
CAPITULO XXXVI

LABORATORIO SOBRE PATOGENOS MICROBIALES: POSTULADOS DE KOCH. TECNICAS DE AISLAMIENTO, INOCULACION Y VERIFICACION DE SINTOMAS EXTERNOS

Patricia Castillo¹
Carmen Rizo¹
Sally Gladstone¹
Iván Cruz²

A. INTRODUCCION

Para verificar el agente etiológico de una enfermedad en un insecto, es necesario establecer una relación causal entre el microorganismo y la enfermedad para que realmente se pueda demostrar su patogenicidad.

Asimismo, los microorganismos o agentes causales deberán someterse a la prueba de los postulados de Koch, los cuales manifiestan que el agente causal deberá ser aislado del hospedero susceptible, producido en medios de cultivo puros e inoculados en hospederos susceptibles y presentar los mismos síntomas del hospedero del cual fue aislado.

Los procesos de aislamiento son variados y dependen del patógeno bajo estudio.

Generalmente consisten en la esterilización de la

superficie del insecto muerto con hipoclorito de sodio al 5% y lavadas continuas con agua destilada y tiosulfato de sodio.

Para el caso de hongos y bacterias los cuerpos esterilizados son abiertos para transferir una porción del tejido afectado a medios de cultivos adecuados, los cuales son incubados a temperaturas entre 25-28°C.

El reaislamiento del patógeno de los medios de cultivo puros es realizada por centrifugación diferencial.

Para el caso de virus, protozoarios y algunos hongos parásitos obligatorios, que no pueden ser cultivados en medios artificiales, el inóculo podrá ser obtenido de insectos enfermos, purificado a través de centrifugaciones diferenciales

1 UNAN, León, Nicaragua.

2 CNPMS/EMBRAPA, Brasil.

(1000-3500 rpm) y el sedimento (inóculo) resuspendido en agua destilada.

La inoculación debe realizarse en hospederos sanos que generalmente deberán ser de la misma especie del insecto del cual fue aislado.

Los síntomas externos generalmente aparecen a la 72 horas después de inoculados, con disminución del apetito, disminución de la

movilidad, disturbios en el hemocelo y desbalance del sistema digestivo. Para el caso del Virus de la Poliedrosis Nuclear y bacterias, el tegumento se vuelve blando y rápidamente se deterioran los tejidos y se rompe el tegumento. Para el caso de hongos, el tegumento se torna polvoriento por el crecimiento de las esporas y toma diferentes coloraciones dependiendo del patógeno.

B. OBJETIVOS

1. Conocer la técnica de aislamiento más usada para virus.

virus y hongos.

2. Familiarizarse con la técnica de inoculación con

3. Diferenciar los síntomas de bacterias, virus y hongos.

C. METODOLOGIA

Se formarán grupos de cuatro personas.

1. AISLAMIENTO DE VPN

a. Tomar larvas de *Spodoptera sunia* muertas por virus, agregar agua destilada y macerar.

b. Filtrar la solución con gasa para evitar restos de tegumento, cápsulas cefálicas y partículas gruesas.

c. Juntar la solución de todos los grupos en tubos de ensayo y centrifugar a 1000 rpm por un minuto.

d. Descartar el sedimento, centrifugar de nuevo el caldo, descartar el sedimento.

e. Centrifugar nuevamente el caldo a 3000 rpm por 10 minutos, descartar el caldo y el

sedimento, que son los cuerpos de inclusión poliedral, suspenderlos en agua destilada.

f. Verificación microscópica del patógeno.

2. INOCULACION DE VPN EN HOSPEDEROS SANOS

a. Tomar 30 copas con dieta meridica y agregar 80 microlitros de la solución viral.

b. Colocar una larva en cada copita, tapar y rotular. La observación de los síntomas debe ser tomada diaria hasta que muera el último ejemplar.

Para confirmar la identidad del agente etiológico este debe ser aislado de nuevo y comparado con el primer aislamiento.