneficio favorable. Debe ser seleccionado como primera opción y sólo procesar por otros métodos materiales no susceptibles de ser sometidos a este sistema. Los hornos o pupinel eliminan microorganismos por calor seco. Los métodos

de esterilización a baja temperatura son el óxido de etileno (ETO), el vapor de formaldehído, el plasma de peróxido de hidrógeno, el plasma combinado y el ácido peracético líquido. En estos métodos, los parámetros críticos de esterilización son la temperatura, presión, tiempo y concentración del agente los que tienen distintos grados de toxicidad para los pacientes y el personal. Los tiempos de ciclos son distintos dependiendo de la tecnología empleada. La compatibilidad de los materiales es diferente en las distintas tecnologías por lo que debe conocerse previo a someter el material a ellas. El ácido peracético sólo es compatible con material sumergible. Opera en un equipo automático en tiempos de 30 minutos. La esterilización por radiaciones ionizantes requiere infraestructura especializada y no puede ser realizada en las instituciones de salud.

### **3. 1. Métodos de Esterilización a altas temperaturas:**

#### **3.1.2 Esterilización por calor húmedo:**

Este método de esterilización elimina microorganismos por desnaturalización y coagulación de las proteínas con vapor saturado y temperaturas entre 121° y 134°C , requiriendo temperaturas y tiempos de esterilización cortos.

Para la esterilización por calor húmedo se utilizan equipos denominados autoclaves a vapor. Hoy en día la mayoría de los materiales y artículos que requieren ser estériles en un establecimiento como el instrumental quirúrgico, los textiles y gomas pueden ser procesados en autoclave.

#### **3.1.3 Esterilización por calor seco en pupinel:**

Este sistema elimina microorganismos por desecación y carbonización de las proteínas, el pupinel opera a temperaturas que van desde 120° a 180° C y por tiempos mayores a 30 minutos. Su efectividad depende de la difusión del calor, la cantidad de calor disponible y los niveles de pérdida de calor. La acción microbicida del calor seco está condicionada por la presencia de materia orgánica o suciedad en el artículo.

Este método es difícil de certificar excepto en equipos complejos y especializados. El calor seco penetra lentamente en los materiales por lo que se requieren largos períodos de exposición. Debido a las altas temperaturas necesarias para destruir los microorganismos, es inapropiado para algunos materiales como líquidos, gomas y géneros. Por otra parte daña el instrumental porque reduce el temple del acero. El uso del calor seco debe limitarse a materiales que no pueden ser esterilizados en autoclave.

Los materiales que pueden esterilizarse en pupinel y no pueden esterilizarse en autoclave son sólo aceites, vaselina, petrolatos y polvos.

### **3.2 Esterilización por radiaciones ionizantes:**

Las radiaciones ionizantes se consideraron un método práctico de esterilización en la década de los 50 cuando se descubrieron sus propiedades para la eliminación de microorganismos. Coincidió también la utilización de este método con el desarrollo de material desechable en gran escala.

La esterilización se obtiene sometiendo los materiales a dosis predeterminadas de radiaciones. Hasta la fecha se han utilizado tecnologías con rayos gamma. Este tipo de proceso es de alta complejidad y sólo puede ser realizado bajo estrictas condiciones de seguridad. Requiere infraestructura especializada que en general no es posible ni se justifica en centros de salud. El material debe cumplir requisitos estrictos en cuanto a manufactura y empaque. Este método se encuentra limitado a plantas industriales para artículos nuevos y de

un sólo uso. En general la mayoría de los materiales pueden ser irradiados incluyendo, látex, celulosa, líquidos y género.

#### 4. Certificación de los procesos de esterilización

Los indicadores de esterilización tienen como objetivo certificar que el proceso se efectuó en forma adecuada. Existen indicadores de proceso del equipo, indicadores químicos e indicadores biológicos. Los indicadores del equipo son elementos incorporados que permiten visualizar si los parámetros requeridos se cumplieron. Los indicadores químicos son dispositivos que cambian de color cuando se exponen a una o más variables críticas del proceso y dependiendo de cuantas variables certifiquen pueden ser uniparámetros, multiparámetros o integrados cuando certifican todas las variables críticas del proceso. Debe usarse un indicador químico en cada paquete a esterilizar debido a que permiten diferenciar materiales que han sido sometidos o no a procesos de esterilización. Los indicadores biológicos se utilizan para certificar la muerte de microorganismos una vez terminado el proceso. Los indicadores biológicos convencionales se fabrican sobre la base de esporas de microorganismos que son sometidas al proceso y luego se comprueba su muerte. Los indicadores biológicos se utilizan para evaluar la efectividad de los equipos y deben usarse semanalmente en todos los equipos de esterilización y cada vez que se reparan.

#### 5. Desinfección y uso de desinfectantes

La desinfección es un proceso que elimina microorganismos vegetativos de objetos inanimados y no asegura la eliminación de esporas. Este proceso consiste en poner en contacto el material o superficies con agentes químicos. Los desinfectantes de uso más frecuente son: alcoholes, amonios cuaternarios, cloro y compuestos clorados, fenoles, formaldehído, glutaraldehído, y peróxido de hidrógeno estabilizado.

De acuerdo al tipo de agentes que es capaz de destruir, se han definido tres niveles de desinfección: alto, intermedio y bajo.

La desinfección de alto nivel elimina todos los microorganismos incluyendo esporas, los virus resistentes y *Mycobacterium tuberculosis*.

La desinfección de nivel intermedio elimina formas vegetativas de bacterias, hongos y virus pero no necesariamente todos los virus de tamaño pequeño no lipídico. La desinfección de nivel bajo elimina bacterias patógenas en su forma vegetativa y algunos hongos, no elimina el *Mycobacterium tuberculosis* ni los virus de tamaño pequeño no lipídico. Existen desinfectantes de nivel bajo que no destruyen las formas vegetativas de todas las bacterias.

##### 5.1 Alcoholes

Son componentes químicos solubles en agua, los más utilizados son el alcohol etílico y el alcohol isopropílico. Destruyen rápidamente formas vegetativas de bacterias, hongos, virus y *M. tuberculosis*. Actúa por desnaturalización de las proteínas y su actividad cae bruscamente en concentraciones menores al 50%.

La concentración bactericida óptima está en un rango de 60% a 90% por volumen. La concentración habitual de uso es 70% en que tiene su mayor efectividad. El alcohol se considera un desinfectante de nivel intermedio y se usa en la desinfección de superficies y artículos no críticos. Se utiliza en la desinfección de termómetros orales y rectales, laringoscopios y pequeñas superficies como las tapas de goma de algunos frascos de medicamentos y para el enjuague de canales de endoscopios. Las desventajas de los

alcoholes en los equipos son que dañan la cubierta de los lentes, tienden a alterar y endurecer el material de goma y plástico, se inactivan en presencia de materia orgánica y se evaporan rápidamente. Esto condiciona que no se deben usar alcoholes como método de desinfección de alto nivel ni para materiales en inmersión.

### 5.1.2 Cloro y compuestos derivados del cloro

Los agentes clorados tienen amplio espectro microbicida. Su uso está limitado porque se inactivan en presencia de materia orgánica, son inestables y corroen el material metálico. Por otra parte, son tóxicos en contacto con piel y mucosas.

Los hipocloritos son los desinfectantes clorados más utilizados. Su presentación líquida como hipoclorito de sodio es la más conocida, y existe una forma sólida como hipoclorito de calcio. El mecanismo de acción por el cual el cloro libre destruye los microorganismos no ha sido bien dilucidado. Se postula la inhibición de algunas reacciones enzimáticas, la desnaturalización de las proteínas y la inactivación de los ácidos nucleicos.

Las soluciones de cloro no deben conservarse en envases destapados por más de 12 horas debido a la evaporación del producto activo, haciendo que las concentraciones de cloro disponible disminuyan. Las formulaciones líquidas a temperatura ambiente pueden conservar sus propiedades cuando se almacenan en contenedores cerrados, en oscuridad y a capacidad completa por un período de un mes. Sin embargo, si se abre y cierra el contenedor durante este período, la concentración original puede disminuir entre 40 y 50%. Su uso en la actualidad se limita al saneamiento ambiental común de las superficies y artículos no críticos.

## 6. Antisépticos y antisepsia

Los antisépticos son sustancias químicas destinadas a eliminar microorganismos presentes en las superficies de los tejidos vivos (piel y mucosas), los más utilizados son el alcohol, el yodo combinado con alcohol o con povidona y la clorhexidina. Antisepsia es por lo tanto la utilización de agentes químicos sobre piel o sobre otros tejidos vivos para inhibir o eliminar los microorganismos; no implica una acción esporicida.

### Esterilización en Autoclave

Temperatura (Grados Celsius)	Tiempo (Minutos)	Presión (Atmósferas)
121°	15	1.5
126°	10	2
134°	3	2.9

### Esterilización en horno Pasteur

Temperatura	Tiempo de Exposición
180°C	30 Minutos
170°C	1 Hora
160°C	2 Horas
150°C	3 Horas

140°C	4 Horas
120°C	6 Horas

### **OBJETIVOS:**

1. Conocer los métodos de control del proceso de esterilización en Autoclave.
2. Conocer y evaluar la acción de los desinfectantes de uso rutinario en la clínica odontológica.

### **Actividades:**

- 1.-Prueba de Hongos
- 2.-Los alumnos disponen de material esterilizado en Autoclave, junto con un control biológico a tiempos adecuados e inadecuados .A estos controles biológicos provenientes de las distintas cargas de esterilización se les agregará caldo de cultivo estéril. Rotular y llevar a estufa a 37°C.
- 3 -Los alumnos disponen de extractores pulpares contaminados con un cultivo líquido de bacterias esporuladas, además disponen de alcohol 70%, hipoclorito de Sodio 0.5% y detergente enzimático.
  - a) Tome los extractores pulpares (2) y sumérjalos cada uno en los desinfectantes por dos tiempos diferentes: 5 y 30 minutos
  - b) Retírelos con pinzas y deposítelos en tubos con caldo de cultivo estéril, rotule y lleve a estufa a 37°C.
3. Los alumnos disponen de una cepa bacteriana esporulada, además tendrán hisopos estériles y 2 desinfectantes :hipoclorito y alcohol.
  - a) Contamine un área de una placa de petri vacía con una tórula embebida en la cepa bacteriana y deje actuar por 5 minutos.
  - b) Con un hisopo estéril tome una muestra y siembre en la mitad de una placa de Agar sangre.
  - c) Deje actuar cloro durante 5 minutos sobre la superficie que usted contaminó.
  - d) Con un hisopo estéril tome una muestra de esa superficie y siembre en la otra mitad de la placa de Agar sangre.
  - e) Repita los mismos pasos con el alcohol .Rotule y lleve todo el material a la estufa a37°C.
4. Los alumnos disponen de 2 placas de Agar sangre, hisopos estériles y un antiséptico (clorhexidina al 4%)
  - a) Con un hisopo estéril tome una muestra de la palma de la mano y siembre en Agar sangre
  - b) Con un hisopo embebido en clorhexidina limpie la misma zona de la palma de la mano del punto anterior y con otro hisopo estéril, tome una muestra y siembre en Agar sangre

## **Paso Práctico N°8 Biseguridad II**

### **I. Objetivos:**

Analizar la acción de los diferentes métodos de eliminación de microorganismos a través de antisépticos, desinfectantes y equipo de esterilización.

### **II. Actividades**

1. Prueba de Bioseguridad
2. Observar los resultados del Trabajo Práctico anterior
3. Analizar y discutir con el docente los resultados obtenidos