

Tema 1: Conferencia 2

Introducción al estudio de los agentes biológicos de importancia médica.



CONTENIDO

- **Características de las células eucariotas y procariotas.**
- **Microscopia y coloraciones.**
- **Fisiología microbiana. Metabolismo y nutrición. Principios generales. Efecto del medio sobre el crecimiento microbiano (nutrientes, temperatura, aereación, pH y otros).**
- **El cultivo de los microorganismos: clasificación de los medios de cultivo, métodos de siembra. Aislamiento en cultivo puro. Colonia. Medio selectivo y medio diferencial. Técnicas para el cultivo de aerobios estrictos. Crecimiento bacteriano, la curva de crecimiento y sus fases.**

Objetivos

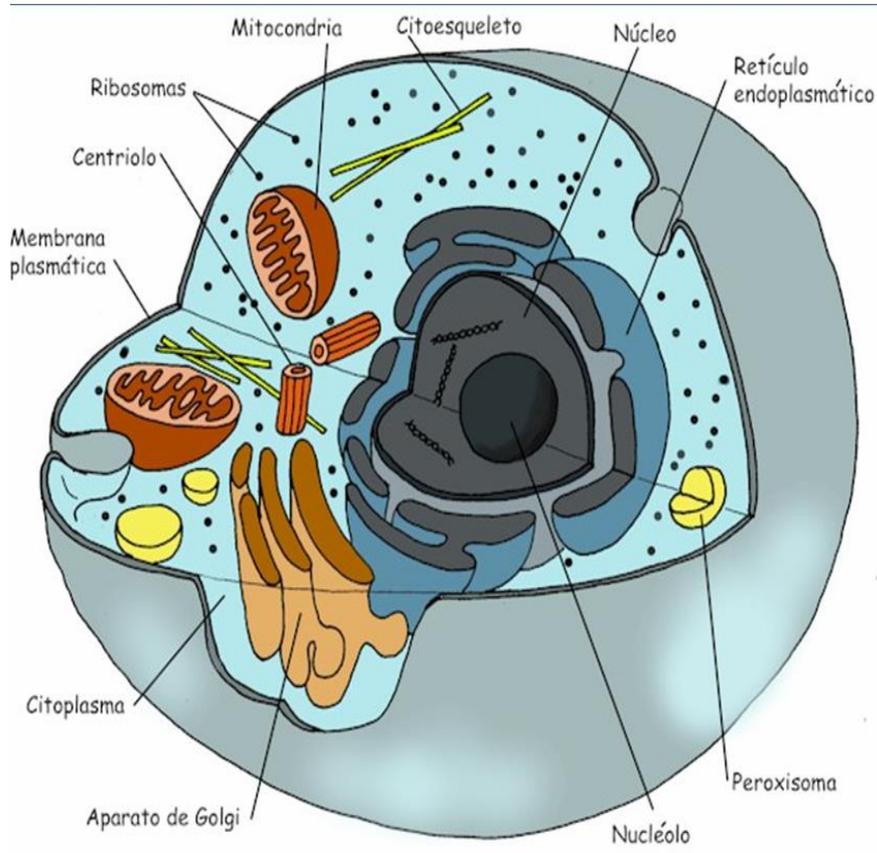
- **Exponer las similitudes y diferencias entre las células procarióticas y eucarióticas**
- **Describir las diferencias entre las bacterias grampositivas y gramnegativas.**
- **Describir los principios generales del metabolismo microbiano.**
- **Exponer las ventajas y limitaciones de los diferentes tipos de técnicas microscópicas ópticas y electrónicas, señalando su aplicación en los laboratorios de Microbiología y Parasitología Médicas**

Objetivos

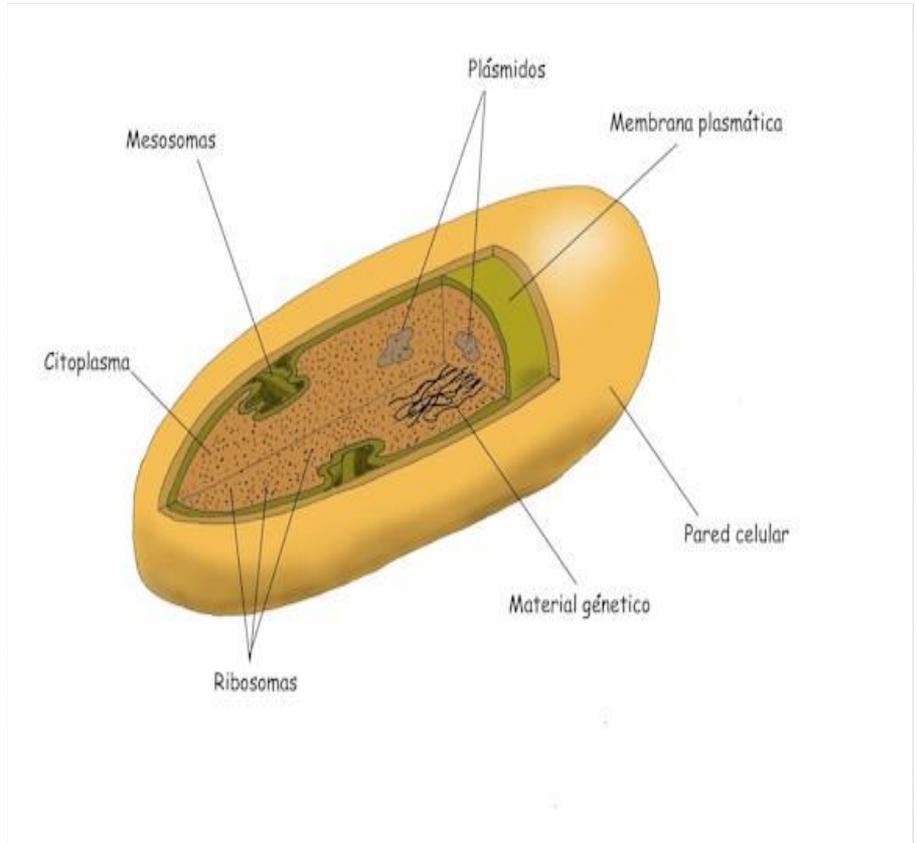
- **Analizar la utilidad de los diferentes métodos de coloraciones empleados en los laboratorios de Microbiología y Parasitología Médicas, con énfasis en sus fundamentos, usos y modificaciones**
- **Describir el cultivo de los microorganismos destacando la importancia de obtener cultivos puros para lograr la identificación de las bacterias y ofrecer diagnósticos fiables.**

Células

EUCARIOTA



PROCARIOTA



Células

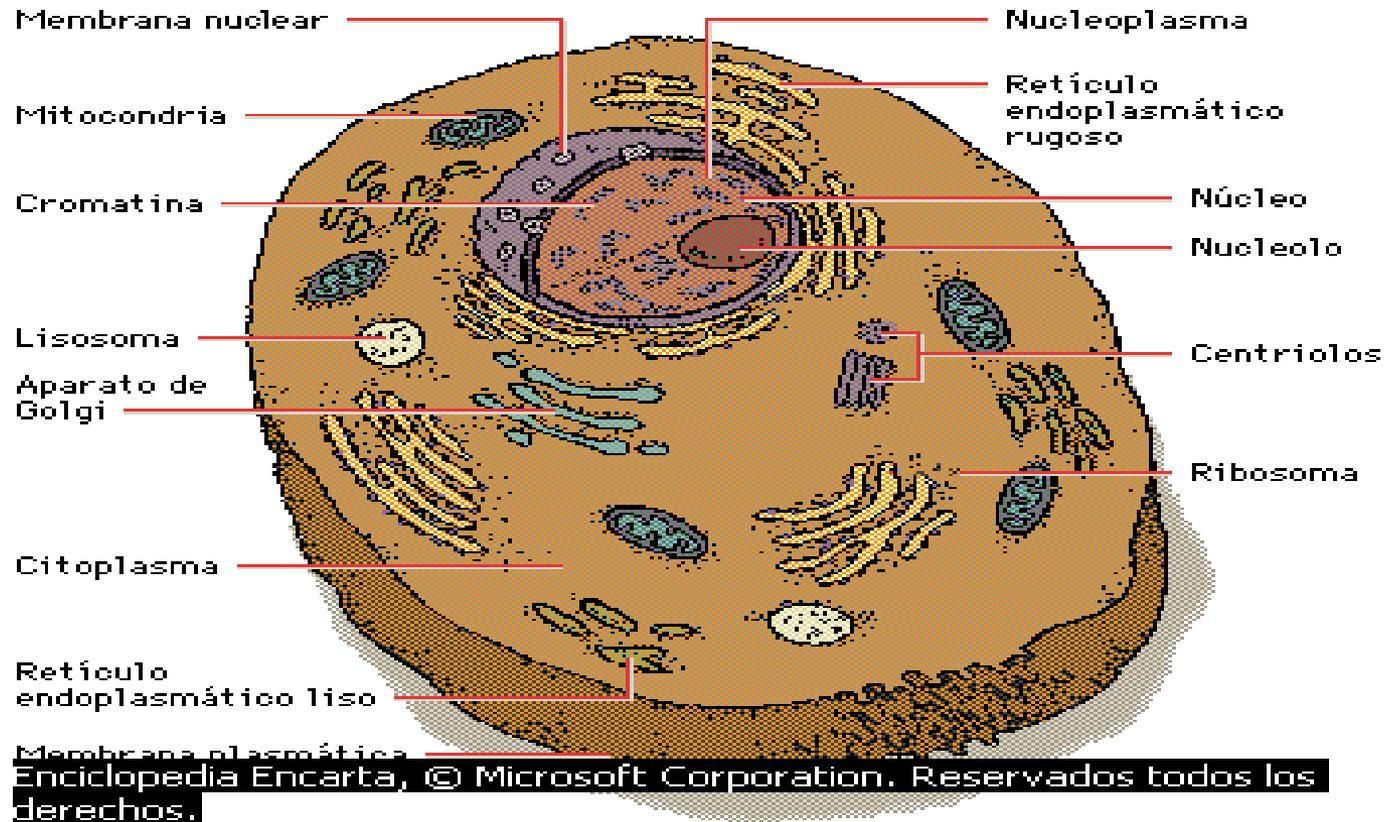
• PROCARIOTAS

- ✓ Posee membrana citoplasmática.
- ✓ Poseen fibrilla de ADN, no hay núcleo verdadero.
- ✓ No poseen organelos citoplasmáticos.
- ✓ Son estructuralmente más simples, excepto en la pared celular
- ✓ Reproducción asexual
- ✓ Ej. Bacterias

• EUCARIOTAS

- ✓ Posee membrana citoplasmática.(esteroles)
- ✓ Posee núcleo verdadero, con membrana nuclear y juegos de cromosomas.
- ✓ Poseen organelos citoplasmáticos
- ✓ Son estructuralmente más complejas, excepto en la pared celular
- ✓ Reproducción asexual y sexual
- ✓ Ej. Hongos

Célula animal



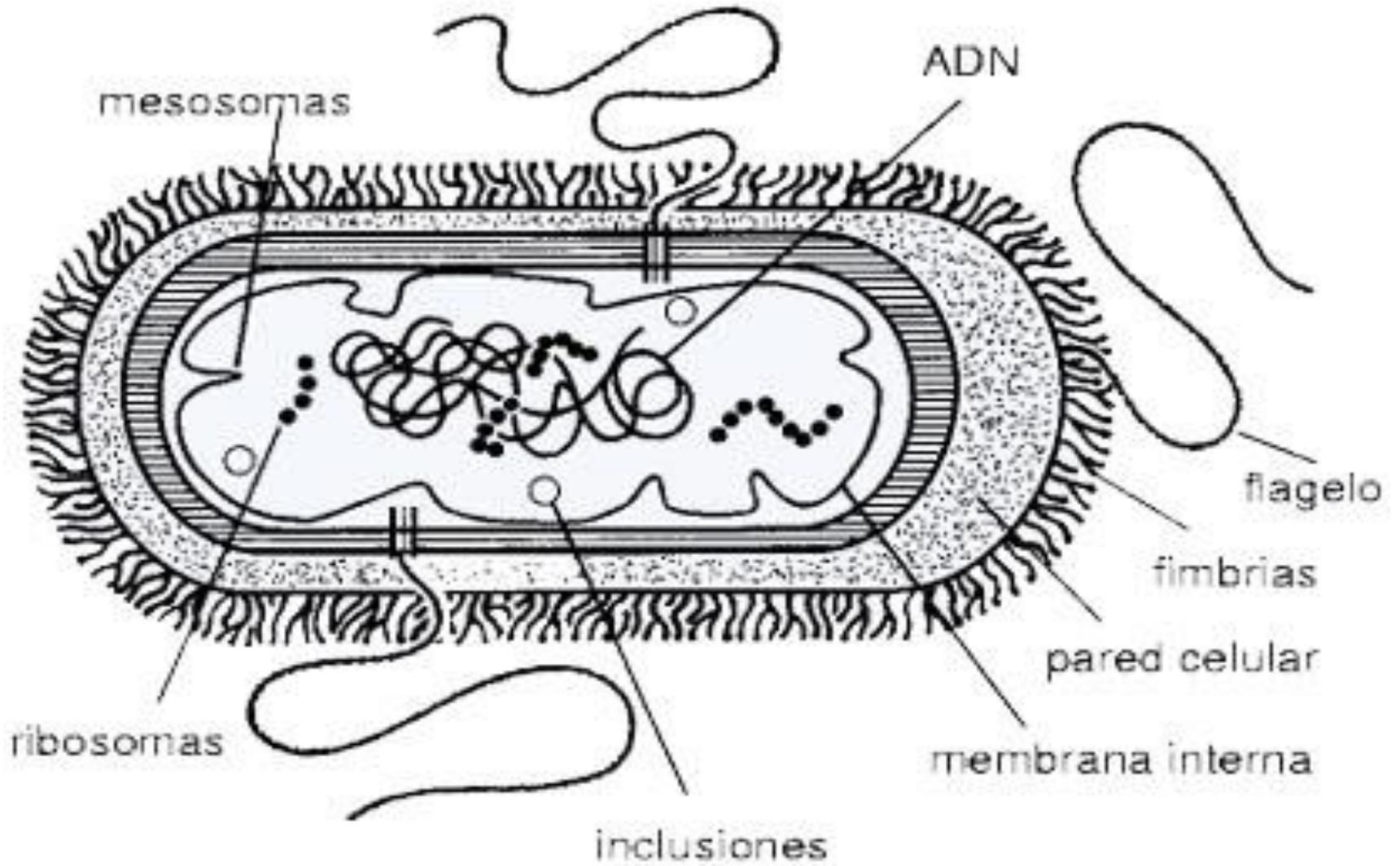
**Célula
eucariota**



**Célula
procariota**



Célula bacteriana



Estructuras Externas

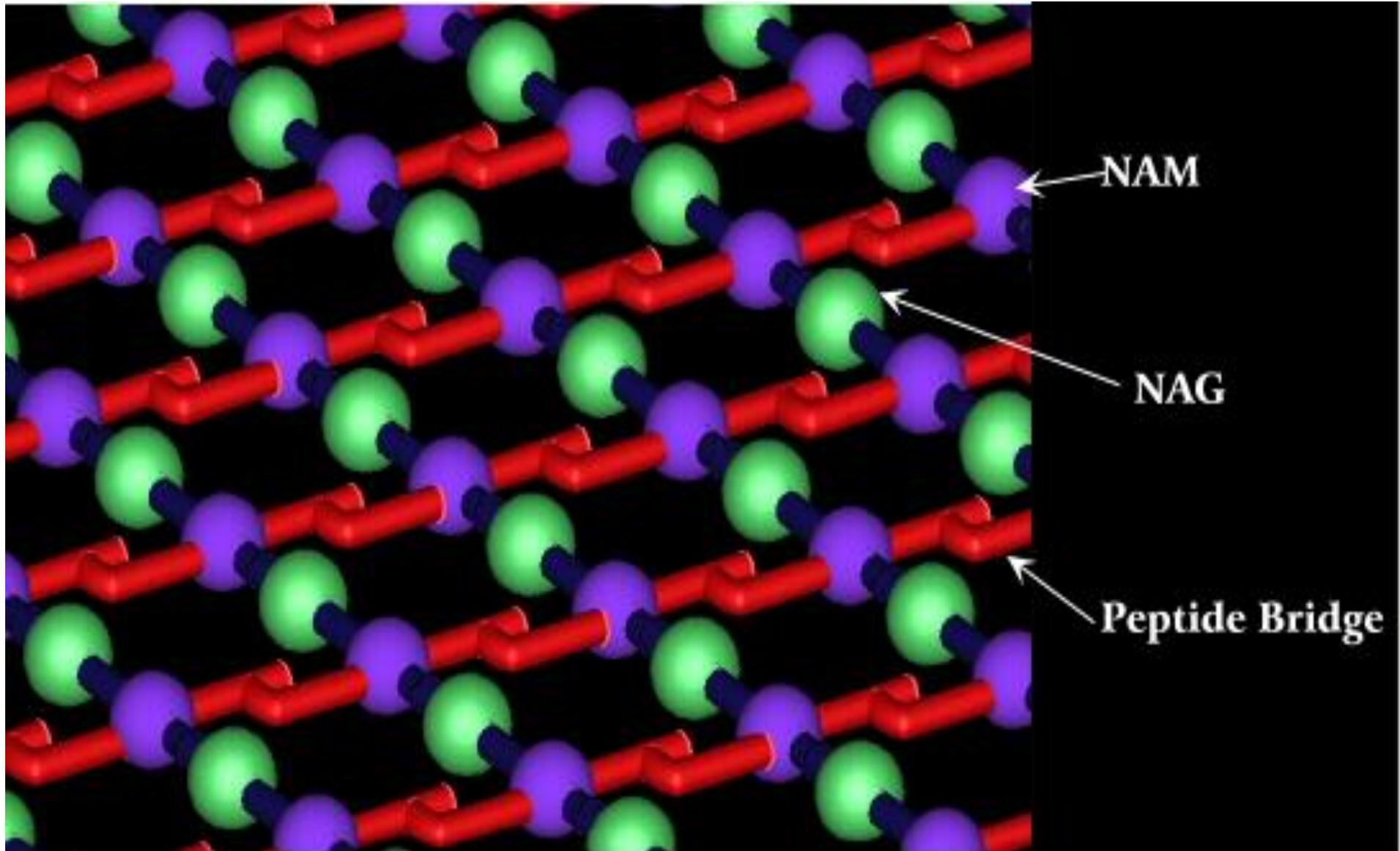
- **Pared Celular**
- **Membrana citoplásmica**
- **Cápsula**
- **Flagelos**
- **Pili o fimbrias**
- **Glicocálix**
- **Slime**

Estructuras Internas

- **Mesosomas**
- **Nucleoide**
- **Ribosomas**
- **Gránulos citoplasmáticos.**
- **Cromatóforos**

PARED CELULAR

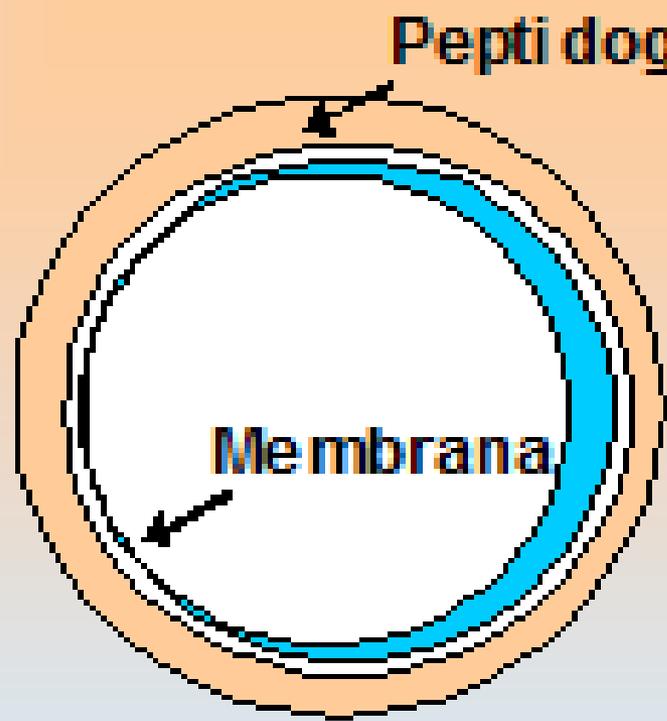
COMPOSICIÓN: Peptidoglucano



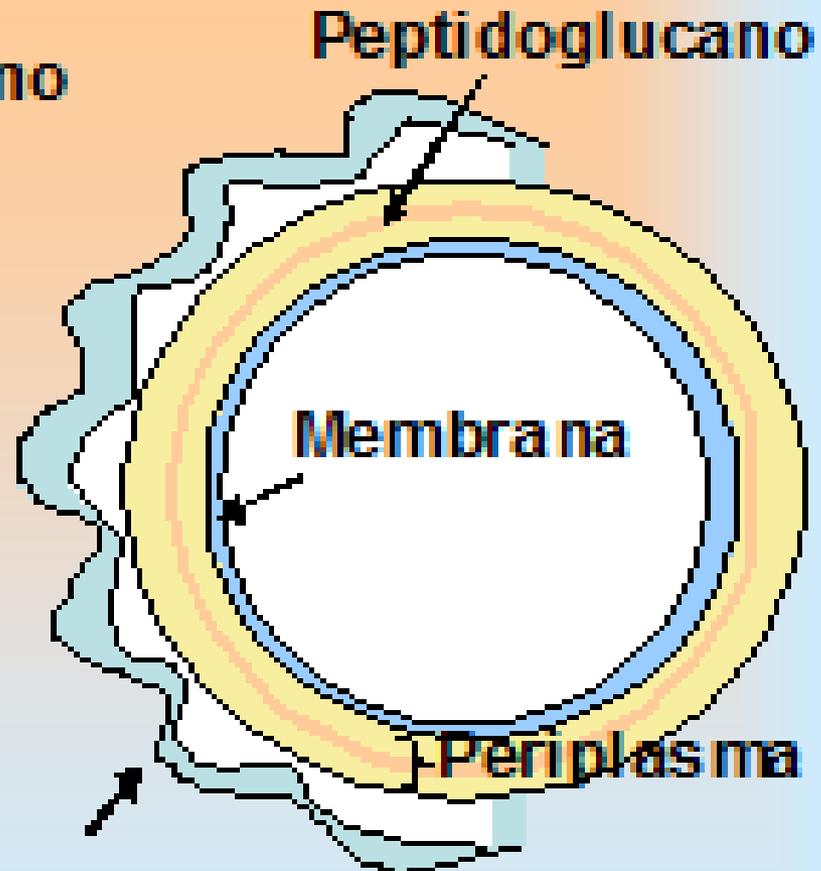
Gram (+)

Pared celular

Gram (-)

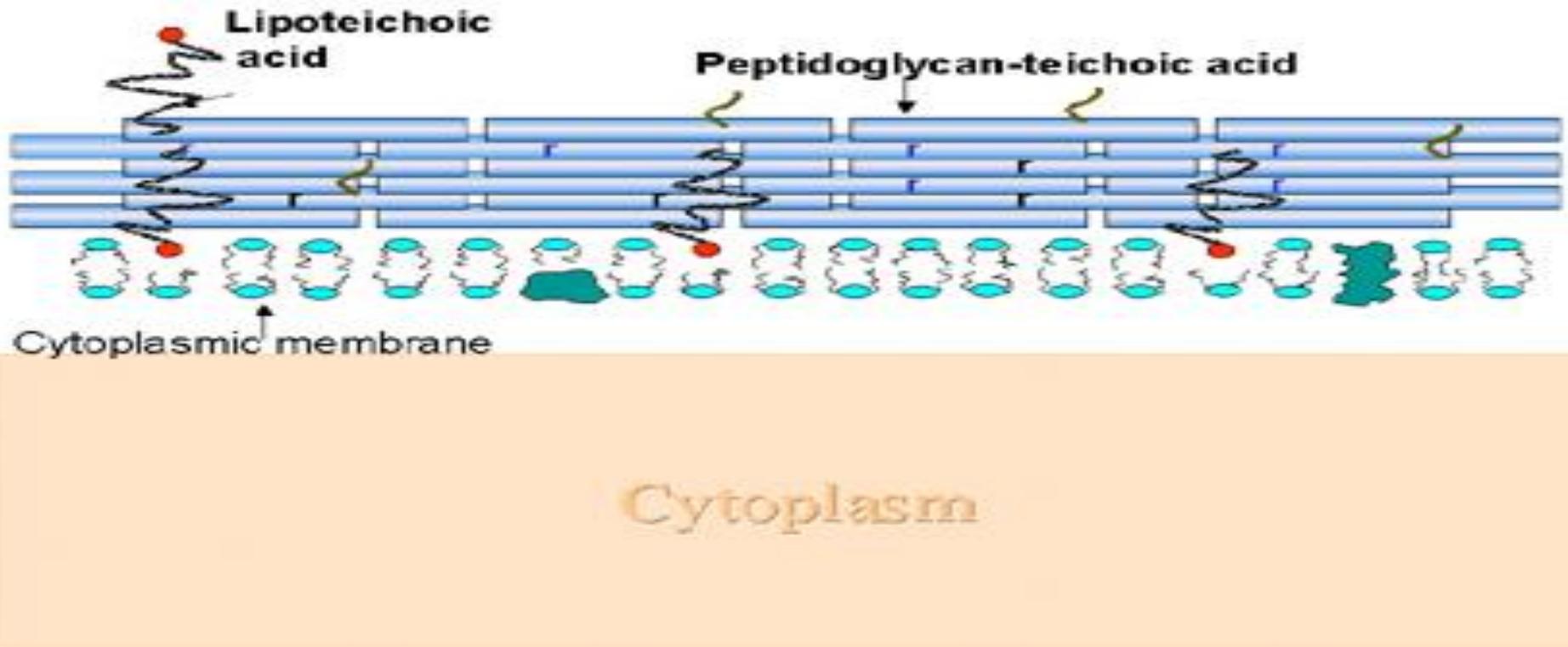


- Ácidos teicoicos
- Polisacaridos



- Membrana externa
- Lipopolisacáridos
- Lipoproteínas

Gram Positive Cell Envelope



Staphylococcus aureus

Streptococcus pneumoniae

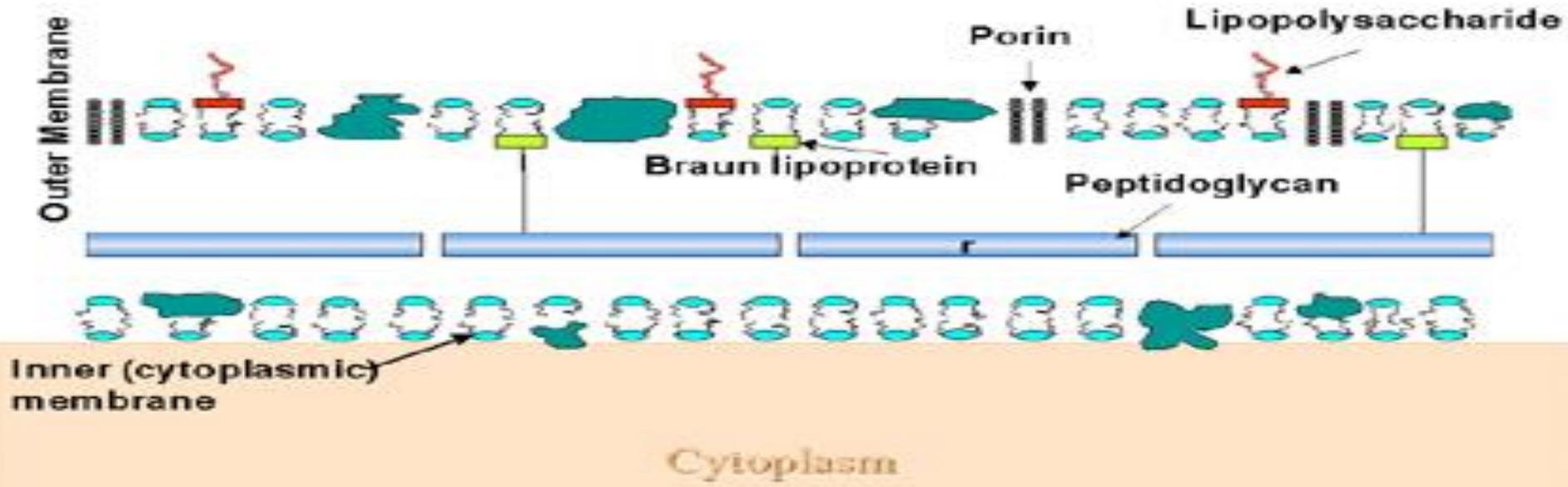
Clostridium tetani

Neisseria meningitidis

Escherichia coli

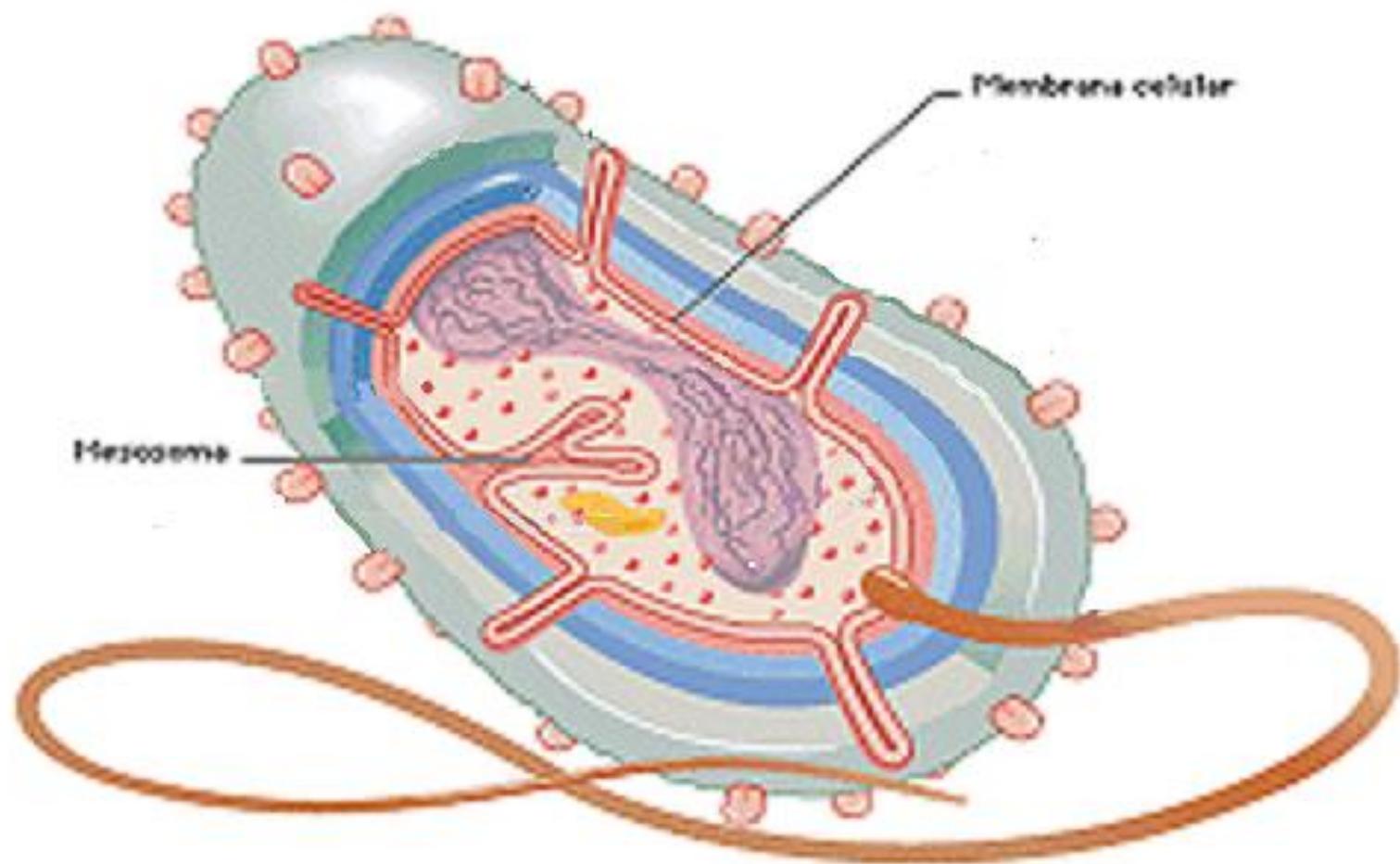
Pseudomona aeruginosa

Gram Negative Cell Envelope



Pared Celular. Funciones

- **Protección osmótica**
- **Carácter tintorial**
- **Forma**
- **División celular**
- **Determinantes antigénicos**



Membrana celular

Composición: doble capa de fosfolípidos y proteínas

Funciones

- Permeabilidad selectiva y transporte activo
- El transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.
- Participa en biosíntesis de la pared celular y de
- Receptores de los fagos
- Sistemas quimiotácticos

Mesosomas (invaginaciones de la membrana citoplásmica)

Constitución: fosfolípidos, polipéptidos

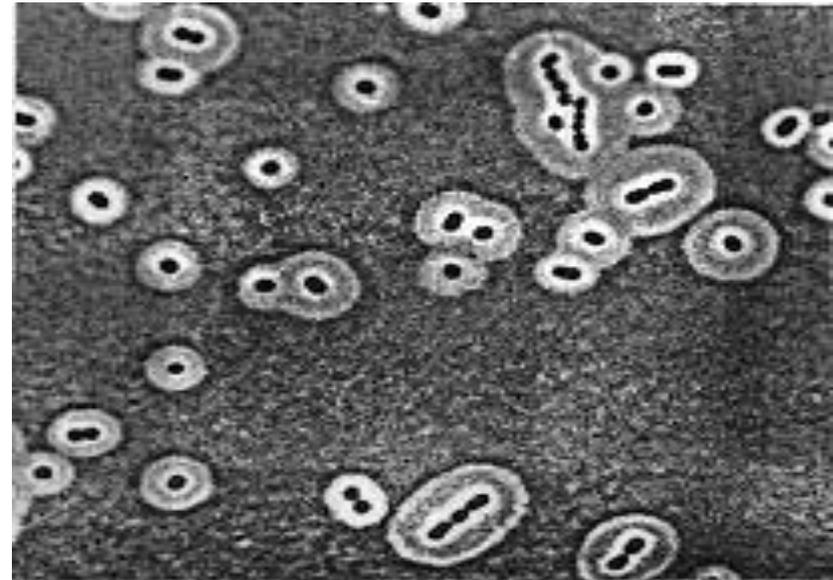
mesosomas de tabique: que funcionan en la formación de paredes transversas durante la división celular

mesosomas laterales, donde los citocromos y otras enzimas de la cadena respiratoria se encuentran concentrados

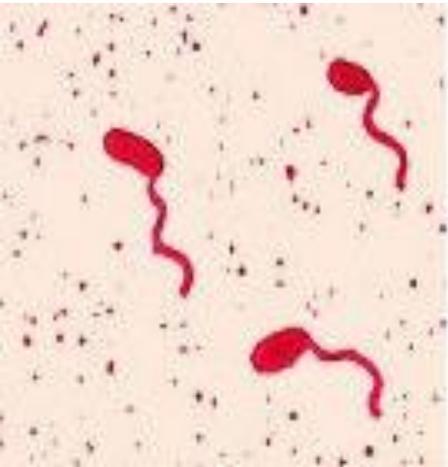
Cápsula

Constitución :polisacáridos

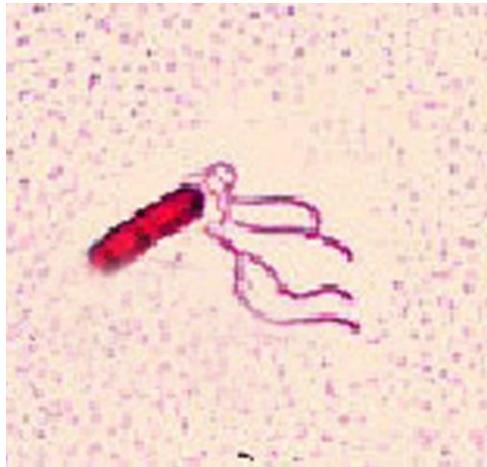
**Funciones: Protección (antifagocitica)
Adherencia**



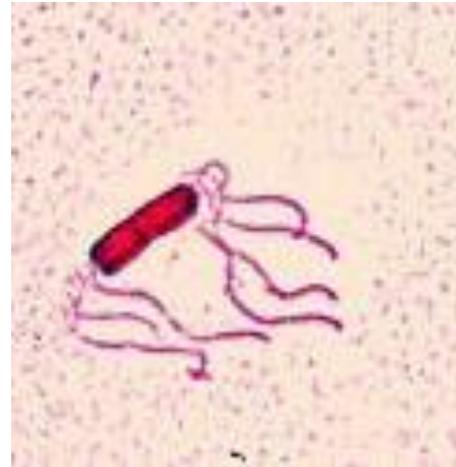
Flagelos



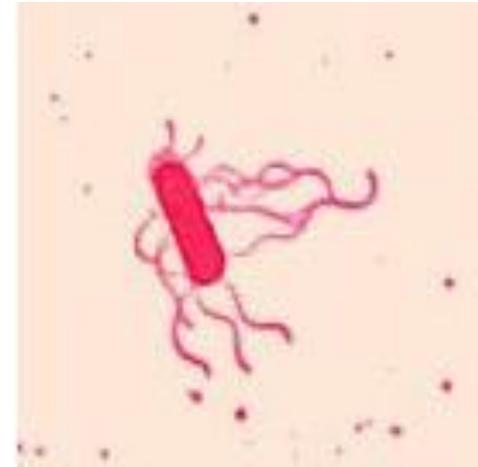
Monotricos



Anfitricos



Lofotricos



Peritricos

Flagelos

Constitución: proteínas subunidades (flagelina)

Funciones:

- Motilidad
- Taxonomía
- Determinante antigénico

- **Fimbrias o pilis**

Constitución: proteínas cortas

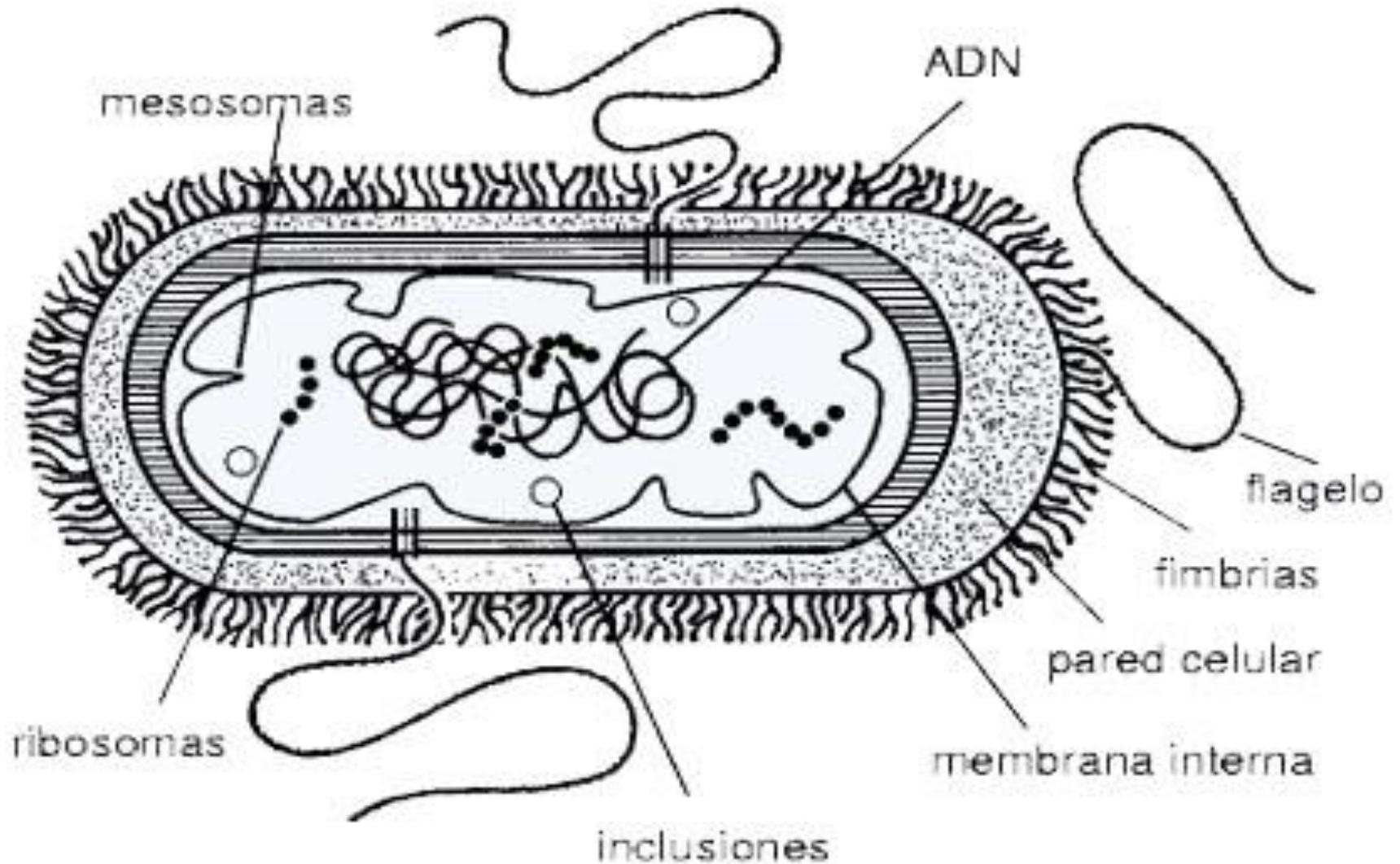
Funciones: sexual y adhesión

Glicocalix

Constitución: polisacáridos

Funciones: adhesión

CELULA BACTERIANA



Granulos citoplasmáticos

Constitución: volitina, glucogeno, azufre

Funciones: Almacenar ,material de reserva

Ribosomas

Constitución: Proteínas

Funciones: síntesis de proteínas

Plásmidos

Constitución: pequeñas unidades de AND
extracromosomico

Funciones: resistencia y toxinas

•Cromatóforos

Constitución: Sistema de membranas yuxtapuesta

Funciones: fotosíntesis

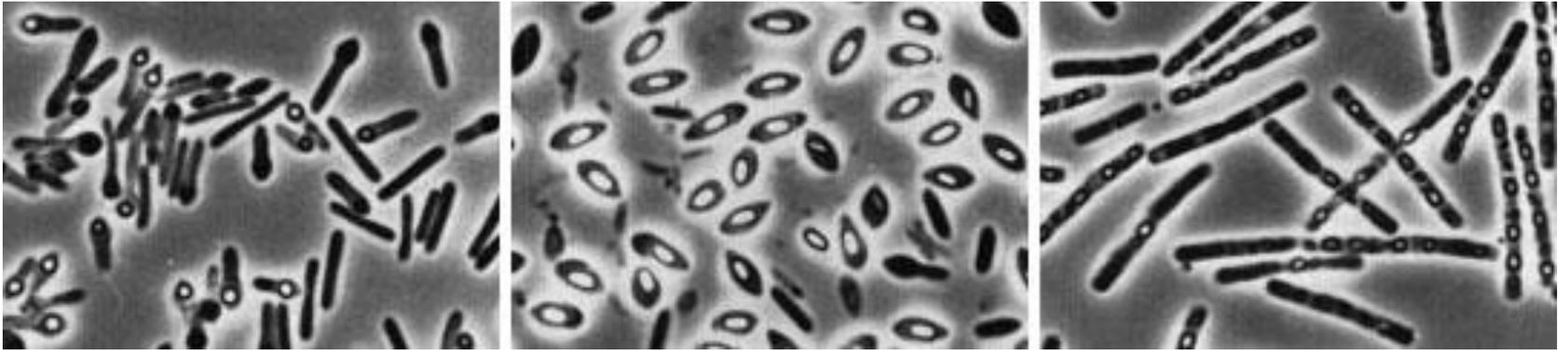
•Nucleoide

Constitución: Acido nucleicos

Funciones: información genética

Endosporas

función : resistencia



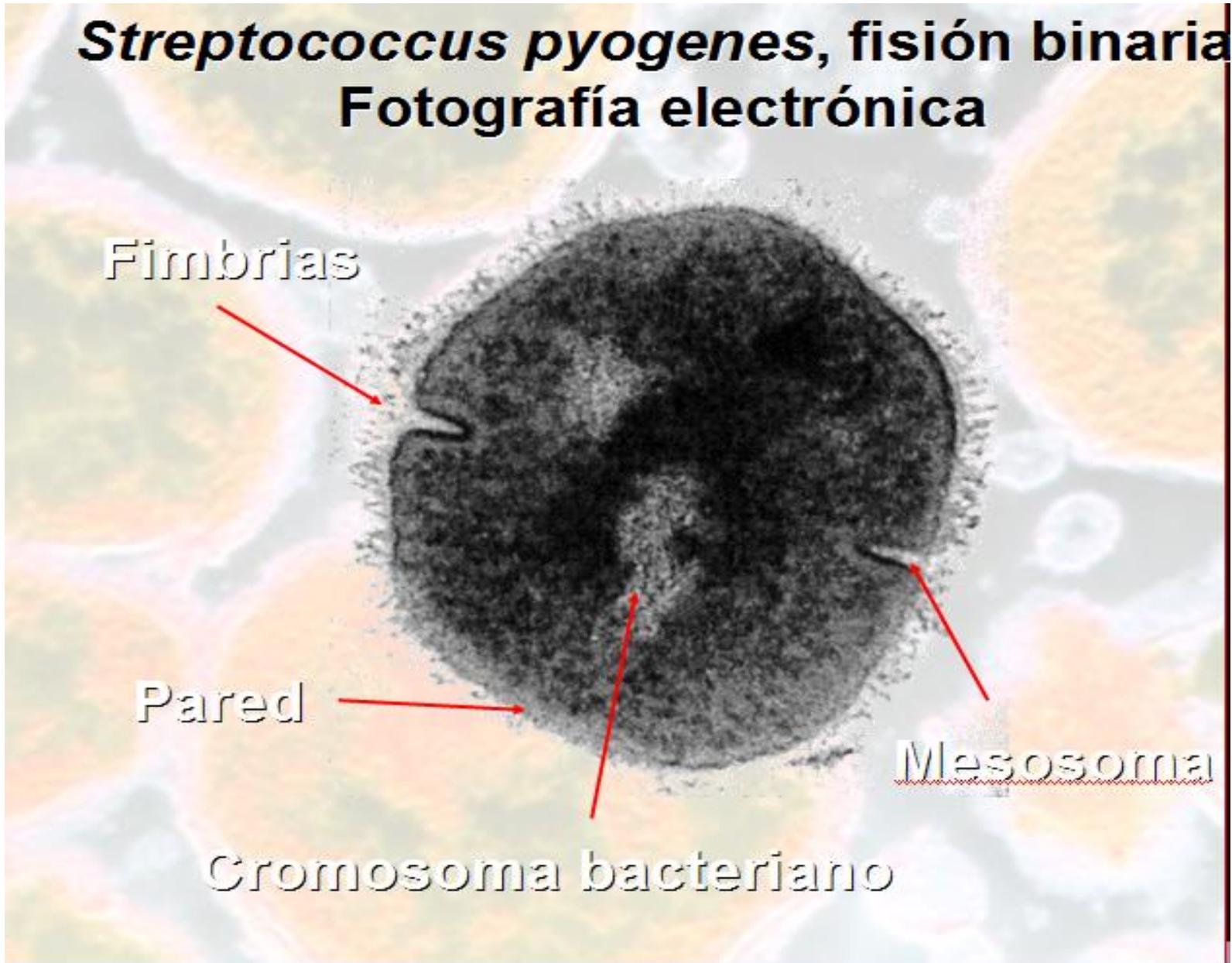
***Streptococcus pyogenes*, fisión binaria**
Fotografía electrónica

Fimbrias

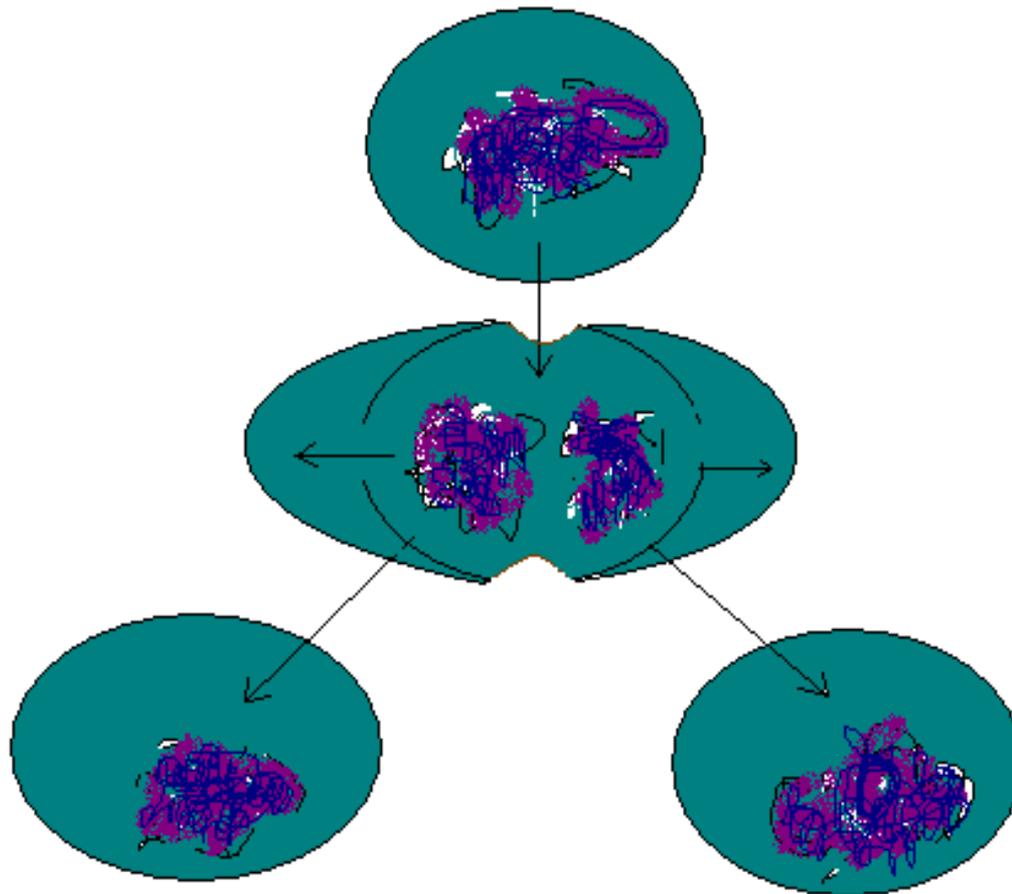
Pared

Mesosoma

Cromosoma bacteriano



División celular por Fisión Binaria o Bipartición.





MICROSCOPIA Y COLORACIONES

MICROSCOPIOS

- **Luminosos:**
 - ✓ Simple
 - ✓ Compuesto
- **Contraste de Fases**
- **Campo Oscuro**
- **Fluorescencia**
- **Electrónico**





Luminosos:

Ventajas: *utilizan luz visible*

•Simple:

Está compuesto por una sola lente de aumento.

Usos: Estas lentes son útiles para la disección, para las mediciones y para el examen de las reacciones de aglutinación. Algunos problemas que se presentan con el uso de una sola lente, como el no poder colocar el campo total dentro del foco y la presencia de anillos coloreados alrededor de los objetos observados, se resuelven en la actualidad con el uso de varias lentes combinadas.

Limitaciones: baja apertura numerica del objetivo y su resolución

•Compuesto:

Es el más usado para la observación de frotis coloreados, pero puede también emplearse para examinar características morfológicas y la movilidad de los organismos en preparaciones denominadas “gotas colgantes” o “en fresco”

Otro ejemplo es el microscopio estereoscópico. Estos microscopios son muy útiles para examinar las características de las colonias de bacterias, hongos, cultivos de tejidos y otros organismos parásitos.



•Contraste de Fases:

Una ventaja es la posibilidad de diferenciar las estructuras internas de células vivas, pues con el microscopio ordinario lo usual es la observación de preparaciones de materiales muertos y teñidos.

Usos: Permite examinar los detalles internos de los microorganismos

Limitaciones: se visualizan mal las bacterias con flagelos y las espirilares

•Campo Oscuro

Ventajas: apertura numérica mayor

Uso: Como los objetos luminosos contra fondo oscuro son percibidos por el ojo más fácilmente, este tipo de iluminación para observación microscópica es útil para visualizar flagelos bacterianos y bacterias espirilares mal definidas con la microscopia de campo claro y de contraste de fase.

Limitaciones: no se puede emplear para todos los microorganismos



Fluorescencia

Ventajas: mayor sensibilidad

Limitaciones: Diferentes fluorocromos son empleados en la práctica, entre los cuales podemos mencionar la auramina y la naranja de acridina,

Uso en la **tinción directa de microorganismos.**

En los laboratorios de microbiología médica se utilizan para la **detección de microorganismos en hemocultivos y para la observación de bacilos acidorresistentes en frotis.**

Otros fluorocromos, tales como isotiocianato de fluoresceína, pueden ser conjugados a anticuerpos y se emplean en los laboratorios en técnicas conocidas como inmunofluorescencia, que nos permiten, con una alta sensibilidad y especificidad, **localizar antígenos en una muestra dada.**

Dos técnicas básicas de inmunofluorescencia son usadas en microscopia: directa e indirecta.



•Electrónico

Ventaja : mayor resolución, utiliza corriente de electrones

Usos: El microscopio electrónico ha hecho posible resolver el detalle celular a nivel molecular y ha permitido a los científicos poder **observar las estructuras detalladas de las células procariótica y eucariótica.** En el campo de la virología ha constituido un instrumento muy valioso, pues permitió la **observación y la identificación de virus.**

Las técnicas convencionales más usadas en la microscopia electrónica son: la tinción negativa, la microtomía y la congelación. La tinción negativa ha tenido amplia aplicación en **el estudio de las macromoléculas, virus y organelas bacterianas.** Los otros dos métodos ofrecen información sobre la **morfología de las subunidades de las estructuras celulares y se han usado con éxito en el estudio de los antibióticos y su acción sobre las membranas de las bacterias y los hongos.**

Limitaciones : costoso



• Autorradiografía

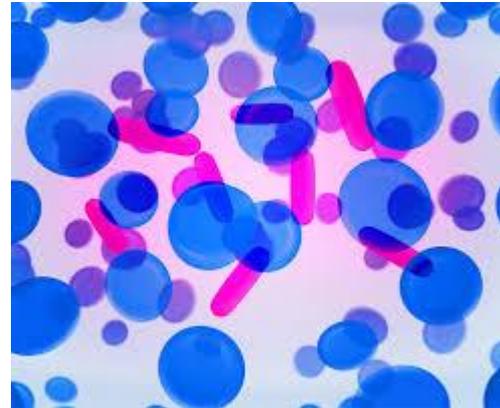
Uso: Tiene gran utilidad para el estudio de la replicación del ADN. Con el mismo principio del método se ha usado sondas de ácido nucleico marcado, conocido como hibridación *in situ*, y que resulta útil para detectar la presencia de ácido nucleico viral, bacteriano y micótico en células y tejidos.

Limitaciones: emplea timidina marcada con tritio como trazador específico Personal calificado

Ventaja: permite el seguimiento del proceso de replicación.

Objetivos de las coloraciones

- Demostrar los microorganismos
- Poner de manifiesto características morfológicas y estructurales
- Diferenciar los microorganismos según su comportamiento tintorial

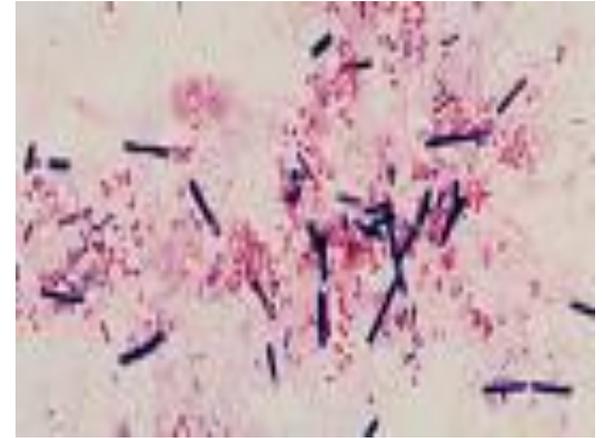


Coloraciones

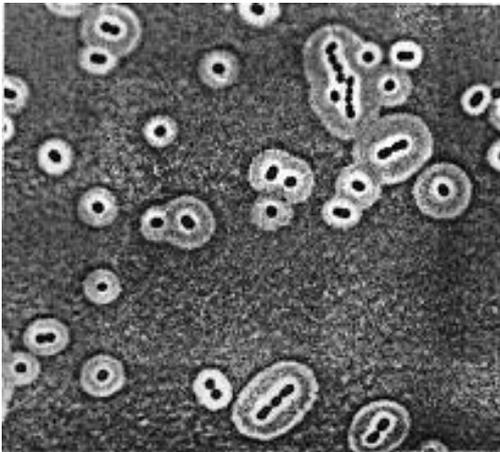
- **Simples: Azul de metileno**
- **Compuestas o Diferenciales: Gram y Ziel- Neelsen**
- **Negativas: Tinta China**



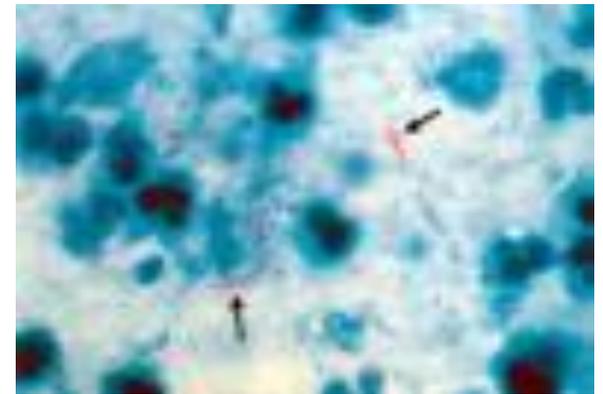
Escherichia
coli



Clostridium
perfringens



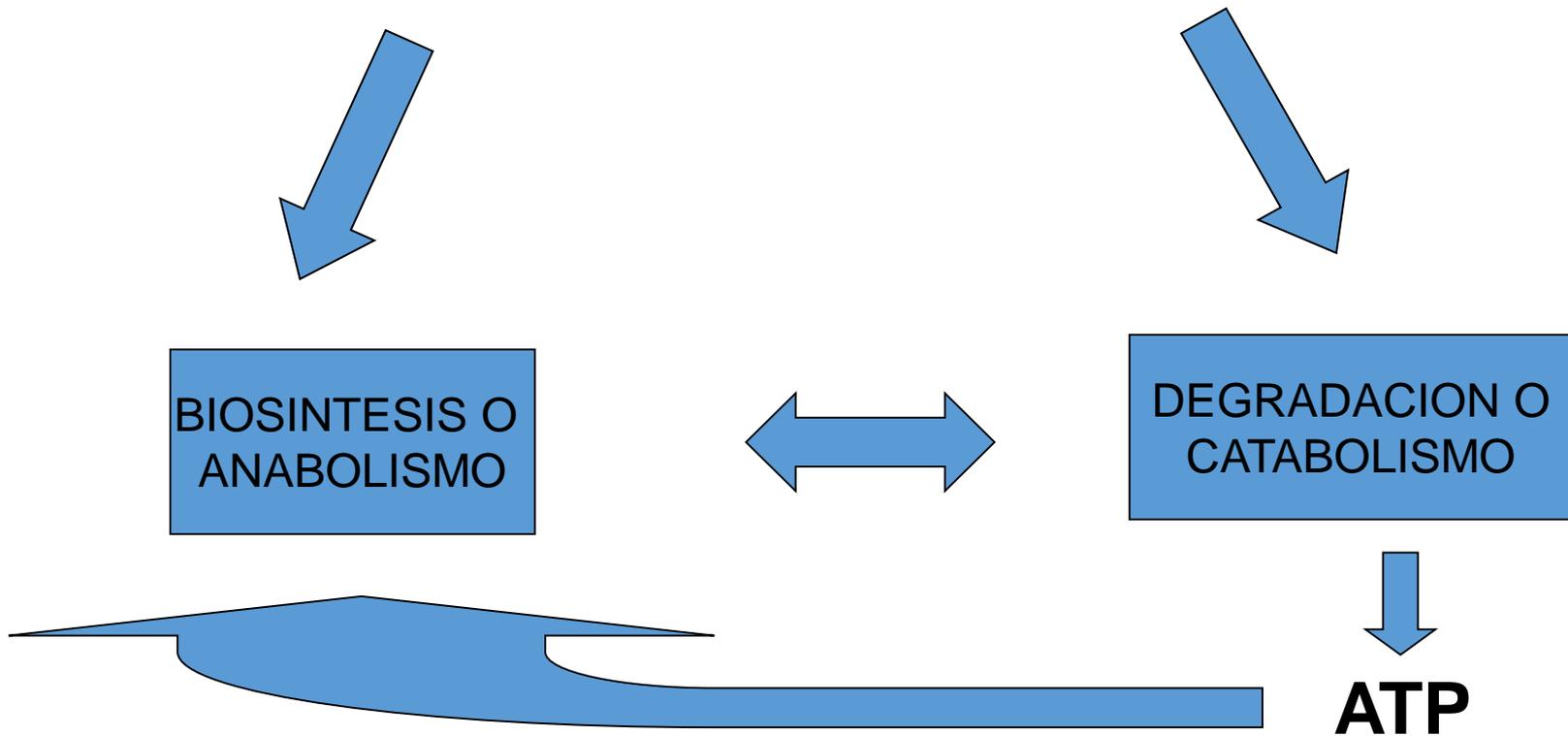
Cryptococcus
neoformans



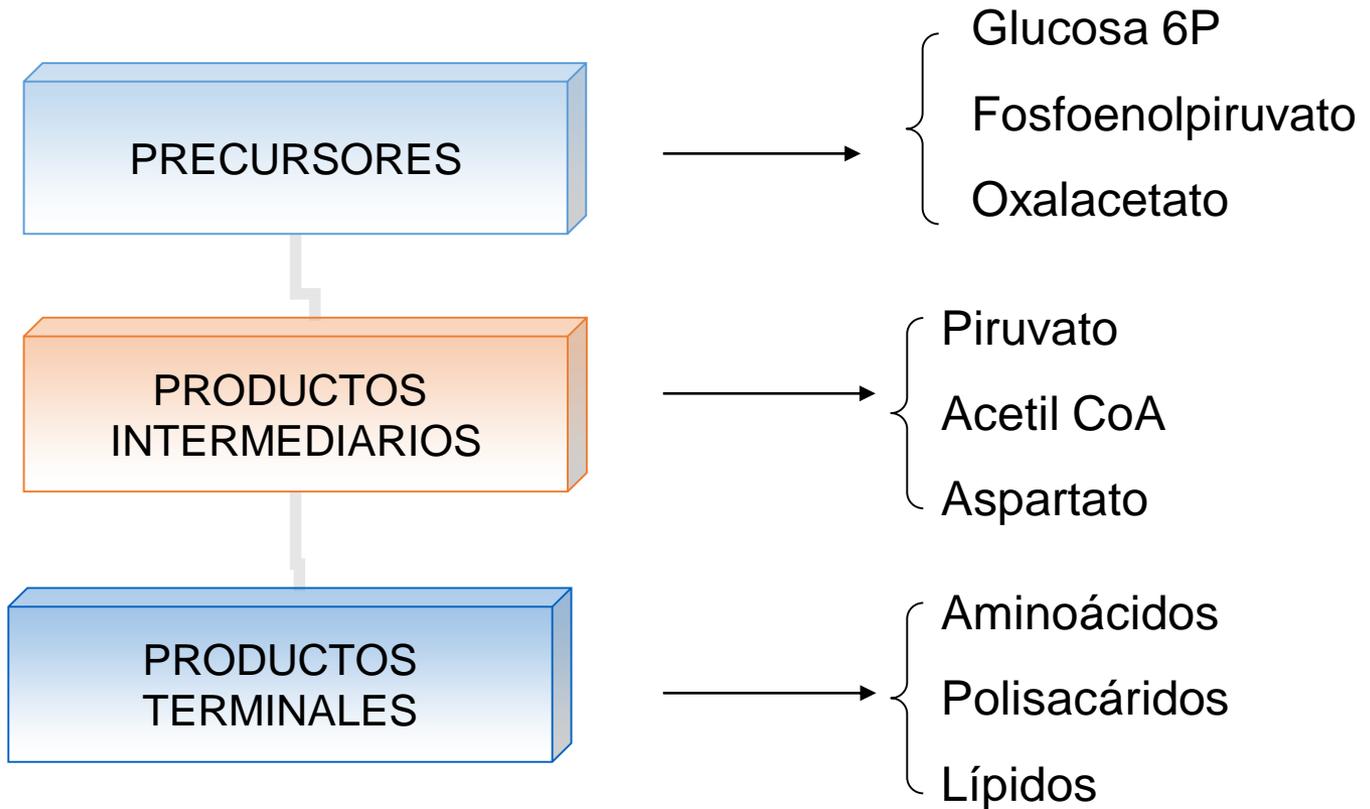
Mycobacterium
tuberculosis

METABOLISMO:

se define como todas las transformaciones químicas que ocurren en una célula.



BIOSINTESIS



VÍAS BIOSINTÉTICAS

- SÍNTESIS DE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR
- ✓ SÍNTESIS DEL PEPTIDOGLUCANO
- ✓ SÍNTESIS DEL LIPOPOLISACÁRIDO
- SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS CAPSULARES EXTRACELULARES
- SÍNTESIS DE GRÁNULOS ALIMENTICIOS DE RESERVA

Metabolismo generador de ATP

- 1. Oxidación biológica:
 - ✓ a) Fermentación: exclusiva de bacterias.
 - ✓ b) Respiración: exclusiva de bacterias y tres géneros de hongos.
- 2. Fotosíntesis.

- Fermentación: proceso metabólico generador de ATP en el compuesto orgánico sirven tanto de donador (oxidación), como de aceptador de electrones (reducción).

Los principales sustratos de fermentación son los carbohidratos aunque puede usarse aminoácidos, purinas, pirimidínicas

- Respiración: proceso metabólico generador de ATP tanto de compuesto orgánico como de inorgánico.

VÍAS O RUTAS CATABÓLICAS COMUNES EN EL METABOLISMO
FERMENTATIVO Y RESPIRATORIO
CON UN METABOLITO INTERMEDIARIO CLAVE:
EL ÁCIDO PIRÚVICO

- Vía de Embden-Meyerhof- Parnas (glucolítica):
- Vía de las pentosas-fosfato:
- Vía de Entner-Doudoroff:
- Ciclo del ácido tricarboxílico:

REGULACION

En la célula operan dos mecanismos diferentes de regulación:

- la **regulación de la síntesis enzimática**
- la **regulación de la actividad enzimática**.

En ambos casos, actúan de mediadores componentes de bajo peso molecular. En ambos mecanismos reguladores actúan proteínas alostéricas.

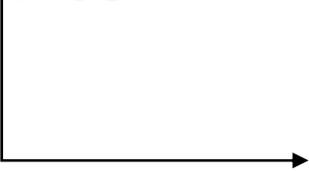
Las **proteínas alostéricas** son aquellas cuyas propiedades cambian si se les unen moléculas específicas denominadas *efectores*.

Existen dos clases de proteínas alostéricas:

_ las enzimas alostéricas cuya actividad se incrementa o se inhibe cuando se combinan con sus efectores,

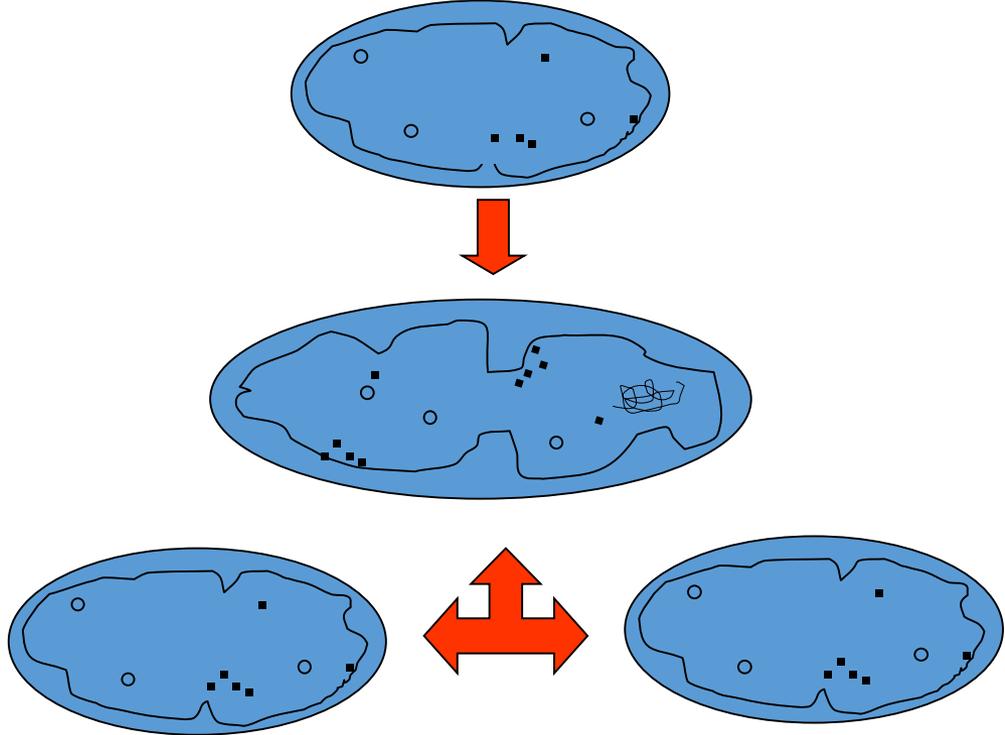
_ las proteínas alostéricas reguladoras que modulan la actividad de enzimas específicas.

Crecimiento



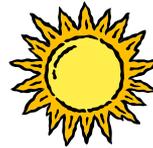
Incremento ordenado de todos los elementos componentes

Fisión binaria o bipartición



Factores ambientales que afectan el crecimiento

**Factores
nutricionales**



**Factores
físicos**



Nutrición

Proceso por el que los seres vivos toman del medio donde habitan las sustancias químicas que necesitan para crecer.

**Requisitos
nutricionales**

- Fuente de carbono
- Fuente de energía
- Fuente de nitrógeno
- Fuente de elementos
- Factores de crecimiento

Factores físicos

- ✓ **pH**
- ✓ **Temperatura**
- ✓ **Concentración de O₂**
- ✓ **Presión osmótica**
- ✓ **Fuerza iónica**
- ✓ **Radiaciones**
- ✓ **Humedad**

pH

acidófilos

alcalinófilos



5,4

7,0

8,5

neutrófilos

Humedad

- Todas las células con un metabolismo activo requieren agua, solo las esporas y organismos formadores de esporas pueden existir en ambiente seco.

Ej. *Clostridium*

Radiaciones

La energía radiante particularmente la luz ultravioleta puede causar mutaciones y eventualmente ocasionar la muerte de los organismos.

Algunos microorganismos tienen pigmento que los protege de las radiaciones y ayudan a prevenir el daño del ADN y otros pueden repararlo.

Clasificación según necesidades de O₂

- Aerobias (M. tuberculosis)**
- Anaerobias (C. tetani)**
- Organismos facultativos (E. coli)**
- Microaerofílicos (Campylobacter)**

Presión osmótica y fuerza iónica

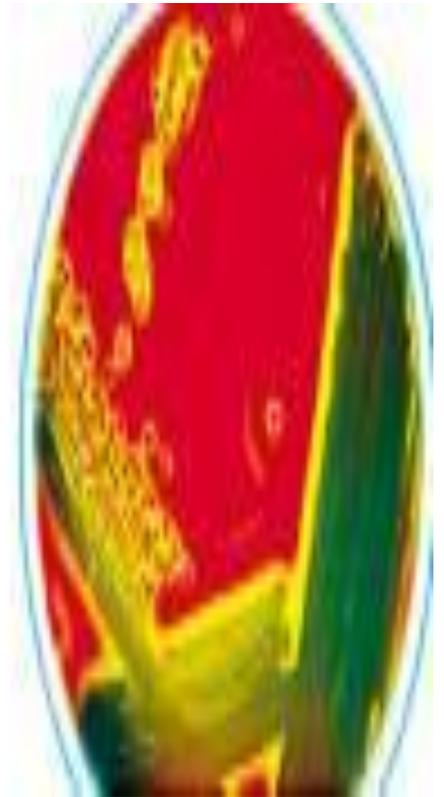
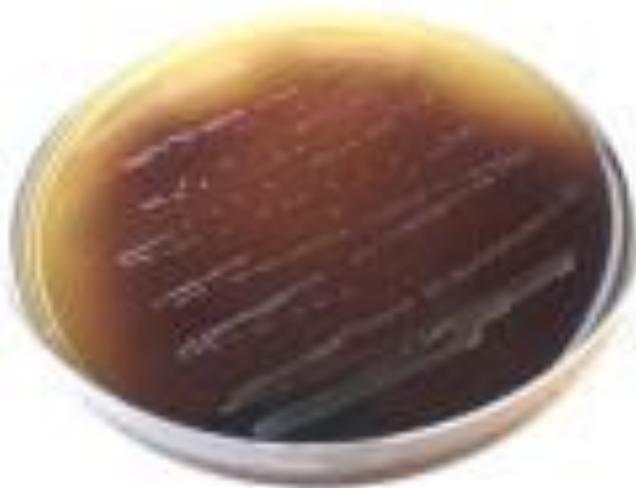
- Halófilos: microorganismos que viven en altas concentraciones de sales.**
- Osmófilos: microorganismos que viven en altas concentraciones de azúcares.**

Cultivo de los microorganismos



Medio de cultivo: conjunto de elementos o sustancias que garantizan a los microorganismos los nutrientes necesarios para su conservación y / o desarrollo. Su finalidad es garantizar el crecimiento del organismo, su identificación y diferenciación dentro de un conjunto de ellos.

Los medios de cultivos en microbiología se utilizan para identificación de microorganismos.



Cultivo: Proceso de propagar los microorganismos, proporcionándole las condiciones ambientales adecuadas

Cultivo puro: Cuando contienen una clase de microorganismo



Cultivo mixto: Cuando contienen mas de una clase de microorganismo



Ingredientes

- **Agua**
- **Bases nutritivas** (peptonas, hidrolizados, digeridos, extractos, infusiones y dializados)
- **Carbohidratos** (azúcares, agua y sus derivados, almidones).
- **Sales minerales orgánicas o no** (fosfato, azufre, cloro, sodio, hierro).
- **Colorantes e indicadores**
- **Factores de crecimientos** (vitaminas, proteínas, factor X y V
- **Otros:** Agar, antimicrobiano, lípidos.

Clasificación

- Según naturaleza:
 - ❖ **Proteicos**
 - ❖ **Sintéticos**
 - ❖ **Intermedios**
- Según crecimiento:
 - **Enriquecimiento** : estimula el crecimiento de los M.O. Ej base caldo selenito, agua peptona alcalina
 - **Electivos**: tolera crecimiento de varias especies y facilita la identificación de colonias. Ej base agar sangre, medio CLED
 - **Selectivos** : inhibe el crecimiento de determinados M .O. Ejemplo Agar desoxicolato, agar citrato, agar SS, agar Mac Conkey, TCBS

Clasificación

- Según finalidad:

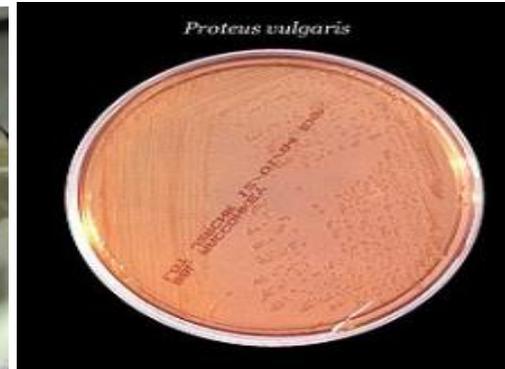
- **Comunes:** favorece el crecimiento de la mayoría de los microorganismos Ej Agar cerebro corazón, agar nutriente, agar sangre, agar mueller hinton
- **Especiales:** permite el crecimiento de determinados microorganismos Ej agar brucella
- **Diferenciales:** permite diferencial los microorganismos Ej Agar citrato, agar hierro kligler, agar urea, agar hierro lisina
- **Selectivos:** Inhibe el crecimiento de unos y favorece el de otros Ej agar SS, medio TCBS, agar mac conkey.

La selección de un medio de cultivo depende de :

- **La naturaleza de la investigación**
 - **Crecimiento de una especie dada.**
 - **Examen microbiológico de materiales naturales.**
 - **Aislamiento de un tipo particular de microorganismos.**

Método de estría a utilizar para la siembra de las pruebas bioquímicas

- Por agotamiento
- Por punción
- Masivo



Método de estría a utilizar para la siembra de las pruebas bioquímicas

Siembra: el acto de colocar el inóculo en el medio de cultivo

Instrumentos de siembra

- hisopo

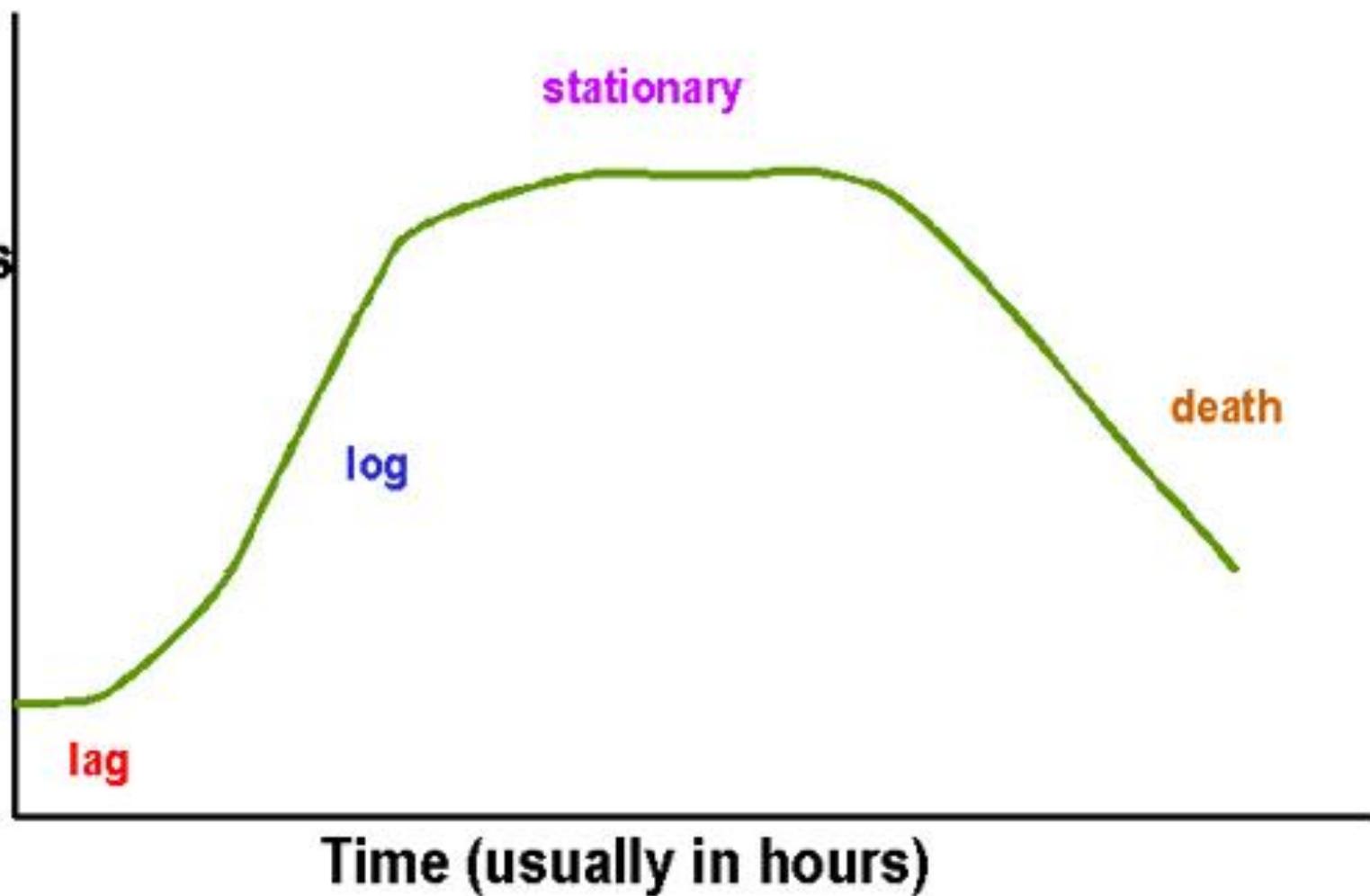
- pipeta

- aguja de platino

- asa de platino

- espátula de Drigalski

Log number
of living cells
or turbidity



The Growth Curve

BIBLIOGRAFÍA

1. Llop A. Microbiología y parasitología Tomo 1 Capítulo4,5,6 y7