UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANADEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *VALERIANA CHAEROPHYLLOIDES* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Tesis previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

AUTORA:

Liseth Jasmin Cueva Yaguana

DIRECTOR:

Dr. Luis Morocho Yaguana

LOJA – ECUADOR

FEBRERO 2011

TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *VALERIANA CHAEROPHYLLOIDES* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodologías y los resultados obtenidos en la presente investigación, así como las discusiones, conclusiones y recomendaciones, son de responsabilidad absoluta de la autora.

Liseth Jasmin Cueva Yaguana

CERTIFICACIÓN DEL DOCENTE DIRECTOR

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECTOR DE TESIS:

Certifico:

Que el trabajo de Investigación titulado **"Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Valeriana chaerophylloides* por el método de difusión en agar"** elaborado por la Srta. Liseth Jasmin Cueva Yaguana ha sido desarrollada corregido y orientado bajo mi dirección, cumpliendo con los requisitos académicos y reglamentarios para su aprobación; por lo tanto, faculto a la autora para su presentación, disertación y defensa.

Loja, 10 de Febrero del 2011

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana
DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana y a la Carrera de Laboratorio Clínico por permitirme vivir una gran experiencia profesional y humana, brindándome sus enseñanzas para llevar a cabo mis objetivos personales y académicos.

Al **Dr. Luis Morocho** por su invaluable asesoría, por sus enseñanzas, dedicación, paciencia, y motivación para el desarrollo de este proyecto.

A la **Dra. Claudia Cruz** por su dedicación, conocimientos, orientaciones y su manera de trabajar.

A quienes forman parte del Centro de Diagnostico del Área de la Salud Humana por la colaboración desinteresada durante el desarrollo de la presente investigación.

Al Centro de Estudios y Desarrollo de la Amazonía (CEDAMAZ), por su apoyo económico en la realización de esta investigación.

A mis profesores de la Carrera de Laboratorio Clínico por sus enseñanzas y conocimientos brindados en cada una de los módulos.

Finalmente agradezco a todas las personas que de distinta manera hicieron posible la realización de esta labor y han contribuido a que culminase con mi carrera profesional.

GRACIAS A TODOS!!!!

DEDICATORIA

Con gran amor y cariño dedico este trabajo:

A **Dios** por ser mi guía, fuerza y luz de mi vida, darme la sabiduría, el entendimiento para culminar mi mayor reto y la fortaleza para enfrentar cada día.

A mis **Padres**: Rosa y Pepe. Por ser maravillosos conmigo y darme todo su amor, su apoyo, confianza y fortaleza cuando más lo necesitaba y todo ello con una dosis de amor sin pedir nunca nada a cambio y por sus concejos me han hecho la persona que soy ahora. Gracias por lo que han hecho por mi.

A mis **Abuelitos**: Rosa y Manuel. Gracias porque han sido y seguirán siendo mis padres también, porque con su amor, su ejemplo y sus consejos me han hecho una mejor persona.

A mis **Hermanos**: Pepe, David, Juan Pablito. Por ser mis mejores amigos, estar siempre conmigo, darme su cariño y apoyo incondicional y ser mi fuerza para seguir adelante.

A mi **Familia**: Gracias por sus concejos y brindarme su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida.

Y a una persona muy especial que durante mi carrera siempre estuvo a mi lado, dándome su amor, su apoyo, ser muy especial y formar parte de mi vida.

A mis **Amigas:** Del proyecto gracias por el apoyo incondicional Karla, Diana, Sol, Tanny, y a todos aquellos que han estado conmigo brindándome su apoyo. Gracias por su amistad y cariño.

Para ustedes todos los frutos de esta experiencia

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico (70% v/v en agua), obtenido a partir del tallo, hojas y flores de *Valeriana chaerophylloides*. Esta especie no presenta estudios de actividad antimicrobiana, de ahí la importancia de su estudio y además por ser utilizada frecuentemente por sanadores de la Provincia de Zamora Chinchipe, para el tratamiento de afecciones como enfermedad diarreica aguda e infección respiratoria aguda. Para este estudio, del extracto seco se preparó diluciones etanólicas (70% v/v en agua): 1/100, 1/1000, 1/10.000; con dichas diluciones se evaluó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar (Kirby Bauer modificado), frente a 5 cepas estandarizadas: *S.aureus* (ATCC 25923), E. coli (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC 25853), K. pneumoniae (ATCC 13883) y *C. albicans* (ATCC26790). Con la metodología, empleada la cuál fue validada mediante la elaboración de protocolos, *Valeriana chaeropylloides* no presentó actividad antibacteriana, antifúngica. Los resultados obtenidos fueron difundidos a los estudiantes del VII módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana, Universidad Nacional de Loja.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, extracto etanólico, *Valeriana chaeropylloides,* cepas ATCC

SUMMARY

In this study, was evaluated the antimicrobial activity of ethanol extract (70% v/v in water), obtained from the stem, leaves and flowers of *Valeriana chaerophylloides*, this species has no antimicrobial activity studies, hence the importance of study and also because they are often used by healers in the province of Zamora Chinchipe, for the treatment of conditions such as acute diarrheal disease and acute respiratory infection. For this study, from dry extract ethanolic dilutions were prepared (70% v/v in water): 1 / 100, 1 / 1000, 1/10.000, these dilutions were tested for antimicrobial activity by agar diffusion method of Kirby Bauer modified standardized against 5 strains: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC 25853), *K.* pneumoniae (ATCC 13883) and C. albicans (ATCC26790). With the used methodology, the which it was validated by means of the elaboration of protocols, *Valeriana chaeropylloides* presented not antibacterial, antifúngica activity. The obtained results were diffused the students of the VII module of the Career of Clinical Laboratory of the Area of the Human Health, National University of Loja.

Keywords: Antimicrobial activity, ethanol extract, Valeriana chaeropylloides, strains ATCC.

ÍNDICE DE CONTENIDO

TÍTULO…….....I
AUTORÍA…….....II
CERTIFICACIÓN…….....III
AGRADECIMIENTO……..……..IV
DEDICATORIA…….....V
RESUMEN…….…VI
SUMMARY……..VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....VIII

I. INTRODUCCIÓN……...11
II. REVISIÓN LITERARIA……13

1. PLANTAS MEDICINALES
1.1 Definición de plantas medicinales……...…...13
1.2 Uso e importancia de las plantas medicinales…....……..…....13
1.3 Metabolitos secundarios de las plantas medicinales…….....15
1.3.1 Metabolito secundario……15
1.3.2 Importancia de los metabolitos secundarios……..……15
1.3.3 Química de la familia Valerianaceae……....……....15
1.3.4 Metabolitos con propiedades antimicrobianas…….....16
1.4 Especie vegetal……..18
1.4.1 *Valeriana chaerophylloides*……..18
1.4.2 Características generales de la especie…….19
1.4.2.1 Descripción……..19
1.4.2.2 Distribución geográfica……..19
1.4.2.3 Hábitat……..19
1.4.3 Análisis fitoquímico preliminar……....20

2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

2.1 Bacterias…….20

2.1.1 Estructura de las bacterias……...21

2.1.2 Fases de crecimiento bacteriano……..…22

2.2 Hongos……23

2.2.1 Estructura de los hongos……..23

2.3 Microorganismos utilizados en el estudio cepas ATCC……..……24

2.3.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)……..24

2.3.2 *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 25853)……...……25

2.3.3 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883)……25

2.3.4 *Escherichia coli* (ATCC 25922)……26

2.3.5 *Candida albicans* (ATCC 26790)……27

2.4 Pruebas para identificación de Bacterias…….....……..….27

2.4.1 Medios de cultivo……..27

- Factores de desarrollo para una bacteria..……..……27
- Clasificación de los medios de cultivo……..……28
- Descripción de los medios de cultivo utilizados……29

2.4.2 Pruebas bioquímicas para identificar bacterias…….....31

2.4.3 Pruebas para identificar hongos……33

2.5 Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos……..34

2.5.1 Inhibidores de la síntesis de la pared celular……34

2.5.2 Inhibidores de la función de la membrana celular……34

2.5.3 Inhibidores de la síntesis de proteínas……...……34

2.5.4 Inhibidores de la síntesis de DNA y RNA……..34

2.6 Mecanismos de acción de los agentes antifúngicos……35

2.6.1 Inhibidores de la síntesis de membrana celular……...35

2.6.2 Inhibidores de la función de la membrana celular……35

2.6.3 Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleídos……..…35

2.7 Pruebas de susceptibilidad antibacteriana……35
2.7.1 Antibiograma……...36
2.7.2 Antibiótico..……....36
2.7.3 Método empleado…….……36

2.8 Prueba de susceptibilidad con agentes antifúngicos……..37
2.8.1 Antifungigrama……38
2.8.2 Antimicóticos……..….38
2.8.3 Método empleado para Candida albicans……..38

2.9 Concentración mínima inhibitoria……39
2.10 Concentración mínima bactericida…….39

3. CONTROL DE CALIDAD.
3.1 Control de material y equipos…….…….39
3.2 Control de los medios de cultivo…….…...40
3.3 Control de reactivos y discos para pruebas diferenciales……..…40
3.4 Control de discos para antibiograma……..……40
3.5 Control de antisueros y antígenos……..…40
3.6 Control de resultados intralaboratorios e interlaboratorios……..…41

III. METODOLOGÍA……42
3.1 Materiales y métodos ……...……42
3.2 Procedimiento.....43
IV. RESULTADOS……..47
V. DISCUSIÓN……...52
VI. CONCLUSIONES…….54
VII. RECOMENDACIONES…….…55
BIBLIOGRAFÍA
ANEXOS

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, tan solo en el año 2001 la Organización Mundial de la Salud estimó que las enfermedades infecciosas, causadas principalmente por bacterias, hongos y parásitos, fueron responsables de más de 5,7 millones de muertes, la mayor parte de ellas en países en desarrollo y, actualmente, son responsables de 14,9 millones de muertes al año. A esto sumado el hecho de que muchos de los microorganismos causantes de enfermedades comunes y que pueden ser tratados fácilmente, han adquirido gran resistencia; debido principalmente al uso indiscriminado de antibióticos (1).

En varios países de América Latina las enfermedades infecciosas son causa de alta mortalidad, casi la mitad (47 %) de las muertes en niños menores de 5 años es atribuida a la neumonía, diarrea, tuberculosis. Debido a que dichos microorganismos responsables han desarrollado resistencia a consecuencia de varios factores a más del uso indiscriminado de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, otros elementos que influyen son las altas posibilidades de transmisión o contagio y el estado inmunocomprometidos de los pacientes que los hace susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas (2) (3).

En nuestro país los datos no son muy alentadores, la resistencia bacteriana y fúngica ha ido incrementándose gradualmente hasta convertirse en un grave problema de Salud Pública; entre los principales agentes responsables de esta escalada se encuentran *Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Candida. albicans*, principalmente de origen hospitalario y comunitario (4).

Frente a esta importante problemática mundial, numerosas son las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos biológicos a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos para la evaluación de actividad antibacteriana y antifúngica en extractos de plantas medicinales (5). Es por ello que la importancia de los

productos naturales es enorme debido a que poseen poco o nulo efecto tóxico y además de ser estructuralmente mucho más complejos que los sintéticos, actúan de manera combinada resultando más difícil para los gérmenes patógenos desarrollar resistencia frente a estas drogas (6) (7).

La especie *Valeriana chaerophylloides* es una planta que se utiliza ampliamente en la medicina tradicional por los sanadores de la provincia de Zamora Chinchipe para el tratamiento de enfermedad diarreica aguda e infecciones respiratorias agudas, pero su aplicación sin un aval científico presenta un riesgo para la salud humana.

Por esta razón se propuso evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de extracto etanólico por el método de difusión en agar, obteniendo como resultados que *Valeriana chaerophylloides* en las diluciones empleadas del extracto etanólico no presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas estandarizadas ATCC[1].

[1] ATCC: Centro de recurso biológico particular, cuya misión se encuentra en la adquisición, autentificación producción, preservación, desarrollo y distribución de microorganismos de referencia usuales.

II. REVISIÓN LITERARIA

1. PLANTAS MEDICINALES

1.1 Definición de plantas medicinales.

Llámase planta medicinal toda planta que contiene uno o varios principios activos en uno o más de sus órganos (hojas, semillas, flores, frutos, cortezas y raíces), capaces de evitar, aliviar o curar enfermedades (8).

1.2 Uso e importancia de las plantas medicinales

La importancia de las plantas medicinales es cada vez más reconocida, no solamente como un recurso vital para la salud y el bienestar humano, sino por su riqueza cultural y biológica, sin embargo muchas de ellas se encuentran amenazadas de extinción por la sobre explotación y las prácticas no sostenibles que son factores adicionales a otros ya conocidos que ejercen aún mayor presión como son: deforestación, destrucción del hábitat, contaminación, e introducción de especies exóticas y cambios climáticos.

Por ello, es importante recalcar que las plantas han existido desde hace mucho tiempo pero su poder curativo se viene trabajando desde la antigüedad, desde nuestros antepasados por que inclusive ellos son quienes han permitido que estas técnicas se mantengan presentes hoy en nosotros, para todos es un beneficio que estas plantas existan pero mejor aun que hayamos podido encontrarles un uso que servirán en muchos momentos que se necesiten.

Los usos de las plantas medicinales se realiza por la producción de sustancias consideradas como productos vegetales secundarios, entre estos se encuentran los principios activos, que son sustancias dotadas de actividad farmacológica, que ocasionan efectos fisiológicos en el hombre y en los animales. Estos compuestos pertenecen a los alcaloides, glucósidos, aceites esenciales (9), etc.

Según algunos autores las plantas útiles del Ecuador se las utilizan en el tratamiento de algunas patologías como:

- Infecciones.

- Heridas/lesiones
- Inflamaciones
- Desórdenes del sistema digestivo
- Desórdenes de la piel/tejidos subcutáneos
- Desórdenes del sistema respiratorio, urogenital, nervioso, circulatorio, etc (10).

Otras formas de uso de las plantas medicinales son: por maceración, maceración-decocción, infusión, decocción, extractos, tintura, jarabe, jugo fresco, polvo.

Existen diferentes formas de usar a las plantas medicinales entre las que se destacan las siguientes:

- **PLANTA FRESCA**: Se puede extraer su zumo o jugo.
- **PLANTA EN POLVO:** Se obtiene triturando la planta seca.
- **EXTRACTO:** Se trata del producto que se obtiene como resultado de la evaporación de una maceración en agua o en una solución alcohólica, se obtienen extractos fluidos, espesos o secos.
- **JUGO:** Se obtiene exprimiendo la planta fresca.
- **MACERACION:** Se prepara dejando reposar la planta, durante unas horas en agua fría o fresca.
- **INFUSIÓN:** Este es procedimiento más común y se prepara echando agua hirviendo sobre la planta a utilizar
- **DECOCCIÓN:** La planta se hierve a fuego lento, de 20 a 30 minutos, y luego se deja reposar.
- **TINTURA**: Se obtiene dejando durante unos días la planta, fresca o seca, en maceración con alcohol destilado (aguardiente).
- **EMPLASTOS Y CATAPLASMAS**: Consisten en la aplicación de hierbas frescas, cocidas, secas o en polvo, que se aplican directamente sobre el área afectada por una dolencia.
- **CREMA**: Se trata de preparar una emulsión de aceite o grasa con agua (8).

1.3 Metabolitos secundarios de las plantas medicinales:

1.3.1 Metabolito secundario.

Son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales. Los metabolitos son moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con roles muy importantes en el reino vegetal, pueden suponer una ventaja competitiva considerable (11).

1.3.2 Importancia de los metabolitos secundarios.

A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre (11).

1.3.3 Química de la familia *Valerianaceae*.

- ✓ **Terpenoides.**

Son derivados de la vía del mevalonato y consisten en unidades de 5 carbonos con múltiples ramificaciones. Los monoterpenos y los sesquiterpenos, con comparativamente poca oxigenación y cadenas substituidas, se encuentran frecuentemente en plantas como mezclas complejas conocidas como aceites volátiles. Se almacenan en órganos especializados y juegan un papel importante en su estrategia de supervivencia (12).

- ✓ **Terpenoides no volátiles.**

Fueron aislados por primera vez en 1966 de *Valeriana wallichi* DC, y atrajeron la atención como posibles responsables de la actividad sedante de la planta (dada la frecuente observación de la discrepancia entre la cantidad de aceites volátiles presentes en un extracto y su efecto sedante). El esqueleto terpénico de los valepotriatos es esencialmente el mismo que el de los monoterpenos glucósidos conocidos como iridoides, los cuales son muy comunes en las dicotiledóneas, pero que, en los valepotriatos en particular, presenta la característica de carecer de residuos de azúcar y de presentar cadenas laterales de esteres (12).

- ✓ **Alcaloides y fenilpropanoides**

Otros compuestos presentes en la familia Valerianaceae incluyen compuestos nitrogenados (alcaloides y aminoácidos) y fenilpropanoides (constituyentes del aceite esencial, lignanos, flavonoides y compuestos relacionados) (6).

Alcaloides. Diversos alcaloides se encuentran presentes en pequeñas cantidades en *Valeriana*. Estos se encuentran biogenéticamente relacionados con los terpenoides y las similitudes en el esqueleto de carbón son evidentes. Se mencionan valeclorine, valtroxal, valerianina, actinidina y otros (12).

Fenilpropanoides. Constituyen importantes metabolitos secundarios de las plantas con flores. En *Valeriana,* se habían encontrado 4 clases de fenilpropanoides como constituyentes relativamente menores y, hasta hace algunos años, no se había demostrado que jugaran un papel significativo en alguno de los efectos farmacológicos de extracto (12).

Glucósidos flavonoides*.* En 2003, Marder y colaboradores reportaron la presencia de la 6-metilapigenina y la hesperidina -glucósidos flavonoides-, en valeriana; estos compuestos tendrían actividad depresora sobre el SNC (13).

1.3.4 Metabolitos que presentan propiedades antimicrobianas:

- **Cumarinas.-** Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (14).
- **Alcaloides.-** El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (14).
- **Flavonas.-** Su actividad frente a los microorganismos pobladores se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas (14).
- **Isoflavonoides.-** Pueden ser definidas como compuestas antimicrobianas de pequeño peso molecular**.** Varían entre especies y

también dependiendo la edad y el ambiente en el que se encuentra la planta. Inhiben la germinación de esporas de hongos y causan daño a los sistemas de membrana**.** Algunas semillas y resinas de árboles son particularmente ricas en flavonoides antimicrobianos (11).

- **Quinonas:** Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofilicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteínas y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (14).
- **Tanoides o Taninos:** Son sustancias de origen vegetal natural, no nitrogenadas de estructura prolifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias (14)
- **Esteroides y Triterpeno:** Los compuestos esteroidales pueden interferir determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química. Tienen acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. (15).

1.4 Especie vegetal.

1.4.1 *Valeriana chaerophylloides*

Valeriana chaerophylloides
Fotografía: Dr. Luis Morocho

Taxonomía

- **Dominio:** Eukarya
- **Reino:** Plantae
- **Subreino:** Viridaeplantae
- **Filo:** Tracheophyta
- **Subfilo:** Euphyllophytina
- **Superclase:** Radiatopses
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Subclase:** Cornidae.
- **Superorden:** Dipsacanae.
- **Orden:** Dipsacales
- **Familia:** Valerianaceae
- **Tribu:** Valerianeae
- **Género:** *Valeriana*
- **Nombre:** chaerophylloides
- **Nombre botánico***: Valeriana chaerophylloides*

Sinónimos inequívocas

- *Astrephia chaerophylloides*

- *Boerhavia chaerophylloides*
- *Fedia chaerophylloides* (16).

1.4.2 Características generales de la especie

1.4.2.1 Descripción:

Familia Valerianaceae: *Valeriana* es el género mayor de *Valerianaceae*, una familia representada en todas las temperaturas y áreas subtropicales del mundo. *Valerianaceae* fue descrita por Bentham y Hooker en el año 1954 (12). Es una hierba con hojas opuestas y sin estípulas. Las flores se disponen en corimbos o panículas terminales y son, usualmente, pequeñas y numerosas, color blanco o rosa. El cáliz se encuentra por debajo del ovario y forma un pequeño, a veces dentado, borde que es poco notable en el momento de la floración. La corola es usualmente monopétala, tubular en la base, con cinco lóbulos extendidos. Siempre hay menos estambres que lóbulos en la corola. El fruto es pequeño, seco y de aspecto de semilla, con una única semilla suspendida del extremo (12) (16).

1.4.2.2 Distribución geográfica.

Una familia de 13 géneros y más de 400 especies, principalmente confinadas en las regiones templadas, con la excepción de Australia y de los Andes en América Sur. Representada en Pakistán por 3 géneros y especies de alrededor de 22.

Un género de más de 200 especies. Ampliamente distribuida en las regiones templadas de Asia, África, Europa y Norte y Sur América. Representada aquí por especies de 9 ó 10. A menudo es difícil identificar las valerianas sin las hojas basales (que pueden arrojar temprano), subterráneos y la fructificación de piezas (16).

1.4.2.3 Hábitat

Por lo general se encuentra a una altitud de 0 a 4,653 metros (0 a 15.266 pies) (16).

1.4.3 Análisis fitoquímico preliminar:

Tabla N.- 1

Ensayo	Resultado
Alcaloides **Dragendoor**	-
Alcaloides **Mayer**	+
Triterpenos y esteroides	+
Quinonas	-
Flavonoides	-
Lactonas	+
Saponinas	+
Fenoles y/o Taninos	+
Azucares reductores	+
Aminoácidos	+
Recinas	+
Antiocianinas	-
Catequinas	-

[2]**Leyenda: Reacción negativa (-); Reacción débil (+); Reacción media (++); Reacción intensa (+++)**

2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

2.1 Bacterias:

Son microorganismos **procariotas**, es decir microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproduce por división sexual.

La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas:

- Una pared celular **grampositiva** con una gruesa capa de peptidoglucano
- Una pared celular **gramnegativa** con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa.

Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza:

- Su tamaño (de 1 a 20µm o más),
- Su forma (esferas, bastoncillos, espirales).

[2] **Fuente:** Resultados de los análisis del screening preliminar fitoquímico obtenido en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de Loja

- Su disposición espacial (células aisladas, en cadenas y formando cúmulos).
- Su clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas.

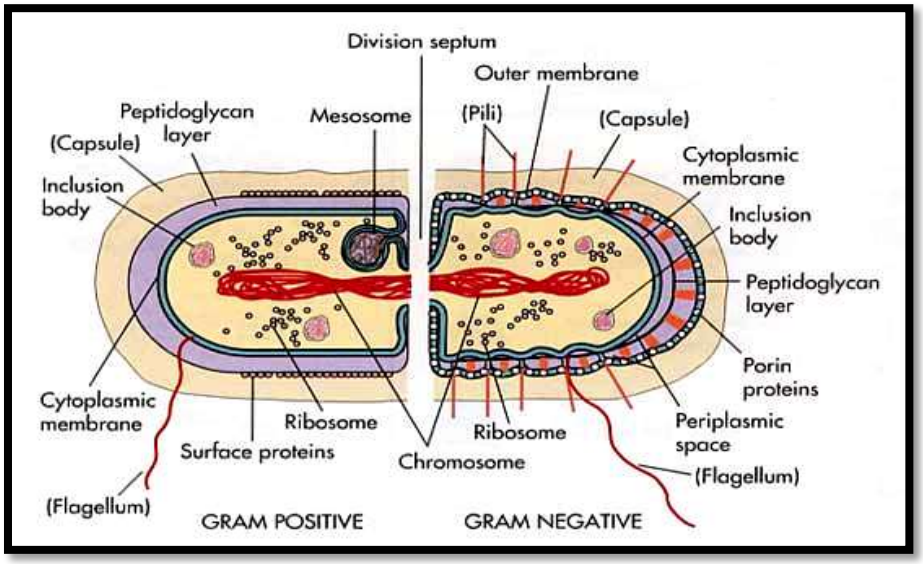
El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente. También se encuentran bacterias en el ambiente como el aire, el agua y los alimentos**;** aunque muchas de ellas son relativamente avirulentas, otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles (17).

2.1.1 Estructura de las bacterias.

Como en cualquier procarionte, la célula bacteriana puede estudiarse desde el punto de vista anatómico para conocer sus estructuras. Tenemos:

- Cápsula.
- Pared.
- Mesosomas.
- Espacio periplásmico.
- Inclusiones.
- Vacuolas.
- Flagelos.
- Fimbria.
- Citoplasma.
- Esporulación.
- Nuceoide.
- Plásmidos.
- Ribosomas.

Gráfico:



Fuente: biologiamedica.blogspot.com/2010/09/bacterias...

2.1.2 Fases del crecimiento bacteriano.

a. **Fase de Adaptación o Crecimiento Lento:** Es la etapa inicial del crecimiento de una población bacteriana en la que no se observa aumento en el número de bacterias. Por esto se le ha llamado de crecimiento lento, sin embargo, en esta etapa hay una acelerada actividad metabólica con formación de enzimas y metabolitos intermedios que se acumulan hasta alcanzar concentraciones que permitan el reinicio del crecimiento.

b. **Fase Logarítmica o Crecimiento Exponencial**: La bacteria está perfectamente adaptada al medio y se reproduce con la máxima actividad. Comienzan a manifestarse en la bacteria características visibles como el color y su actividad metabólica es muy activa. Es en esta fase en la que podemos calcular el tiempo de generación.

c. **Fase Estacionaria Máxima**: En esta fase el número de bacterias viables y el número de bacterias inactivadas se equilibra por un corto tiempo. Esto se debe a que los nutrientes se están agotando, se acumulan

productos tóxicos de desecho de metabolismo y el pH vira hacia la acidez, todo lo cual genera un ambiente nocivo para la vida bacteriana y sólo las bacterias más resistentes a estos factores logran sobrevivir y multiplicarse.

d. **Fase de Declinación:** Se la conoce también como fase de muerte, debido a que un gran número de bacterias muere en relación con las que sobreviven, es decir, que solamente las más resistentes pueden multiplicarse en las condiciones que han generado en está etapa, como, son: falta de nutrientes, concentración de productos tóxicos del metabolismo y el viraje del pH (18).

2.2 Hongos:

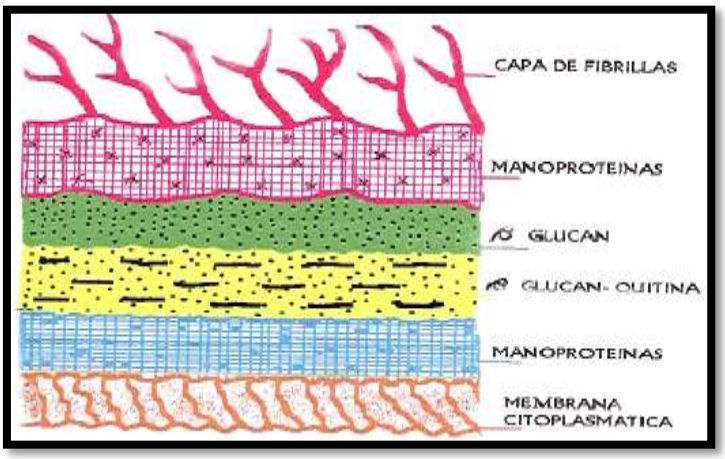
Son microorganismos **eucariotas** que poseen un núcleo bien definido, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, membrana nuclear y una membrana celular que contiene lípidos, glicoproteínas y esteroles (17). Los hongos pueden existir en una forma unicelular **(levadura)** poseen forma redonda o oval miden de 3 y 30µm, capaz de replicarse de manera asexual mediante gemación, que es un proceso de división binaria mitótica, en el que a partir de una célula madre se forman protusiones protoplásmicas, o en forma pluricelular están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, tabicándose de un modo más o menos completo, formando largos filamentos denominados hifas que con frecuencia se ramifican **(mohos)**, al crecer forman matas de filamentos entrelazadas, capaz de replicarse de forma tanto asexual como sexual (19). La mayor parte de los hongos existen en forma de levadura o bien en forma de moho.

2.2.1 Estructura de los hongos.

Se encuentran constituidos por tubos filamentosos llamados hifas que presentan una pared celular con gran plasticidad y responsable de la protección de la célula. La pared celular se compone básicamente de polisacáridos (quitina, glucano) y proteínas.

Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida. La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis (20).

Gráfico:



Fuente: www.monografias.com

2.3 Microorganismos utilizados en el estudio, cepas ATCC.

ATCC (Colección Americana de Cultivo Tipo).- Es un centro de recurso biológico particular, cuya misión se concentra en la adquisición, la autentificación, la producción, preservación, desarrollo y distribución de microorganismos de referencia usuales, líneas de células y otros materiales para investigación en las ciencias naturales. Los estándares biológicos de la ATCC son vitales para garantizar la confiabilidad de los resultados de investigación, reproducibilidad de la experimentación y el método científico (21). Los microorganismos ensayados en el presente estudio fueron.

2.3.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Morfología.- Son cocos grampositivos, se encuentran aislados, en pares, tétradas, cadenas cortas y racimos irregulares con aspecto de uvas, miden 0.5-1.5µm, son inmóviles, no esporulados y no encapsulados, capaces de respiración aeróbica y anaeróbica.

Cultivo.- Crecen con facilidad sobre casi todos los medios bacteriológicos en condiciones aeróbicas de 18 a 24horas a 34-37ºC, las **colonias** son redondas, lisas, prominente, brillantes de color gris o amarillo dorado intenso; puede producir hemólisis de grado variable. Las cepas de S. aureus producen una zona amarilla (ácida) debido a la acidificación del medio manitol. Son catalasa positiva, coagulasa positiva (22).

2.3.2 *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 25853)

La P. aeruginosa se distribuye extensamente en la naturaleza (suelo y agua) y es común en ambientes húmedos de los hospitales.

Morfología.- Son bacilos rectos o ligeramente curvos, gramnegativo, aerobio obligado, miden 0.6-2µm y se le encuentra como bacteria única, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas, poseen flagelos monótricos polares o un mechón de dos a tres flagelos, posee fimbrias y pilis y forman una microcápsula.

Cultivo.- P. aeruginosa, crece fácilmente en muchos medios de cultivo de 24 a 42h a 37ºC, forma **colonias,** redondas, lisas, rugosas, mucoides, gelatinosas y enanas de color verde fluorescente. Con frecuencia produce, a veces un olor que semeja al de uvas fermentadas, por la producción de trimetilaminas. Es la única especie que segrega **piocianina,** que es de color azul, y **pioverdina o fluoresceína**, que va de amarillo verdoso a amarillo café.

La combinación de pioverdinas amarillas y piocianimas azules dan como resultado el color verde asociado con la mayoría de las cepas de P. aeruginosa sobre agares sin colorantes, a menudo confiere a los medios de cultivo un color verdoso. Son oxidasa positiva, catalasa positiva, TSI: no fermentan lactosa, oxidan glucosa, SIM: Positivo, Lisina: Negativo (18) (22).

2.3.3 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883)

Forma parte de la flora comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas.

Morfología: Son bacilos gramnegativos de 2-3µm, no flagelados, por lo tanto son inmóviles, no esporulados, forman capsulas grandes y regulares, pueden crecer de forma anaerobia y aerobia.

Sólo tiene antígenos “O” y “K” (18).

Cultivo.- Crece con facilidad en el medio de cultivo MacConkey de 18 a 24horas a 37ºC, forma **colonias** grandes, lisas, circulares, convexas, con bordes bien definidos y muy muciodes,

Dan positivas para las pruebas de la lisina descarboxilasa, citrato, catalasa, úrea, producen gas y no fermentan lactosa, oxidan glucosa, negativo para fenilalanina desaminasa, SH2 y indol (22).

2.3.4 *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Es la bacteria más encontrada en las materias fecales del hombre y de especies de animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño.

Morfología.- Son bacilos gramnegativos de 2-3µm, tiene movilidad por flagelos perítricos, poseen fimbrias y pilis, muchas cepas producen una pequeña microcápsula, y muy pocas elaboran macrocápsula, no fabrican esporas y pueden crecer de forma anaerobia y aerobia facultativa.

Encontramos antígenos somáticos “O”, antígenos flagelares “H” y antígenos capsulares “K”, que combinados conforman los diferentes serotipos de *E. coli* (18).

Cultivo.- Crece con facilidad en el medio de cultivo MacConkey (que distingue las colonias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras) de 18 a 24horas a 37ºC, formando **colonias** planas, lisas, circulares, convexas, secas, rosadas con un área circundante de color rosa más oscuro compuesto por sales biliares precipitadas.

En las pruebas bioquímicas es positiva para indol, descarboxilasa de lisina, fermentadoras de lactosa y glucosa SIM positivo y citrato negativo (22).

2.3.5 *Candida albicans* (ATCC 26790)

Varias especies del género Candida pueden producir candidiasis. Son miembros de la flora normal de la piel, las mucosas y del aparato gastrointestinal. Las especies de Candida colonizan las superficies mucosas de todos los humanos durante o poco después del nacimiento, y el riesgo de infección endógena siempre está presente. La candidiasis es la micosis sistémica más común, y los agentes más comunes son C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata, C. guilliermondii y C. dubliniensis.

Morfología e identificación.- Todas las especies de Candida se desarrollan como células levaduriformes ovaladas (3 a 5µm), a partir de una célula madre se forman protusiones protoplásmicas o yemas (llamados blastoconidias). También forman seudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas, pinzadas o constreñidas en los tabiques entre las células. La C. albicans es dimórfica; además de las levaduras y las seudohifas, también puede producir hifas verdaderas (19).

Cultivo.- Se puede utilizar el medio de Agar sabouraud, al cabo de 24 a 48horas a 37ºC se pueden observar las **colonias** de color blanco o crema, consistencia opaca, elevadas, lisis, brillantes o mates, olor a levadura de diámetro 1 a 3mm. El aspecto de la colonia tiene gran interés, ya que es característico de cada especie los distintos medios y a partir del color, olor y consistencia nos facilitará su posterior identificación (23).

2.4 Pruebas para identificación de Bacterias.

2.4.1 Medios de cultivo

Para estudiar las reacciones metabólicas y fisiológicas de las bacterias es necesario cultivarlas en **medios de cultivo**, son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable todos los elementos necesarios para el crecimiento y multiplicación de los microorganismos (24).

- **Factores de desarrollo para una bacteria.**

El desarrollo de una bacteria en un medio de cultivo, depende de una serie de factores, los más destacables son:

a) **La Composición.-** Los medios de cultivo deben incluir los elementos indispensables para la vida bacteriana, es decir:

    - Fuente de nitrógeno y carbono.
    - Minerales como fósforo, azufre, calcio, magnesio y hierro.
    - Factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidínicas.
    - Factores estimulantes como los hidratos de carbono o la sangre.

b) **El pH.-** Las bacterias se desarrollan a un pH próximo a la neutralidad (6,8-7,6), aunque algunas exigen un pH específico distinto.

c) **La Presión Osmótica.**- Debido a la composición de la pared celular bacteriana, los gérmenes se adaptan bien a las variaciones de la presión osmótica; sin embargo, in vitro, los medios de cultivo se preparan en condiciones de isotonía.

d) **El Potencial Redox.**- Está en relación con el tipo respiratorio de cada bacteria, que puede ser anaerobia estricta, aerobia y anaerobia facultativa, aerobia estricta y microaerófila.

e) **La Hidratación.**- La presencia de agua, es indispensable para el crecimiento bacteriano, por lo que deberá estar presente en los medios de cultivo en cantidad suficiente.

f) **La Temperatura.**- Es otro dato importante a tener en cuenta para el cultivo de os gérmenes, en el caso de bacterias de interés médico, los cultivos se incuban a 35-37ºC.

g) **La Atmósfera.**- Algunas bacterias, especialmente algunas aerobias y facultativas, necesitan para su óptimo desarrollo de la presencia de ciertos ambientes gaseosos. El más utilizado es el anhídrido carbónico en proporciones que varían del 3 al 10% (24).

- **Clasificación de los medios de cultivo.**

Los medios de cultivo se clasifican en:

✓ **Medios selectivos:**

Se utilizan para inhibir por completo el crecimiento de bacterias distintas de la que se quiere aislar y que están presentes en la muestra. Ej. Agar MacConkey, Agar Chapman manitol, Agar Cetrimida.

✓ **Medios de enriquecimiento:**

Favorecen el crecimiento de algún tipo de bacterias que se encuentra en forma minoritaria en una mezcla de varios grupos bacterianos. Ej. Agar Sangre, Agar Mueller Hinton.

✓ **Medios de diferenciación:**

Se utilizan para poner de manifiesto a las bacterias que dan positiva alguna propiedad bioquímica y que están presentes en una mezcla**.** Ej. Agar MacConkey, Agar Chapman manitol.

✓ **Medios de identificación:**

Se utilizan para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un determinado sustrato. Ej. Agar Bigg.

✓ **Medios de multiplicación:**

Son aquellos que posen una composición determinada y óptima para el grupo de bacterias a las que va destinado, y que permitirá un máximo de aumento celular bacteriana en un mínimo de tiempo. Utilizados para la preparación de vacunas, antibióticos.

✓ **Medios de conservación:**

Son aquellos cuya composición favorece el mantenimiento de los microorganismos que en el se siembran y que posteriormente se incuban a +2 - +4ºC. Ej. Medio de Stuart, medio de Amies etc (24).

- **Descripción de los medios de cultivo utilizados.**

✓ **Agar sangre**

Es un medio utilizado para el cultivo de microorganismos exigentes, adecuado para la determinación de reacciones hemolíticas típicas.

Una vez preparado y esterilizado el medio base elegido, se deja enfriar hasta una temperatura de 45 – 50ºC y se le añade, en condiciones asépticas. Del 5 al 10 por ciento de sangre estéril de caballo, conejo o carnero. Seguidamente se homogeniza y se reparte en placas

✓ **Agar Chapman manitol**

Es un medio utilizado para el aislamiento de Staphylococcus, basado en la tolerancia que poseen a una alta concentración de cloruro sódico. Sirve también como medio diferencial de cepas fermentadoras del manitol. Staphylococcus aureus en condiciones anaerobias es la única especie del género que produce la fermentación.

✓ **Agar MacConkey**

Es un medio utilizado para el cultivo de Enterobacteriaceae.

Los organismos fermentadores de la lactosa producen colonias rosas o rojas que pueden estar rodeadas de una zona de bilis precipitada. Los organismos no fermentadores de la lactosa, forman colonias incoloras y transparentes. La flora grampositiva es inhibida por el cristal violeta.

✓ **Agar Mueller Hinton**

Es un medio utilizado como medio de elección para realizar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

✓ **Agar Sabouraud**

Es un medio utilizado para el cultivo de levaduras y hongos, al que se ha adicionado cloranfenicol para impedir el desarrollo de la flora acompañante.

✓ **Agar cetrimida**

Es un medio utilizado para el aislamiento de Pseudomonas que favorece la pigmentación de Pseudomonas aeruginosa.

- ✓ **Caldo triptona soya**

Medio altamente nutritivo para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes y recomendado para los ensayos de esterilidad y para uso generalmente de laboratorio.

- ✓ **Caldo cerebro corazón**

El caldo cerebro corazón (BHI) es un medio líquido, especialmente adaptado para el crecimiento de microorganismos exigentes (24).

2.4.2 Pruebas bioquímicas para identificar bacterias

- ✓ **Prueba de la catalasa**

La enzima catalasa es propia de la mayor parte de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen citocromos, siendo la excepción el streptococo. La función de esta enzima es descomponer el peróxido de hidrógeno, desprendiendo oxígeno libre (24).

- ✓ **Prueba de la coagulasa**

Esta prueba, demuestra la presencia de la enzima Cuagulasa, que poseen algunos staphylococos. Estos gérmenes, incluidos en la especie Staphilococos aureus son considerados patógenos. Actualmente se sabe que hay Staphylococos cuagulasa negativo, virulentos y productores de cuadros clínicos (24).

- ✓ **Prueba de la oxidasa**

Esta prueba pone de manifiesto la presencia de la enzima oxidasa en determinados microorganismos. La oxidasa o citocromo-oxidasa es una enzima que cede electrones de un sustrato, al oxigeno, en el tren de trasporte electrónico (24).

- ✓ **Prueba del citrato**

Determina la capacidad que poseen algunos microorganismos de utilizar como única fuente de carbono el citrato, produciendo alcalinidad.

- ✓ **Prueba de movilidad**

La movilidad es una característica importante al hacer una determinación bacteriana, pues indirectamente señala que el microorganismo posee flagelos, rasgo taxonómico que es difícil poner de manifiesto por otros métodos, incluidos los tintoriales (24).

- ✓ **Prueba con agar triple azúcar hierro (T.S.I)**

Es un medio utilizado preferentemente para la diferenciación de *Enterobacteriaceae*. En él se puede determinar las fermentaciones de los hidratos de carbono, la producción de gas y ácido sulfhídrico.

El medio TSI contiene: glucosa (0,1 por 100), lactosa (1 por 100) y sacarosa (1 por 100) (24).

- ✓ **Prueba de la fenilalanina desaminasa**

Se basa en la capacidad que poseen algunas bacterias de desaminar la fenilalanina produciendo ácido fenilpirúvico (24).

- ✓ **Prueba del indol**

La prueba de Indol determina la capacidad de las bacterias de degradar el triptófano dando indol. Algunas bacterias gracias a la enzima triptofanasa hidrolizan el aminoácido dando indol, ácido pirúvico y amoniaco. La presencia de indol se detecta observando la formación de una coloración rosa roja en el medio al añadir para-dimetil-aminobenzaldehído (Reactivo de Kovacs) (24).

- ✓ **Prueba de ácido sulfhídrico**

Algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los aminoácidos que lo contengan, produciendo ácido sulfhídrico. La enzima responsable de esta actividad es la cistinasa (24).

- ✓ **Agar lisina hierro**

Esta prueba se usa para determinar si un bacilo gramnegativo descarboxila o desamina la lisina y forma ácido sulfhídrico (H2S). El agar lisina hierro (LIA) contiene lisina, peptonas, una pequeña cantidad de glucosa, citrato amónico férrico y tiosulfato de sodio. Cuando la glucosa se fermenta, el fondo del medio se acidifica (amarillo). Si el microorganismo produce lisina descarboxilasa, se

forma cadaverina. La cadaverina neutraliza los ácidos orgánicos formados por la fermentación de la glucosa, y el fondo del medio vuelve al estado alcalino (púrpura). Si no se produce descarboxilasa, el fondo permanece ácido (amarillo). Si hay desaminación oxidativa de lisina, se forma un compuesto que, en presencia de citrato amónico férrico y una coenzima, flavina mononucleótido, produce un color borgoña en el pico de flauta. Si la desaminación no tiene lugar, el pico de flauta del LIA conserva su color púrpura.

- ✓ **Prueba de la úrea**

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniaco por la acción de la enzima ureasa produciendo un cambio de color rojo en el medio.

La hidrólisis de la úrea es catalizada por la ureasa, para dar dos moléculas de amoniaco. La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos (24).

2.4.3 Pruebas para identificar hongos

- ✓ **Prueba del tubo de germinación (test de filamentación)**

Es una prueba de gran valor para la identificación rápida y presuntiva de *Candida albicans*, que con *Candida stellatoidea* son las únicas levaduras del género *Candida*, capaces de producir tubos germinales.

La prueba se considera positiva cuando se observa la formación en las células de cortos filamentos hifales en forma de dedo de guante, llamados tubos de germinación. Estos tubos son prolongación de las células, sin separación ni membrana visible (23).

- ✓ **Auxonograma**

Los levaduriformes se identifican fundamentalmente mediante pruebas metabólicas semejantes a las bacteriológicas. Las pruebas metabólicas más utilizadas son la fermentación de los hidratos de carbono se detectan en medio líquido con campana invertida de Durham, debido a la producción de gas (CO2) por la capacidad de la levadura de atacar los azucares por vía fermentativa.

Las pruebas de asimilación estudian la capacidad de utilizar los diversos azúcares como única fuente de carbono; para ello se emplean medios que contienen todos los elementos esenciales para el crecimiento menos una fuente de carbono, a los que posteriormente se incorpora un determinado azúcar; la capacidad del hongo para asimilar el carbono de ese azúcar se pondrá en evidencia por el crecimiento del mismo en el medio. Esta técnica se denomina **auxonograma.** Pueden realizarse mediante técnicas convencionales, micrométodos convencionales o sistemas automatizados (19).

2.5 Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos.

Una forma conveniente de clasificar los antibacterianos es en función de su lugar de acción. Los cuatro objetivos principales de la acción antibacteriana son:

2.5.1 Inhibidores de la síntesis de la pared celular

- Betalactámicos
- Glucopéptidos (25).

2.5.2 Inhibidores de la función de la membrana celular

- Polimixina B.
- Colistina (25).

2.5.3 Inhibidores de la síntesis de proteínas

- Aminoglucósidos.
- Tetraciclinas.
- Cloramfenicol.
- Macrólidos-Lincosamida-Estreptogramina (25).

2.5.4 Inhibidores de la síntesis de DNA y RNA.

- Sulfamidas.
- Trimetoprima.
- Quinolonas.
- Rifamicinas (25).

2.6 Mecanismos de acción de los agentes antifúngicos.

Al contrario de los fármacos antibacterianos, el número de fármacos antifúngicos (antimicóticos) adecuados para el tratamiento de las infecciones es muy limitado. La toxicidad selectiva es mucho más difícil alcanzar en las células micóticas que en las bacterias y aunque los antimicóticos disponibles tienen una mayor actividad frente a las células humanas, la diferencia no es tan marcada como ocurre en los agentes antibacterianos.

Los antifúngicos pueden clasificarse siguiendo el mismo esquema utilizado antes para los antibacterianos (es decir, en función del objetivo y de la estructura química). Esto revela de forma inmediata una diferencia importante entre los antibacterianos y los antifúngicos; los principales antifúngicos actúan sobre la síntesis de la membrana celular o función de la membrana celular. En la actualidad no existen inhibidores de la síntesis de proteínas micóticas (25).

2.6.1 Inhibidores de la síntesis de membrana celular

- Azol.
- Cotrinazol.
- Ketoconazol.
- Fluconazol (25).

2.6.2 Inhibidores de la función de la membrana celular

- Anfotericina B.
- Nistanina (25).

2.6.3 Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleídos

- La Flucitosina.
- Griseofulvina (25).

2.7 Pruebas de susceptibilidad con agentes antibacterianos.

Las pruebas de sensibilidad que se realizan en el laboratorio estudian la interacción entre los antibióticos y las bacterias de una forma aislada y muy

artificial. (25). La mayoría de las bacterias con importancia clínica son capaces de adquirir y expresar resistencia a los agentes antimicrobianos que habitualmente se usan para tratar infecciones. Una vez que el microorganismo es aislado en el laboratorio, su caracterización con frecuencia incluye pruebas para detectar la resistencia a antimicrobianos (26).

2.7.1 El antibiograma

Es una técnica perfectamente estandarizada que permite, in vitro, definir claramente los conceptos de sensibilidad y resistencia, relacionándolos con lo que ocurre in vivo (24).

2.7.2 Antibiótico

Es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un **antibiótico** (del griego *anti*=contra, *bios*= vida), definía como él poder que tienen ciertas sustancias de detener el crecimiento de los microorganismos, como bacterias, virus y destruirlos (8).

2.7.3 Método empleado

Las pruebas de laboratorio de sensibilidad a los antibióticos se dividen en dos categorías principales: Prueba de difusión y prueba de dilución. Para nuestro estudio se utilizó:

- **Prueba de difusión en agar.**

Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a antibióticos específicos (28).

En estas pruebas se utilizan discos de celulosa impregnados con concentraciones estándar de un antibiótico. Estos discos se colocan en placas de agar en las que se ha realizado la inoculación del microorganismo objeto de evaluación. A medida que las bacterias se multiplican durante la incubación nocturna (18-24 horas), el antibiótico muestra difusión en el agar. Alrededor de cada disco aparece una banda de inhibición cuyo tamaño es proporcional a la susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico del que está impregnado el disco correspondiente. Mediante la aplicación de criterios estandarizados, se equipara el tamaño de la banda de inhibición con la resistencia o sensibilidad del microorganismo frente al antibiótico (28).

Los resultados se informan generalmente como:

- Un microorganismo se considera **Sensible.-** A un determinado antibiótico cuando éste puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria, en el lugar de la infección.
- Un microorganismo se considera **Intermedio.-** Es la que se refiere al microorganismo que no es afectado por dosis normales de antibiótico dadas a intervalos adecuados, pero que si la dosis se eleva sin que existan efectos tóxicos, o si se produce una acumulación en el lugar de la infección se puede llagar a erradicar.
- Un microorganismo se considera **Resistente.-** A un antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección (líquidos, tejidos, sueros) no es suficiente para afectarle, y por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis (24).

2.8 Prueba de susceptibilidad con agentes antifúngicos.

Las infecciones causadas por hongos patógenos y saprófitos han aumentado en términos de mortalidad y morbilidad anual, atribuido al mayor uso de agentes citotóxicos y a los nuevos y efectivos agentes antibacterianos. Ahora el laboratorio clínico está asumiendo un rol mayor en la selección de y supervisión de la quimioterapia antifúngica.

Las pruebas de susceptibilidad con agentes antifúngicos se hacen por las mismas razones que con los agentes antibacterianos: para obtener datos confiables que permitan elegir el agente más activo para usarlo en el tratamiento de infecciones humanas.

Los procedimientos de prueba in vitro con agentes antifúngicos son de diseño similar a los empleados con agentes antibacterianos, pero existen ciertas diferencias que hacen algo más difíciles las pruebas con agentes antifúngicos, como por ejemplo: crecimiento lento, temperaturas específicas, tiempo de incubación y medio de cultivo Sabouraud, etc. Tienen primordial importancia las diferencias de propiedades básicas de algunos compuestos a

probar, así como las diferencias exclusivas de las características de crecimiento de muchos microorganismos.

Una variedad de agentes antifúgicos está ahora disponible para el tratamiento de infecciones micóticas del ser humano y animales

Existen varios métodos para pruebas de susceptibilidad con antifúngicos como: diluciones en caldo, y la difusión de discos en agar que presentan los mismos principios que se utilizan para antibacterianos. (22)

2.8.1 Antifungigrama

Las pruebas de susceptibilidad con agentes antifúngicos se realizan para obtener datos confiables que permitan elegir el agente antifúngico más activo para usarlo en el tratamiento de infecciones humanas. Es de gran utilidad al permitir confirmar la sensibilidad esperada de los de los hongos aislados en clínica o poder detectar la adquisición de resistencias en el curso de tratamientos prolongados con algunos antifúngicos (19).

2.8.2 Antimicóticos

Se entiende por antifúngico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte. Dado que los hongos además de tener usos beneficiosos para el ser humano (levadura del pan, hongos de fermentación de quesos, vinos, cerveza, entre otros) otros forman parte del colectivo de seres vivos que pueden originar enfermedades en el ser humano, el conocimiento y uso de los antifúngicos es de vital importancia a la hora de tratar muchas enfermedades (30).

2.8.3 Método empleado para Candida albicans

Difusión con discos: En la prueba de sensibilidad por difusión con discos la resistencia a los antimicóticos se detecta exponiendo los aislamientos fúngicos a discos de antibiótico, que se colocan en una placa de agar de Sabouraud, cuya superficie se ha sembrado con cepas micóticas, cuando los discos que contienen una concentración conocida de agente antimicrobiano se colocan sobre la superficie de una placa recién sembrada, el agente empieza a

difundirse por medio de incubación de 24 a 48 horas, y establece un gradiente de concentración alrededor del disco de papel.

Después de la incubación, el diámetro del halo de inhibición de cada disco se mide en milímetros, para posteriormente según el tamaño adquirido sea interpretado como sensible, intermedio o resistente (22).

2.9 Concentración mínima inhibitoria.

Se define como la menor concentración de un antimicrobiano que reduce la población de un microorganismo a 0.1% o menos del número de células presentes en el inoculo original (22).

2.10 Concentración mínima bactericida

Se define como la menor concentración de antibiótico que mata por lo menos 99,9% del inoculo original (22).

3. CONTROL DE CALIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimula la participación de los laboratorios centrales de salud pública en por lo menos tres valoraciones al año mediante encuestas de control de calidad externa; para los laboratorios de referencia, esto puede incluir un esquema internacional de prueba.

3.1 Control de material y equipos

- ✓ Temperatura de estufas: refrigeradores y congeladores.
- ✓ Campanas de incubación: se debe comprobar que las atmósferas creadas permiten el crecimiento de los microorganismos en cuestión.
- ✓ Autoclave: se realizará con sondas internas y con cintas de autoclave que garanticen una correcta esterilización en cada ciclo.
- ✓ Pipetas automáticas: se calibrará cada cierto tiempo la capacidad de toma y expulsión de volúmenes.

3.2 Control de los medios de cultivo

- ✓ Esterilidad del medio: se comparará en cada lote, mediante la incubación del medio de cultivo en las condiciones de crecimiento de los microorganismos para los que está destinado.
- ✓ Eficacia del medio: se comparará el crecimiento de microorganismos en los distintos medios selectivos-diferenciales, confirmando que crecen según las características de cada uno. Para ello se utilizaran cepas de colección, las más comunes son las de la colección americana de cultivo tipo ATCC.

3.3 Control de reactivos y discos para pruebas diferenciales.

Los reactivos: se controlan cada vez que se preparan o se abre un nuevo frasco. El control va dirigido principalmente a los colorantes de tinción, fijadores y reveladores de pruebas bioquímicas. Su eficacia se comprueba con microorganismos que dan respuesta positiva y negativa.

Los discos: para pruebas diferenciales deben estar bien conservados en el refrigerador, con un desecante. Los principales a controlar son los de oxidasa, bacitracina, optoquina.

3.4 Control de discos para antibiograma

Los discos antibióticos se conservarán en el refrigerador en frascos cerrados con desecadores. El control de actividad de los discos se efectúa con cepas tipo cuya sensibilidad se conoce (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923).

3.5 Control de antisueros y antígenos

Una vez reconstituido el liofilizado, se conservará en el refrigerador. Cada vez que se empiece un frasco, se comprobará su reactividad frene a cepas positivas y negativas, y en caso de los sueros, frente a cepas ATCC.

3.6 Control de resultados intralaboratorios e interlaboratorios.

La introducción periódica de muestras artificiales, preparadas con un microorganismo conocido, sirve para reflejar el nivel de resultados que puede ofrecer el laboratorio y evaluar la calidad del personal que las analiza. Es fundamental participar en los programas de evaluación externa de la calidad que ofrecen las organizaciones científico-profesionales, para asegurar la calidad de los resultados emitidos (31).

III. METODOLOGÍA

3.1 Materiales y Métodos

Tipo de estudio

La presente investigación se marca en las características de un estudio experimental.

Área de estudio

La provincia de Zamora Chinchipe, se encuentra ubicada en la región sur de la Amazonía ecuatoriana, tiene 10.556 Km2 de superficie, equivalente al 4.4% de la superficie total del país, está constituida por nueve cantones y parroquias.

En la existencia de una prolífica flora y fauna junto a extraordinarias variaciones de macro y micro hábitat radica la característica más importante de esta región

Universo:

Plantas medicinales endémicas de la provincia de Zamora Chinchipe usadas por los sanadores de la zona.

Muestra:

"Valeriana chaerophylloides"

Criterios de inclusión:

- Plantas nativas de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Plantas más comunes usadas tradicionalmente para tratar procesos infecciosos por los sanadores de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Plantas que no cuenten con estudios previos similares (actividad antimicrobiana).

Criterios de exclusión:

- Plantas que se encuentren en peligro de extinción.

PROCEDIMIENTOS:

Pruebas Piloto

Se realizaron varias pruebas piloto previas a la realización de los ensayos finales, con la finalidad de validar cada uno de los procedimientos de cada fase de la metodología dentro de los cuales estuvieron:

- Los discos de sensibilidad, los cuales se prepararon mediante el uso de una ampolla de amikacina, realizando diluciones de 30µg/L y 60µg/L, comprobando así que la difusión de los discos se encontraba dentro de los halos establecidos para dicho antibiótico.
- Para la elaboración de los discos de sensibilidad se utilizó: papel filtro común, papel filtro de 0.7 mm de espesor, y papel Whatman N°1, validándose este último debido a su adecuada difusión, los dos primeros fueron descartados por razones de difusión irregular y excesiva.
- Se realizaron varias diluciones a partir del extracto seco: 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000, se descartó esta última debido a su poca concentración de extracto; también se intentó la realización de la dilución 1/10, lo cual se imposibilitó debido a la incapacidad de dilución del extracto, optando únicamente por las diluciones 1/100, 1/1.000, 1/10.000.
- Así mismo se realizaron pruebas de los medios de cultivo, midiendo el pH, utilizando bacterias para la observación de las características típicas que producen las colonias bacterianas.
- Se realizaron pruebas para comprobar el método utilizado, empleando extractos de plantas cuya actividad antimicrobiana era conocida, como Ruda, Canela y Clavo de olor, obteniendo resultados positivos.
- Se practicaron ensayos de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB), empleando extractos acuosos de plantas control como Romero y Matico.

FASE 1: Preparación de la solución de trabajo y discos con los extractos

Valeriana chaerophylloides fue previamente identificada por un botánico del Herbario "Reinaldo Espinoza" de la Universidad Nacional de Loja, fue recolectada el día 12 de Junio de 2010, en la comunidad Kungüime, Parroquia Nuevo Quito, Cantón Paquisha de la Provincia de Zamora Chinchipe. Una vez recolectada fue lavada inmediatamente y se procedió a la separación de partes a utilizar, descartando plantas contaminantes, seleccionando únicamente las flores y hojas de la planta en estudio (Ver protocolo PEO-LF-05). En el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de Loja se llevó a cabo el secado de la planta a temperatura ambiente, protegiéndola de la luz del sol, proceso que duró una semana, luego se almacenó en recipientes oscuros. Después se realizó el molido por un molino de cuchillas Wiley Mini Mill con tamaño de tamiz de 2mm, el día de iniciar las extracciones (Ver protocolo PEO-LF-03).

Se pesaron 62,23g de las partes aéreas secas y molidas, luego se realizó la maceración con etanol al 70% v/v agua durante 48 horas y el día 11 de agosto se iniciaron las 18 extracciones sucesivas hasta agotamiento, efectuando de 2 a 3 extracciones por día. La concentración se realizó en rota vapor, a 45ºC (Ver protocolo PEO-LF-04), obteniéndose 13,09g de extracto seco, con el cual se prepararon diluciones 1/100, 1/1000, 1/10000 con etanol 70% v/v agua (10µg/µL, 1µg/µL y 0,1µg/µL respectivamente).

Para preparar los discos de sensibilidad utilizamos papel Whatman Nro. 1, con un diámetro de 6mm, a los cuales se les agregó 20µl de cada una de las diluciones (colocándolos de 10µl en 10µl), esta cantidad equivale a una cierta concentración del extracto de acuerdo a cada dilución, como observamos en el presente cuadro.

Diluciones	Concentración del extracto (µg/disco)
1/100	200
1/1.000	20
1/10.000	2

Luego de cada impregnación se realizó la evaporación del solvente con la ayuda de una secadora (Ver protocolo No. 18).

FASE 2: **Preparación de los cultivos microbianos y reconstitución de las cepas de referencia internacional (ATCC).**

Se prepararon diferentes medios de cultivo específicos para cada microorganismo empleado, tomando en cuenta la constante aplicación de normas de Bioseguridad y Control de Calidad (Ver protocolos No. 2 - 9).

Se utilizaron 5 cepas de referencia internacional que se considera como una batería mínima para ensayos de susceptibilidad.

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883).
- *Escherichia coli* (ATCC 25922).
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853)
- *Candida albicans* (ATCC 26790).

De los liofilizados en refrigeración se realizaron las reconstituciones con 0.5ml de caldo de cerebro y corazón, luego se realizaron siembras por estría en medios de cultivo adecuados de acuerdo al tipo de bacteria: Agar Chapman Manitol para *Staphylococcus aureus*, Agar Mackonkey para *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, Agar Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa*, Agar Sabouraud dextrosa para *Candida albicans*, se incubaron por 24 horas a 37ºC en aerobiosis las bacterias y 48 horas el hongo. Se realizaron pases sucesivos de tal manera que se aseguró que la cepa se encuentre en la fase de crecimiento exponencial (Ver Protocolos No. 13 – 17).

El inóculo se preparó por suspensión de las cepas en solución salina al 0.9%, equivalente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland (1 a 2 $x10^8$ UFC/ml), (ver protocolo 12).

FASE 3: Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método cualitativo de difusión en agar con discos impregnados basada en el método de Kirby-Bauer modificado, tanto para bacterias (ver protocolo 19) como para hongos (ver protocolo 20).

Método de difusión en Agar

Para esta técnica se preparó placas de Petri con Agar Müeller-Hinton (Ver protocolo No. 10) en el caso de las bacterias (ver protocolo 19) y Agar Sabouraud Dextrosa (Ver protocolo No. 8) en el caso del hongo una vez solidificado se preparó el inóculo de cada microorganismo al patrón de turbidez MacFarland N° 0.5 descrito anteriormente, se sembró en la superficie del agar con un hisopo estéril, se esperó el transcurso de diez minutos. Luego se colocó en la superficie del agar inoculado, en cada caja, los discos de papel de filtro previamente impregnados con 20µL de las diferentes concentraciones de los extractos y como control negativo etanol al 70% y controles positivos Ampicilina más sulbactan para *Staphylococcus aureus*, amoxicilina más acido clavulánico para *Klebsiella pneumoniae*, gentamicina para *Pseudomonas aeruginosa,* ciprofloxacina para *Escherichia coli*, y fluconazol para *Candida albicans,* cabe recalcar que este procedimiento se realizó por duplicado.

Los medios de cultivos inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas en el caso de las bacterias y 48 horas para el hongo.

Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas (bacterias) y 48 horas (hongo), utilizando una regla.

IV. RESULTADOS

Tabla Nº- 2

Actividad Antimicrobiana del extracto etanólico de la planta *Valeriana chaerophylloides* frente a la bacteria *Escherichia coli*

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		POSITIVO (CIPROFLOXACINA)	NEGATIVO (ETANOL 70%)
1/100	Negativo	36 mm (Sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	37 mm (Sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	37 mm (Sensible)	Negativo

FUENTE: Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la región ser del Ecuador. Estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.

AUTORA: Liseth Jasmin Cueva Yaguana

Interpretación:

En las diluciones 1/100, 1/1000, 1/10.000 hubo crecimiento bacteriano alrededor del disco, lo que indica resistencia de *Escherichia coli* al extracto etanólico de la planta *Valeriana Chaerophylloides*, en tanto que el control positivo no mostro crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo que si presento crecimiento bacteriano. No se realizo la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antimicrobiana del extracto etanólico.

Tabla Nº- 3

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta *Valeriana chaerophylloides* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		POSITIVO (AMOXICILINA – SULBACTAM)	NEGATIVO (ETANOL 70%)
1/100	Negativo	42 mm (Sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	43 mm (Sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	43 mm (Sensible)	Negativo

FUENTE: Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la región ser del Ecuador. Estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.

AUTORA: Liseth Jasmin Cueva Yaguana

Interpretación:

En las diluciones 1/100, 1/1000, 1/10.000 hubo crecimiento bacteriana alrededor del disco, lo que indica resistencia a la bacteria *Staphylococcus aureus* frente al extracto etanólico de la planta *Valeriana Chaerophylloides*, en tanto que el control positivo no mostro crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo que si presento crecimiento bacteriano. No se realizo la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antimicrobiana del extracto etanólico.

Tabla Nº- 4

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta *Valeriana chaerophylloides* frente a la bacteria *Pseudomona aeruginosa*

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		POSITIVO (GENTAMICINA)	NEGATIVO (ETANOL 70%)
1/100	Negativo	16 mm (Sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	16 mm (Sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	17 mm (Sensible)	Negativo

FUENTE: Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la región ser del Ecuador. Estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.

AUTORA: Liseth Jasmin Cueva Yaguana

Interpretación:

En las diluciones 1/100, 1/1000, 1/10.000 hubo crecimiento bacteriana alrededor del disco, lo que indica resistencia a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* frente al extracto etanólico de la planta *Valeriana Chaerophylloides*, en tanto que el control positivo no mostro crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo que si presento crecimiento bacteriano. No se realizo la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antimicrobiana del extracto etanólico.

Tabla Nº- 5

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta *Valeriana chaerophylloides* frente a la bacteria *Klebsiella pneumoníae*

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		POSITIVO (AMOXICILINA – ÁCIDO CLAVULANICO)	NEGATIVO (ETANOL 70%)
1/100	Negativo	18 mm (Sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	18 mm (Sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	17 mm (Sensible)	Negativo

FUENTE: Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la región ser del Ecuador. Estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.

AUTORA: Liseth Jasmin Cueva Yaguana

Interpretación:

En las diluciones 1/100, 1/1000, 1/10.000 hubo crecimiento bacteriana alrededor del disco, lo que indica resistencia a la *bacteria Klebsiella* pneumoníae frente al extracto etanólico de la planta *Valeriana Chaerophylloides*, en tanto que el control positivo no mostro crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo que si presento crecimiento bacteriano. No se realizo la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antimicrobiana del extracto etanólico.

Tabla Nº- 6

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta *Valeriana chaerophylloides* frente al hongo *Candida albicans*

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		POSITIVO (FLUCONAZOL)	NEGATIVO (ETANOL 70%)
1/100	Negativo	17 mm (Sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	17 mm (Sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	19 mm (Sensible)	Negativo

FUENTE: Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la región ser del Ecuador. Estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.

AUTORA: Liseth Jasmin Cueva Yaguana

Interpretación:

En las diluciones 1/100, 1/1000, 1/10.000 hubo crecimiento fúngico alrededor del disco, lo que indica resistencia al hongo *Candida albicans* frente al extracto etanólico de la planta *Valeriana Chaerophylloides*, en tanto que el control positivo no mostro crecimiento fúngico alrededor del disco, a diferencia del control negativo que si presento crecimiento bacteriano. No se realizo la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antimicrobiana del extracto etanólico.

V. DISCUSIÓN

Mediante el ensayo realizado para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del tallo, hoja y flores de la especie *Valeriana chaerophylloides* por el método de Kirby Bauer modificado frente a 5 cepas ATCC: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 25853), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) y *C. albicans* (ATCC 26790), está no mostró actividad antimicrobiana contra ninguno de los microorganismos ensayados en las diferentes concentraciones empleadas, mientras que los controles positivos usados inhibieron el crecimiento bacteriano, según se muestra en las tablas N.- 2,3,4,5 y 6, los controles negativos (etanol 70%) no evidenciaron halo de inhibición.

Can Macú (2007), evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de raíz y hojas de *Valeriana prionophylla Standl,* frente a 6 microorganismos estandarizados cepas ATCC, encontrando actividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *M. smegmatis;* mientras que no presentó actividad frente a *E. coli, S. typhi***,** *S. aureus y P. aeruginosa.*

La inactividad frente a *E. coli, S. aureus y P. aeruginosa* harían suponer que miembros de está familia no tienen actividad contra estas bacterias. Se debe recalcar que la parte utilizada de la planta fue la raíz y hojas, contrastando con nuestro estudio en el que se usó la parte área, posible causa del resultado diferente obtenido.

En lo referente a la actividad antifúngica según estudio de Gaitán (2005), quien evaluó la actividad antifúngica del extracto etanólico de la raíz de *Valeriana prionophylla* contra *Sporothrix schenckii* por el método de Brancato & Goldin modificado, determinó que ésta especie presenta actividad antifúngica, lo cuál contrasta con los resultados obtenidos en nuestro estudio ya sea por la metodología empleada, el microorganismo que se empleó y la parte utilizada de la planta.

En vista de aquello se sugiere continuar con la realización de estudios de actividad antimicrobiana de *Valeriana chaerophylloides*, empleando una

metodología diferente, otros microorganismos y en lo posible utilizar una sola parte de la planta ya sean sus raíces o las hojas, ya que si se ha logrado obtener resultados positivos de actividad antimicrobiana de la familia Valerianecea, a la cual pertenece la *Valeriana chaerophylloides*.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Valeriana chaerophylloides* no presentó actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar en las diluciones: 1/100, 1/1000 y 1/10.000.

- El extracto etanólico de *Valeriana chaerophylloides* no presentó actividad antifúngica mediante el método de difusión en agar en las diluciones: 1/100, 1/1000 y 1/10.000.

- Se validó la metodología mediante la elaboración de protocolos para la evaluación de la actividad antimicrobiana adaptada a plantas de uso medicinal, los mismos que permanecerán en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana, como constancia de la investigación realizada, que servirán como guía para posteriores estudios de este tipo.

- Los resultados obtenidos de la investigación realizada, fueron difundidos a los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, que se encuentren cursando el módulo VII, relacionado a Microbiología.

VII. RECOMENDACIONES

- Incentivar a los estudiantes que se continúe con estudios de tipo experimental acerca de las plantas de uso medicinal, para garantizar el uso seguro de las plantas medicinales, respaldado por la ciencia y la tecnología, al beneficio de la salud y el bienestar de la población.

- Debido al uso que le dan los sanadores de la Provincia de Zamora Chinchipe a la *Valeriana chaerophylloides* en el tratamiento de muchas afecciones se deberían continuar con su estudio utilizando otros sistemas de evaluación in vitro.

- Utilizar un mayor número de plantas para el estudio de la actividad antimicrobiana, para enriquecer aún más la investigación y poder contribuir a mejorar la salud de la ciudadanía.

- Estudiar la parte de la raíz de *Valeriana chaerophylloides* ya que existen estudios positivos de actividad antimicrobiana de la Familia Valerianaceae al utilizar dicha parte de la planta.

- Que los estudios se realicen con las diferentes partes de la planta por separado.

- Emplear un método adecuado para la conservación de las cepas microbianas ATCC, las mismas que servirán para posteriores proyectos de investigación relacionados a este tipo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Mesa G, Rodríguez I, Teja.** *Las enfermedades emergentes y remergentes: un problema de salud en las Américas.* s.l. : Rev. Panamericacna Salud Pública, 2004.

2. **C., Bergstrom.** *Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistence in hospital .* USA : Proc Natl Acad Sci , 2004.

3. Oraganización Mundial de la Salud. *Oraganización Mundial de la Salud.* [En línea] 3 de Enero de 2007. [Citado el: 3 de Enero de 2007.] http://www.who.int/..

4. **Zurita, J.** Red Nacional de Vigilancia de Rsestencia bacteriana. Ecuador. *Boletín de la Red. Informe Nº1.* 2001.

5. **Rodríguez, Hernández D. L.** *Actividada antimicrobiana de plantas de cuba.* s.l. : Rev. Cubana Plantas Medicinales, 2001. págs. 42-27.

6. **N., Cuellar A. Rojas.** *Nueva estructura antimicrobiana del propóleo colectado en Cuba.* Cuba : Rev. Cuba. Farm, 1990. págs. 51-58.

7. **Gale, G.Kiser,J.** *Antibiotic Resistance Theory and Practice Trans. N. Y. Academy of Scientific Serology.* 2006.

8. **Paris, Paul Schauenberg/Ferdinand.** *Guía de las Plantas Medicinales.* [trad.] José Fortes Fortes. Cuarta. Barcelona : Omega, S.A., 1980. págs. 18, 19, 6. 84-282-0246-X.

9. **Valcárcel, María José.** DSALUD.COM. [En línea] 2006. [Citado el: 15 de Enero de 2011.]

10. *Plantas medicinales.* **Zambrana, Teresita Dra.** Cuba : Beneficios de la fitoterapia, 2005.

11. **Torres, C. M.** *Investigación en la trasformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos.* Bogotá : Jardín José Celestino Mutis-Subdirección Cientifíca., 2004. págs. 2-14.

12. **PJ, Houghton.** *The Genus Valerian Singapure.* s.l. : Harwood academic publishers, 1997. pág. 142.

13. **M., Marder.** *6-Methylapigeninand hesperidin: new valeriana flavonoids whith activity on the CNS.* s.l. : Pharmacol Biochem Behav, 2003. págs. 573-545.

14. *Plantas con actividad antimicrobiana.* **López, Domingo D.** España : Esp Quimioterapia, 2003, págs. 385-393.

15. **Pelczar M. J. Reid, R. D.** *Microbiología.* La Habana : Pueblo y Educación, 1992. pág. 664.

16. [En línea] [Citado el: 24 de Enero de 2011.] http://www.zipcodezoo.com/Plants/L/Lepechinia_mutica/html).

17. **Rosenthal, Patrick R.Murray/Kens.** *Microbiología Médica.* Madrid España : Gea Consultoria Editorial S.L.L. 978-84-8174-927-4.

18. **Cabello, Romero.** *Microbiología y Parasitología Humana.* México : Médica Panamericana, 2007. págs. 626-629, 875,876,805,753. 978-968-7988-48-1.

19. **Guillem, Prats.** *Microbiología Clínica.* Primera. Madrid-España : Médica Panamericana, 2005. págs. 83, 95-96,99,101. 978-84-7903-971-4.

20. **Fisher, F. Cook, N,B.** *Micología: Fundamentos y diagnostico.* Río de Janeiro : s.n., 2001.

21. **Wikipedia Foundation, Inc.** [En línea] 2010. [Citado el: 22 de Enero de 2011.] http://en.wikipedia.org/wiki/American_Type_Culture_Collection.

22. **Lennette, Edwin.** *Manual de Microbiología Clínica.* Buenos Aires : Médica Panamericana, 1989. págs. 189, 192, 193, 194.446, 447, 448, 344,345, 341, 343, 1229,1240, 1242, 1230, 1233. 950-06-1334-4.

23. *Identificación de levaduras.* **Cuestas, María José Linares Sicilia/Francisco Solís.** s.l. : Rev. Iberoamericana de Micología, 2001. 84-607-3050-6.

24. **Alvarez., M. U.** *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.* Primera, Segunda E. Boquet y N.V niño. s.l. : Latinoamericana. Dr. Ramiro Cruz (OPS-OMS), 1995-1996. págs. 28,29, 31, 3233, 34, 35, 113- 118, 122-127. .

25. **Cedric Mins, Derck Wakelin, Jhon Playfair, Rosamund Willians, Ivan Roitt.** *Microbiología Médica.* Madrid España : Dorki Servicios Integrales de Edición., 1999. págs. 415,419, 420, 421, 422, 425, 427, 428, 429, 430. 431, 432,. 84-8174-396-8.

26. **Bailey&Scott.** *Diagnóstico Microbiológico.* Undécima . Buenos Aires : Médica Panamericana, 2004. 950-06-0796-4.

27. **Burneo, Dra. Ruth.** *Guia de Practicas de Laboratorio de Microbiología Parasitología y micología.* Loja-Ecuador : Universidad Nacional de Loja Facultad de Ciencias Medicas, 1992. pág. 32.

28. **P.WESTRAM, J. Keith Struther. Roger.** *Bacteriología Clínica.* Barcelona : Masson Publishing, 2003. págs. 52,53. 1-84076-0273.

29. **Henry, Jhon Bernard.** *El Laboratorio en el Diagnóstico.* Madri España : 20 Ed., 2005. pág. 1120. 84-7101-464-5.

30. **Abete, Fortun.** *Antifúngicos .* 1988.

31. **Mazziota, Camilo Fernandez Espina. Daniel.** *Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico.* Buenos Aires : Médica Panamericana, 2005. págs. 500, 5001. 950-06-0426-4

ANEXO I

Loja, 07 de Febrero del 2011

Dra. Claudia Cruz Erazo

COORDIANDORA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL CENTRO DE DIAGNÓSTICO DEL ÁREA DE LA SALUD HUMANA.

Certifica:

Que la presente egresada Liseth Jasmin Cueva Yaguana de la carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana, de la Universidad Nacional de Loja, realizó los ensayos que conlleva su tesis con la finalidad de "Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de Valeriana chaerophylloides por el método de difusión en agar"

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, por lo tanto autorizo el uso del presente para fines pertinentes.

Atte.

Dra. Claudia Cruz Erazo

COORDIANDORA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL CENTRO DE DIAGNÓSTICO DEL ÁREA DE LA SALUD HUMANA.

ANEXO II

Título: Obtención de extractos de plantas medicinales por maceración

1.- Objetivo: Definir el procedimiento para la elaboración de extractos de plantas medicinales por el método de maceración.

2.- Alcance: El presente procedimiento es aplicable al procedimiento de obtención de extractos de plantas medicinales en el laboratorio de Fitoquímica-UNL.

3.- Responsabilidades:

Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas, Pasantes.
Verificación: Responsable del laboratorio de fitoquímica.
Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

4.- Procedimiento

a. Pesar una cantidad preestablecida de droga seca previamente molida,
b. Colocar la droga pesada en un recipiente de vidrio provisto con tapa con cierre hermético y agregar el solvente elegido en pequeñas cantidades hasta unos 2 cm por sobre la superficie de la droga.
c. Dejar reposar por al menos 48 horas, agitando de vez en cuando,
d. Transcurrido el tiempo indicado, cubrir la boca del recipiente con una gasa y filtrar por papel filtro en un Erlenmeyer de capacidad adecuada. Una vez filtrado todo el extracto obtenido proceder a concentrarlo en el rotavapor (ver PEO-LF-04).
e. El solvente recuperado de la operación PEO-LF-04 verter nuevamente en el recipiente con la droga y dejar reposar por al menos 4 horas y retomar el proceso de concentración. Repetir este procedimiento hasta agotamiento (hasta cuando el extracto es casi del color del solvente usado).

Título: Operación de concentración en rotavapor

1.- Objetivo: Garantizar el buen funcionamiento y uso de los rotavapores del laboratorio de Fitoquímica.

2.- Alcance: El presente procedimiento es aplicable a rotavapores del laboratorio de Fitoquímica, con las siguientes características:

Marca: YAMATO
Modelo: RE200
Serie:
Capacidad máxima: 1000 ml
Capacidad mínima:
Ubicación: Laboratorio de Fitoquímica
Última Revisión de Mantenimiento:
Componentes del equipo: Rotavapor, baño María de agua, mangueras de ingreso/salida de agua al refrigerante y manguera de conexión de vacío.

3.- Responsabilidades:

Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas.
Verificación: Responsable del laboratorio de fitoquímica.
Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

4.- Procedimiento

a) Retirar la cubierta protectora del equipo y verificar que se encuentra en condiciones de operatividad según las instrucciones del fabricante. Es decir que se encuentren conectadas las mangueras de ingreso y salida de agua (refrigerante), la conexión al sistema de vacío, agua suficiente en el baño maría, lubricación de las uniones del balón concentrador y colector etc. Verificar que el equipo se encuentre perfectamente nivelado.

b) Conectar el rotavapor y el baño maría a la fuente de poder (toma-corriente), verificando que el voltaje de la red sea de 110 V.

c) Encender primeramente el baño maría, para lo cual presionar la tecla de poder ubicada al costado derecho del equipo. Al cabo de unos 10 minutos encender el rotavapor presionando el botón de encendido ubicado en la parte superior derecha del panel de mandos.

d) Colocar el balón de concentración al conducto de vapor y coloque la pinza de fijación (clamp).

e) Colocar el balón colector asegurándolo con la pinza de fijación (clamp).

f) Verificar que la tapa del condensador se encuentre cerrada al ingreso de aire y líquido a concentrar (posición horizontal).

g) Encender la bomba de vacío y extraer el aíre del sistema.

h) Introduzca la manguera de alimentación en el recipiente que contiene el líquido a concentrar. Con precaución haga rota la llave (tapa) del condensador (orificio de la tapa dirigido hacia abajo) de tal manera que empiece a subir el líquido (muestra) por la manguera de alimentación y pase al balón concentrador. Cuando el balón concentrador contenga aproximadamente ½ de su capacidad suspender la alimentación rotando la tapa del condensador (orificio de la tapa en posición horizontal).

   NOTA: El ingreso del líquido debe hacerse lentamente para evitar la ebullición violenta y el contenido pase por el conducto de vapor.

i) Con la mano izquierda sostenga el motor del rotavapor mientras con la derecha afloje el tornillo de fijación al soporte (pedestal); con precaución descienda el rotavapor hasta que el valón concentrador quede sumergido en el baño maría hasta una profundidad aproximada de 1/2 y de tal forma que no cause el derrame del agua del baño o roce con el borde del mismo.

j) Iniciar la rotación del balón concentrador, para lo cual gire la perilla de velocidad en dirección de las manecillas del reloj hasta una velocidad aproximada de 120 rpm.

k) Abra la llave de ingreso de agua (refrigerante), asegurándose que tenga un flujo adecuado.

l) Para mantener una buena velocidad de evaporación, de vez en cuando active el sistema de vacío (bomba de vacío).

m) Una vez alcanzada un buen grado de concentración del extracto, parar la rotación del balón, sacarlo del baño maría, mantener la refrigeración por unos 2-3 minutos más y cortar el suministro de refrigerante; apague el baño maría si no se va utilizar nuevamente el equipo.

n) Retire el balón concentrador; para lo cual extraiga la pinza de sujeción y rote en sentido contrario a las manecillas del reloj el removedor del balón ubicado en el conducto de vapor.

   NOTA: Mientras realiza esta actividad, con la mano derecho sostenga firmemente el balón concentrador.

o) Deposite en contenido del balón concentrador en un cristalizador o recipiente adecuado para proceder al secado final o liofilización.

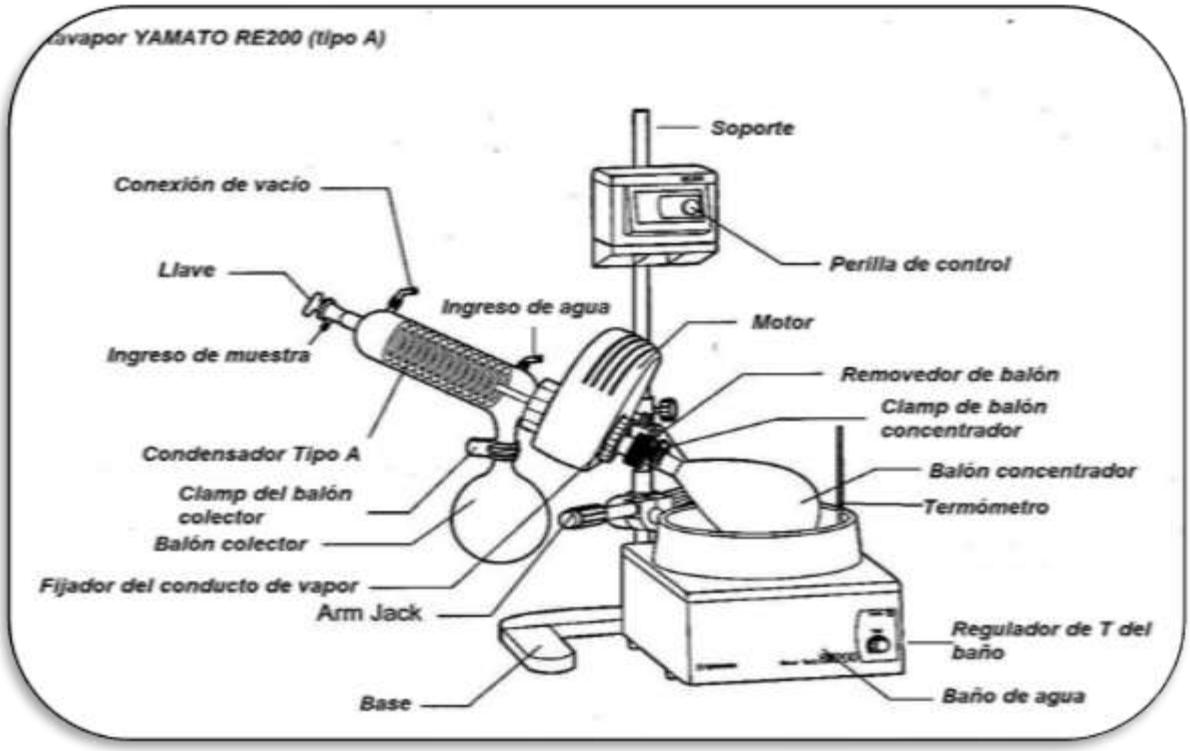
p) Retire el balón colector, extrayendo previamente la pinza de sujeción (clamp) y con la otra sostenga firmemente el balón, deposite el solvente destilado en un recipiente para el reciclado de solventes o reinicie el proceso de extracción, de acuerdo a la metodología aplicada para la obtención de extractos.

q) Lave cuidadosamente el balón concentrador y colector con una porción nueva del solvente utilizado para la obtención del extracto; con la misma solución lave el condensador para lo cual retire la tapa y con la ayuda de una piseta lave el serpentín

y las paredes del condensador, colectando el líquido para posteriormente ser reciclado.

r) Apague el baño maría y el rotavapor, desconéctelo de la red de alimentación eléctrica.

5.- Diagrama/Anexos



Título: Instructivo para la colecta de drogas

1.- Objetivo: Garantizar la colección de muestras de drogas para estudios fitoquímicos y de bioactividad.

2.- Alcance: El presente instructivo es aplicable al procedimiento de obtención de drogas a ser estudiadas en el laboratorio de Fitoquímica-UNL.

3.- Responsabilidades:

Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas, Pasantes.
Verificación: Responsable del laboratorio de fitoquímica.
Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

4.- Procedimiento

Requisitos previos a la recolección

Personal Técnico:

- Botánico
- Guía
- Colector(es)

Instrumentos/equipos:

- GPS
- Cámara fotográfica
- Formato para registro de datos: nombre de la planta, fecha, lugar (GPS),
- Sacos de yute o costales, cartones, papel periódico (en blanco),
- Prensa para conservación de muestras para herbario.
- Podadora.
- Picas, azadones (para raíces)

a) Recolección y transporte

1. Determinar de antemano las mejores condiciones para la colección de la parte de la planta (droga vegetal) a estudiar:
   a) **Hojas**: Se colectan generalmente cuando la fotosíntesis es más activa, cuando están verdes, antes y durante la floración y antes de la maduración de los frutos.
   b) **Flores:** Antes o durante la época de polinización.
   c) **Frutos:** Generalmente cuando ya están de desarrollados o cuando están verdes o maduros.
   d) **Semillas:** Cuando el fruto ya está maduro, antes de que expulse las semillas.
   e) **Corteza:** Cuando empiezan los proceso vegetativos, cuando hay más circulación de sabia.
   f) **Raíces y rizomas:** Cuando finalizan los procesos vegetativos.

2. Las plantas a colectarse deben ser identificadas plenamente por el Botánico del equipo.
3. Tomar fotografías del ejemplar representativo de la especie a colectar.
4. Identificar/registrar el sitio de colección.
5. Colectar exclusivamente la parte elegida para el estudio, con criterios de conservación del medio.
6. El material debe colectarse y transportarse en sacos de yute o saquillos plástico o tela hasta el sitio de acopio temporal y luego en cajas de cartón.
7. No colectar en funda plásticas, para evitar el deterioro térmico de la droga vegetal.
8. Al colectar raíces, rizomas o bulbos eliminar mecánicamente la mayor cantidad de tierra.
9. En lo posible, luego de colectada la droga vegetal, iniciar el proceso de secado, especialmente hojas y flores, extendiéndolo sobre papel periódico limpio (en blanco).
10. Luego de la jornada de colección y, de ser necesario, proceder al lavado del material (especialmente raíces)

b) Secado

1. El secado debe iniciarse de inmediato después de ser colectada la planta, especialmente hojas y flores.
2. Las raíces deben ser lavadas con agua corriente y escurridas para eliminar restos de agua.
3. Las hojas, flores y raíces pequeñas y delgadas se pueden secar a temperatura ambiente y bajo sombra. Se puede usar también túnel de calor o estufa, lo que permite un mejor control de la temperatura y del tiempo de secado.
4. Los materiales más gruesos tales como frutos, tallos, raíces, cortezas se recomienda secar en estufa o túneles de calor a no más de 40 ºC.
5. Los materiales de mayor dureza, luego de lavados, deben ser cortados en un tamaño que facilite su posterior tratamiento (molienda) antes de ser colocados en el secador.

5.- Diagrama/Anexos

6.- Referencias:

1. **Farmacognosia. Kuklinski Claudia.** Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Pág. 12. Ediciones Omega. Barcelona. 2000.
2. **Aspectos básicos de Farmacognosia.** Edison Javier Osorio Durango. QF., MSc., PhD. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Septiembre de

1. **TÍTULO. BIOSEGURIDAD.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado acerca de las normas de bioseguridad.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Bioseguridad: Conjunto de medidas y normas preventivas, destinadas a mantener el control de factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos, logrando la prevención de impactos nocivos frente a riesgos propios de su actividad diaria, asegurando que el desarrollo o producto final de dichos procedimientos no atenten contra la seguridad de los trabajadores de la salud, pacientes, visitantes y el medio ambiente.

Accidente: Suceso eventual o acción de que involuntariamente resulta daño para las personas.

Desinfectante: Sustancia que destruye los gérmenes o microorganismos presentes, a excepción de las esporas bacterianas.

Antisepsia: Procedimiento de aplicación de sustancias que no son quimioterapia, y se aplica estrictamente sobre los tejidos vivos, como la piel y las mucosas internas del

organismo humano, para destruir o prevenir la multiplicación de microorganismos patógenos.

Antiséptico: Sustancias más débiles que los desinfectantes porque se aplican en tejidos vivos, y tienen un efecto bacteriostático (detienen el crecimiento de microorganismos).

Asepsia: Precauciones que se toman para evitar la invasión de microorganismos, cuyo objetivo es: prevenir la infección, eliminarla o limitarla.

Esterilización: Son formas y métodos utilizados para destrucción de todo organismo vivo en cualquier objeto o material por medios físicos o por procedimientos químicos.

6. **Metodología:** Normas de bioseguridad que van hacer aplicadas en el laboratorio de Microbiología, con la finalidad de asegurar la salud de todos los miembros involucrados.

7. **Desarrollo:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio de Microbiología**	- Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos. - El acceso al laboratorio estará limitado solo al personal autorizado. - Nunca se pipeteará con la boca. - En la zona de laboratorio no se permitirá comer, guardar alimentos, beber, fumar, ni usar cosméticos. - Las superficies de trabajo se deben descontaminar antes y después de la jornada de trabajo y siempre que haya un derrame. - Todo el personal se lavará las manos al ingresar al laboratorio y después de haber manipulado material y al salir del laboratorio. - Quitarse los guantes para utilizar equipos o instrumentos no contaminados como teléfonos, computadoras, y material de

		escritorio. - Utilizar una campana de bioseguridad. - El transporte de las muestras dentro o entre laboratorios se realizará de tal manera que, en caso de caída, no se produzcan salpicaduras. Lo recomendable es hacerlo en cajas herméticas. Bajo ningún concepto se deben transportar las muestras a mano. - Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito. - Tras quitarse los guantes, se realizará un lavado de manos. - No deberán usarse lentes de contacto. - Las superficies de las mesas deben estar limpias y ordenadas. - El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido. - Evitar las distracciones y permanecer en el lugar de trabajo. - Todos los desechos biológicos ya sean líquidos o sólidos deben ser descontaminados antes de eliminarlos.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR SANGRE.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Sangre.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Agar Sangre: Medio para propósitos generales, para el aislamiento y cultivo de todas las bacterias de importancia clínica, excepto las más exigentes. Con la adición de sangre, el medio es útil tanto para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis. El medio consiste en una base que contiene una fuente de proteínas, digerido proteico de soja, cloruro de sodio, agar y sangre de carnero al 5%.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo para la preparación de Agar Sangre (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual se debe suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de

		vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Esterilizar en autoclave a 121 ° C.
5	**Colocación de la sangre humana desfibrinada.**	Enfriar a 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5%. Homogenizar.
6	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en placas de petri, hacerlo sobre un nivel recto.
7	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
8	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR MAC CONKEY.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Mac Conkey.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Agar MacConkey: Es el agar primario, selectivo y diferencial utilizado con mayor frecuencia. Este medio contiene el colorante violeta cristal para inhibir el crecimiento de las bacterias grampositivas y de los hongos, mientras que permite el desarrollo de muchos bacilos gramnegativos. El indicador de pH, rojo neutro, le otorga a este medio su propiedad diferencial.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar McConkey (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación deben haber 49.53 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más

		exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en placas.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR CHAPMAN MANITOL.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Chapman Manitol.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Agar Chapman Manitol: Es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de muestras clínicas y diversos materiales. Fue formulado por Chapman para obtener el aislamiento de estafilococos, inhibiendo el crecimiento de otras bacterias al utilizar una alta concentración de sal. Al adicionar cloruro de sodio al 7.5% al agar rojo de fenol y manitol, observó un abundante crecimiento de cepas patógenas de estafilococos (coagulasa positivos) que formaban colonias y halos amarillos a diferencia de las cepas no patógenas que dan colonias pequeñas de color rojo y sin cambio en el color del medio. En este medio las peptonas y el extracto de carne proporcionan la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El D.manitol es el carbohidrato. La alta concentración de cloruro de sodio inhibe el crecimiento de flora acompañante. El rojo de fenol actúa como indicador de pH. El agar es adicionado como agente solidificante.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Chapman Manitol (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 111 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre

		la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en placas.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR CETRIMIDE.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Cetrimide.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Agar Cetrimide: Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Pseudomona Aeruginosa*. Contiene cetrimide, que es el agente selectivo contra flora microbiana alterna. Está compuesto por digerido pancreático de gelatina 20,0 g, Cloruro de magnesio 1,4 g, Sulfato de potasio 10 g, Agar 13,6 g, Bromuro de N-cetil N,N,N- Trimetil amonio (cetrimide) 0,3 g, Glicerina 10,0 mL, Agua destilada 1.000 mL, pH final 7,2 ± 0,2.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Cetrimide (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de agua destilada que contenga 10 ml de glicerol, deben haber 46.7 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se

		vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en placas.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: CALDO TRIPTICASA DE SOJA.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Caldo Tripticasa de Soja.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para que el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.**Caldo Triptona Soya:** Medio altamente

nutritivo para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes y recomendado para los ensayos de esterilidad y para uso general de laboratorio.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Caldo Triptona de Soja (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación deben haber 27.5 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de

		agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en tubos de ensayo estériles.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR TRIPTICASA DE SOJA.

2. OBJETIVOS:

OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Tripticasa de Soja.

3. ALCANCE:

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Triptona de Soja (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 40 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la

	calor.	preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en placas.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR DEXTROSA SABOURAUD.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Dextrosa Sabouraud.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Agar Dextrosa Sabouraud: El Agar Dextrosa Sabouraud es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras. El Agar de Dextrosa Sabouraud es una modificación a la fórmula original del Agar de Dextrosa desarrollado por Raymand Sabouraud. Este medio es utilizado para el cultivo de hongos patógenos, particularmente de aquellos asociados con infecciones de piel. La alta concentración de dextrosa y la acidez del pH hacen a éste un medio selectivo para hongos. Con la adición de cicloheximida, estreptomicina y penicilina, se obtiene un excelente medio para el aislamiento primario de dermatofitos. Este medio es también utilizado para la determinación microbiológica en cosméticos y para evaluar la presencia de hongos en alimentos. En este medio las peptonas proveen la fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos, la dextrosa actúa como fuente de energía y el agar es agregado como agente solidificante.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Dextrosa Sabouraud (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 65 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre

		la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en placas.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR DE INFUSIÓN CEREBRO – CORAZÓN.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar de Infusión Cerebro - Corazón.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Agar de Infusión Cerebro – Corazón: Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer. El agar es el agente solidificante. El agar cerebro corazón mantiene los mismos principios que el caldo para el cultivo de estreptococos y otras bacterias exigentes.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 2-30° C, hasta 5 años. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar de Infusión Cerebro – Corazón (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 37 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
		Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre

2	**Pesaje.**	la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir en tubos.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 24 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Almacenar y conservar los tubos, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8º C, hasta que el medio sea utilizado.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL AGAR: MUELLER HINTON**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para realizar la preparación del Agar: Mueller-Hinton.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

Cultivo: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección (el ambiente in vivo) por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio ambiente artificial en el laboratorio (in vitro).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

Agar Mueller-Hinton: El agar Mueller-Hinton es el medio utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en microorganismos aeróbicos por el método de Kirby-Bauer.

Este medio también es conocido como Agar M-H, y entre su composición se encuentra: Caseína ácida hidrolizada 17,50g, Infusión de carne de res o corazón 2,00g, Almidón soluble 1,50g, y Agar 17.00g

Condiciones necesarias para la preparación del agar Mueller-Hinton

pH del medio de cultivo: El agar debe tener un pH de 7,2 a 7,4 a temperatura ambiente.

Si el pH es menor de 7,2, parecerá que algunos antibióticos pierden potencia (por ejemplo, aminoglucósidos y macrólidos), mientras que otros agentes pueden mostrar una actividad excesiva (ej., tetraciclinas). Si el pH es mayor de 7,4 se espera el efecto opuesto.

Humedad: Si las placas a utilizar presentan humedad excesiva deben colocarse en una estufa (35 ºC) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos).

6. **METODOLOGÍA**: Realizar la preparación del medio de cultivo según las indicaciones de la etiqueta que en síntesis indica: pesaje, rehidratación, esterilización (autoclave) y distribución en cajas o tubos.

7. **DESARROLLO**:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Mueller-Hinton (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 38 g de polvo. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que

		también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla usando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Condiciones para su uso.**	Se debe examinar la esterilidad de una muestra representativa de cada partida de placas incubándolas a 35 ± 2ºC durante un mínimo de 24 horas. Se mide el pH del agar de Mueller-Hinton (7,3 ± 0.2), a temperatura ambiente (25ºC).
6	**Distribución del medio de cultivo.**	Verter con ayuda de una pipeta serológica 20 mL del medio recién preparado en una placa de Petri de vidrio o de plástico con fondo plano, colocadas sobre una superficie horizontal nivelada para obtener una profundidad uniforme de aproximadamente 4mm. Esto corresponde a unos 60 ml a 70 ml del medio para las placas cuyo diámetro sea de 150mm, y unos 25ml a 30 ml para las placas de 100 mm de diámetro.
7	**Control de calidad del medio de cultivo.**	Comprobar si hay signos de deterioro como: contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, o agrietamiento en el medio de cultivo. El control de calidad debe ser llevado a cabo con al menos un organismo que demuestre la actuación esperada. No usar si el resultado del control del microorganismo es incorrecto.

8	**Conservación y caducidad del agar Mueller-Hinton.**	Todos los contenedores deben ser mantenidos cerrados herméticamente y almacenados en un lugar seco a 25ºC o menos hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del envase. La duración de medio de cultivo es de 7 a 14 días.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL PATRÓN No. 5 DE MAC FARLAND.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del Patrón No. 5 de Mac Farland.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Patrón Mac Farland: Es una escala de turbidez, cuya finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Es la más usada, y se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1% y de cloruro de bario al 1,175%, para obtener soluciones con densidades ópticas específicas. El estándar 0,5 de Mac Farland, proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de 1-2x10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) /mL.

Densidad óptica: Es la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada.

Absorbancia: Es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra. Las medidas de absorbancia son frecuentemente usadas en química analítica, ya que la absorbancia es proporcional al grosor de una muestra y la concentración de la sustancia en ésta, en contraste a la transmitancia 1/10, la cual varía exponencialmente con el grosor y la concentración.

6. **METODOLOGÍA:** La preparación del Patrón Mac Farland se realiza a través de la mezcla de diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1% (V/V) y de cloruro de bario al 1,175% (p/V), para obtener soluciones con densidades ópticas específicas.

7. **DESARROLLO:**

<table>
<tr><th>ITEM</th><th>ACTIVIDAD</th><th>PROCEDIMIENTO</th></tr>
<tr><td>1</td><td>Preparación del material.</td><td>En una gradilla disponer de 1 tubo de ensayo grande, estéril y rotularlo.</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla No. 1.</td><td>Añadir una solución al 1% de cloruro de bario anhidro y una solución fría al 1% (en volumen) de ácido sulfúrico químicamente puro, según el siguiente cuadro:

Tabla No. 1
<table>
<tr><th>TUBO No.</th><th>Cl_2Ba (1%)</th><th>SO_4H_2 (1%)</th><th>U.F.C/ml</th></tr>
<tr><td>5</td><td>0,5</td><td>99,5</td><td>$1,5x10^8$</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>3</td><td>Calibración del Patrón No. 5 de Mc Farland por espectrofotometría.</td><td>Encender el turbidímetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar la suspensión en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.085 y 0.10.
Es conveniente verificar mensualmente la turbidez de dicho Patrón.</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Almacenamiento y Conservación.</td><td>Sellar los tubos y mantenerlos en refrigerador.
Cuando el fino precipitado blanco de sulfato de bario se sacude, cada tubo posee una densidad diferente que corresponde aproximadamente a cada suspensión bacteriana.</td></tr>
</table>

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para preparación del inóculo.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Inóculo: Es la cantidad o número de microorganismos infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales.

Control de calidad del inóculo: Toma en cuenta varias consideraciones:

- La cantidad de inóculo debe estar estandarizada por una técnica reconocida de modo que los controles sean comparables y reproducibles.
- No deje pasar más de 15 minutos después de preparar el inóculo.
- Chequear la solución salina por esterilidad.

6. **METODOLOGÍA:** El inóculo se prepara por suspensión de las cepas en solución salina, equivalente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland ($1\text{-}2 \times 10^8$ UFC/ml).

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Preparación del material.**	Se utilizará una cepa joven (ver protocolo No. 13-17), disponer de 1 tubo de ensayo, un aplicador y una cubeta para espectrofotómetro, solución salina. Todo el material a utilizar debe encontrarse estéril.
2	**Suspensión de la cepa en la solución salina.**	Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina en un tubo estéril. Utilizando un aplicador (estéril), tomar de cuatro a cinco colonias de la cepa seleccionada, de forma suave y tocando solamente la punta del aplicador. Suspenderlas en la solución salina al 0,85%, para lograr una suspensión turbia. Mezclar bien y tapar el tubo.
3	**Estandarización visual de la turbidez del inóculo.**	Comparar la turbidez de la suspensión del microorganismo con el Patrón No. 5 de Mac Farland, para lo cual se debe colocar juntos la suspensión bacteriana y el tubo de Mac Farland, observándolos contra un fondo de rayas negras. Es muy importante agitar bien los tubos antes de realizar este paso.
4	**Verificar la turbidez de la suspensión a través del turbidímetro.**	Es conveniente además el uso de un instrumento como el turbidímetro para realizar el control de calidad. Encender el turbidímetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar el inóculo en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.085 y 0.10, adecuada para realizar el antibiograma. Si la suspensión bacteriana no presenta inicialmente la turbidez deseada, se la

		puede diluir o agregarle más microorganismos, según sea necesario.

1. TÍTULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Staphylococcus aureus.*

2. OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de *Staphylococcus aureus.*

3. ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

Cultivo microbiano: El cultivo microbiano es un método para la multiplicación de células o microorganismos, en el que se prepara un medio óptimo que consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada para favorecer el proceso deseado; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento microbiano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

Fase exponencial: Parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

Microorganismos Liofilizados: Se trata de microorganismos a los cuales se les ha extraído el agua por sublimación previa congelación, bajo condiciones de alto vacío. Su

ventaja radica en que los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

Caracterización de bacterias: Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la realización de pruebas específicas. Un aspecto crítico en la caracterización de los microorganismos lo constituye la valoración de que estos están biológicamente puros, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes

Viabilización de microorganismos: La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, desarrollando sus funciones de una manera normal.

6. **METODOLOGÍA:** La conservación se la realiza mediante transferencia periódica de la ***Staphylococcus aureus*** **ATCC 25923**, con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial).

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**	Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en *American Type Culture Collection* **(ATCC).**
2	**Recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Cultivo primario.**	**1.** Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2.** Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. **3.** Saturar inmediatamente un hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Chapman manitol, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hiposo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento

		4. Incubar inmediatamente el medio de Chapman manitol inoculado, a 37°C durante 24 horas Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas
3	**Obtención del cultivo secundario de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Chapman manitol, especifico para ***Staphylococcus aureus***. Incubar a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados.**	El Control de Calidad de ***Staphylococcus aureus*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *Staphylococcus aureus* Al cultivo de trabajo obtenido se le realizan pruebas bioquímicas específicas observándose cada una de las siguientes características propias de las bacterias como lo son: **Tinción Gram:** cocos gram positivos dispuestos en tétradas, con morfología celular redondas. **Prueba de la Catalasa:** positiva, **Prueba de Coagulasa:** positiva.

1. **TÍTULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Escherichia coli.***

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de ***Escherichia coli.***

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Cultivo microbiano: El cultivo microbiano es un método para la multiplicación de células o microorganismos, en el que se prepara un medio óptimo que consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada para favorecer el proceso deseado; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento microbiano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

Fase exponencial: Parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

Microorganismos liofilizados: Se trata de microorganismos a los cuales se les ha extraído el agua por sublimación previa congelación, bajo condiciones de alto vacío. Su ventaja

radica en que los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

Caracterización de bacterias: Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la realización de pruebas específicas. Un aspecto crítico en la caracterización de los microorganismos lo constituye la valoración de que estos están biológicamente puros, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes

Viabilización de microorganismos: La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, desarrollando sus funciones de una manera normal

6. **METODOLOGÍA:** La conservación se la realiza mediante transferencia periódica de la ***Escherichia coli* 25922**, con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial)

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Escherichia* coli ATCC 25922.**	Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en *American Type Culture Collection* **(ATCC).**
2	**Recuperación de *Escherichia coli* ATCC 25922 Cultivo primario.**	**1.** Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2.** Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. **3.** Saturar inmediatamente el hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Agar Mac Conkey, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hiposo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento **4.** Incubar inmediatamente el medio de

		Agar Mac Conkey inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas
3	**Obtención del cultivo secundario de *Escherichi coli* ATCC 25922.**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, especifico para *Escherichia* coli. Incubar a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados.**	El Control de Calidad de ***Escherichia coli*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *Escherichia* coli. Al cultivo de trabajo obtenido se le realizan pruebas bioquímicas específicas observándose cada una de las siguientes características propias de la bacteria como lo son: **Tincion de Gram:** bacilos gram negativos, cortos. **Cultivo:** planas, lisas, circulares, convexas, secas, rosadas con un área circundante de color rosa más oscuro. **TSI:** Fermentadoras de lactosa y glucosa, K/K **Indol:** Positivo, **SIM:** positiva, **Citrato:** negativo.

		Lisina: positiva. **Fenilalanina:** negativa.

1. TÍTULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae.*

2. OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de ***Klebsiella pneumoniae.***

3. ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

Cultivo microbiano: El cultivo microbiano es un método para la multiplicación de células o microorganismos, en el que se prepara un medio óptimo que consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada para favorecer el proceso deseado; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento microbiano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

Fase exponencial: Parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

Microorganismos liofilizados: Se trata de microorganismos a los cuales se les ha extraído el agua por sublimación previa congelación, bajo condiciones de alto vacío. Su ventaja

radica en que los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

Caracterización de bacterias: Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la realización de pruebas específicas. Un aspecto crítico en la caracterización de los microorganismos lo constituye la valoración de que estos están biológicamente puros, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes.

Viabilización de microorganismos: La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, desarrollando sus funciones de una manera normal.

6. **METODOLOGÍA:** La conservación se la realiza mediante transferencia periódica de la ***Klebsiella pneumoniae*** **ATCC 13883**, con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial)

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.**	Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en *American Type Culture Collection* **(ATCC).**
2	**Recuperación de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 Cultivo primario.**	**1.** Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2.** Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. **3.** Saturar inmediatamente un hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de sangre, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. **4.** Use el mismo hiposo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento

		5. Incubar inmediatamente el medio de MacConkey inoculado, a 37°C durante 24 horas Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas
3	**Obtención del cultivo secundario de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, especifico para *Klebsiella* pneumoniae. Incubar a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados.**	El Control de Calidad de ***Klebsiella pneumoniae*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de ***Klebsiella pneumoniae.*** Al cultivo de trabajo obtenido se le realizan pruebas bioquímicas específicas observándose cada una de las siguientes características propias de las bacterias como lo son: **Tinción Gram:** se observa la presencia de bacilos Gram negativos, pequeños, que están unidos en pares y en cadenas cortas **Cultivo:** Colonias: grandes, lisas, circulares, convexas, con bordes bien definidos y muy muciodes, **TSI:** No fermentan ni lactosa, oxidan glucosa. N/K. **Lisina:** positiva **Citrato:** positiva **Úrea:** positiva **Catalasa:** positiva **Gas:** positiva **Fenilalanina:** negativo

		SH2: negativo. **Indol:** negativo

1. **TÍTULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Pseudomona aeruginosa.***

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de ***Pseudomona aeruginosa.***

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Cultivo microbiano: El cultivo microbiano es un método para la multiplicación de células o microorganismos, en el que se prepara un medio óptimo que consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada para favorecer el proceso deseado; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento microbiano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

Fase exponencial: Parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

Microorganismos liofilizados: Se trata de microorganismos a los cuales se les ha extraído el agua por sublimación previa congelación, bajo condiciones de alto vacío. Su ventaja

radica en que los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

Caracterización de bacterias: Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la realización de pruebas específicas. Un aspecto crítico en la caracterización de los microorganismos lo constituye la valoración de que estos están biológicamente puros, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes

Viabilización de microorganismos: La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, desarrollando sus funciones de una manera normal

6. **METODOLOGÍA:** La conservación se la realiza mediante transferencia periódica de la ***Pseudomona* aeruginosa ATCC 27853**, con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial)

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.**	Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en *American Type Culture Collection* **(ATCC).**
2	**Recuperación de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 Cultivo primario.**	**1.** Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2.** Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. **3.** Saturar inmediatamente el hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Agar Cetrimide, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hiposo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento

		4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Cetrimide inoculado, a 37°- 42°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas
3	**Obtención del cultivo secundario de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Cetrimide, especifico para Pseudomona aeruginosa. Incubar a 37°C durante 24 - 48 horas. Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados.**	El Control de Calidad de ***Pseudomona aeruginosa*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de ***Pseudomona aeruginosa*** Al cultivo de trabajo obtenido se le realizan pruebas bioquímicas específicas observándose cada una de las siguientes características propias de las bacterias como lo son: **Tinción Gram:** se observa la presencia de bacilos Gram negativos, pequeños delgados, que están unidos en pares y en cadenas cortas **Cultivo:** colonias, redondas, lisas, rugosas, mucoides, gelatinosas y enanas de color verde fluorescente. Con frecuencia produce, a veces un olor que semeja al de uvas fermentadas, por la producción de trimetilaminas. Es la única especie que segrega piocianina, que es de color azul, y pioverdina o fluoresceína, que va de amarillo verdoso a amarillo café. La combinación de los dos da el color verde asociado con la

		mayoría de las cepas de P. aeruginosa **TSI:** No fermentan lactosa, oxidan glucosa. N/K **SIM:** positivo **Lisina:** negativa **Oxidasa:** positiva **Catalasa**: positiva

1. **TÍTULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Candida albicans.***

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de ***Candida albicans.***

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Cultivo microbiano: El cultivo microbiano es un método para la multiplicación de células o microorganismos, en el que se prepara un medio óptimo que consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada para favorecer el proceso deseado; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento microbiano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

Microorganismos liofilizados: Se trata de microorganismos a los cuales se les ha extraído el agua por sublimación previa congelación, bajo condiciones de alto vacío. Su ventaja radica en que los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

Viabilización de microorganismos: La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, desarrollando sus funciones de una manera normal.

6. **METODOLOGÍA:** La conservación se la realiza mediante transferencia periódica de la ***Candida albicans ATCC 26790***, con el fin de mantenerlas viables.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Candida albicans ATCC 26790.***	Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en *American Type Culture Collection* **(ATCC).**
2	**Recuperación de *Candida* albicans *ATCC 26790 Cultivo primario.***	**1.** Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2.** Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. **3.** Saturar inmediatamente un hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Sabouraud, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hiposo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Sabouraud inoculado, a 37°C durante 24-48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas

3	**Obtención del cultivo secundario de *Candida albicans ATCC 26790.***	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de de Sabouraud, especifico para ***Candida albicans***. Incubar a 37°C durante 48 horas. Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Candida albicans*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y pruebas específicas de la misma. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de ***Candida* albicans**. **Cultivo.-** Colonias de color blanco o crema, consistencia opaca, elevadas, lisis, brillantes o mates, olor a levadura. **KOH 20%:** levaduras solas o en gemación **Test de filamentación:** positivo

1. **TÍTULO: PREPARACION DE DISCOS DE SENSIBILIDAD.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la elaboración de los discos de sensibilidad.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Extracto vegetal: Es el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes como el alcohol.

Etanol: El Etanol o alcohol etílico es un compuesto líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua cuyas moléculas se componen de carbono, hidrógeno e hidróxilos (CH3-CH2-OH).

Discos de sensibilidad: Se tratan de pequeños discos de papel filtro los cuales contienen una cantidad específica del antimicrobiano (con posibles principios activos antimicrobianos).

Dilución: Es diluir un volumen conocido de soluto en un volumen conocido del solvente. Es la obtención a partir de una sustancia dada en dilución a una concentración conocida.

6. **METODOLOGÍA:** La impregnación se realiza por absorción directa del extracto de la planta en el papel filtro en condiciones estandarizadas.

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de los discos.**	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN Nº 1 de 6 mm de diámetro.
2	**Esterilización de los discos.**	Esterilizar los discos colocándolos en una caja petri estéril en la cabina de flujo laminar mediante rayos ultravioleta (UV), por el lapso de dos horas.
3	**Impregnación del extracto. Vegetal.**	Utilizar la caja petri, y colocar una malla metálica estéril en esta, a su vez colocar los discos estériles, impregnarlos con 10 ul, luego eliminar el solvente con la ayuda de una secadora y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de dilución, realizar el mismo procedimiento con cada una de las diluciones.
4	**Elaboración de controles negativos.**	Colocar un disco de papel filtro WHATMAN Nº 1 de 6 mm de diámetro en una caja petri que va a contener la malla metálica estéril e impregnarlo con 10 ul de etanol al 70%, luego eliminar el solvente con la ayuda de una secadora y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de etanol al 70%.
5	**Controles positivos.**	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCOS**.

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Sensibilidad antimicrobiana: El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.

Discos de sensibilidad: Se tratan de pequeños discos de papel filtro los cuales contienen una cantidad específica del antimicrobiano (con posibles principios activos antimicrobianos.)

Difusión de discos: Su utilización está limitada a bacterias aerobias y anaerobias facultativas de crecimiento rápido, en este caso se aplica un disco que contiene una cantidad específica de antimicrobiano, en una superficie del agar que ha sido recientemente inoculada con un microorganismo. El antimicrobiano difunde en el medio a partir del disco de una zona de inhibición en el punto al que una concentración crítica del antimicrobiano en el medio inhibe el crecimiento del microorganismo en un momento de tiempo determinado de 18 a 24 horas.

6. **METODOLOGÍA:** Para determinar la sensibilidad antimicrobiana, se utilizará la técnica de difusión en discos, cuyos pasos se mencionan a continuación.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Inoculación de las placas.**	- Una vez preparados los medios de cultivo (ver protocolo N°2-9), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente. - Rotular los medios de cultivo. - Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inóculo (ver protocolo Nº 12), se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton (ver protocolo Nº 10), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar. - La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antimicrobiano (solución de extracto seco de drogas vegetales).
2	**Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada.**	- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (ver protocolo Nº 18), sobre la superficie inoculada del agar. - Realizar por triplicado en la misma caja. - Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. - Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera

		equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm. - Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.
3	**Incubación**	- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35ºC ± 2ºC (las temperaturas de >35ºC pueden impedir la detección de estafilococos a meticilina) antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos. - Para la incubación no se debe apilar muchas cajas porque la distribución del oxígeno no sería igual, tanto en la parte superior como en la inferior, es decir; no habría una adecuada recirculación de oxígeno.
4	**Lectura de los resultados**	- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura. - Las placas se examinan después de 18 a 24 horas de incubación. - Si la placa se estrió como corresponde y el inoculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares. - Si se observan colonias aisladas, significa que el inoculo estaba diluido y la prueba debe repetirse. - Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.
5	**Interpretación de los resultados**	- ‹ 6mm Negativo (Resistente) - 6 – 9 mm‹ Intermedio - › 9mm Positivo (Sensible)

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCOS.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Sensibilidad antimicrobiana: El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.

Discos de sensibilidad: Se tratan de pequeños discos de papel filtro los cuales contienen una cantidad específica del antimicrobiano (con posibles principios activos antimicrobianos.)

Difusión de discos: Su utilización está limitada a bacterias aerobias y anaerobias facultativas de crecimiento rápido, en este caso se aplica un disco que contiene una cantidad especificada de antimicrobiano, en una superficie del agar que ha sido recientemente inoculada con un microorganismo. El antimicrobiano difunde en el medio a partir del disco de una zona de inhibición en el punto al que una concentración crítica del antimicrobiano en el medio inhibe el crecimiento del microorganismo en un momento de tiempo determinado de 18 a 24 horas.

6. **METODOLOGÍA:** Para determinar la sensibilidad antimicrobiana, se utilizará la técnica de difusión en discos, cuyos pasos se mencionan a continuación.

7. **DESARROLLO**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Inoculación de las placas.**	- Retirar el medio de trabajo de la refrigeradora y mantenerlo a temperatura ambiente. - Rotular el medio de cultivo de trabajo. - Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo (ver protocolo Nº 12), se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Sabouraud (ver protocolo Nº 008), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar. - La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antimicrobiano (solución de extracto seco de drogas vegetales).
2	**Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada.**	- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (ver protocolo Nº 18), sobre la superficie inoculada del agar. - Realizar por triplicado en la misma caja. - Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. - Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no

		debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm. - Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.
3	**Incubación**	- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35ºC ± 2ºC (las temperaturas de >35ºC pueden impedir la detección de estafilococos a meticilina) antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos. - Para la incubación no se debe apilar muchas cajas porque la distribución del oxígeno no sería igual, tanto en la parte superior como en la inferior, es decir; no habría una adecuada recirculación de oxígeno.
4	**Lectura de los resultados**	- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura. - Las placas se examinan después de 48 horas de incubación. - Si la placa se estrió como corresponde y el inoculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares. - Si se observan colonias aisladas, significa que el inoculo estaba diluido y la prueba debe repetirse. - Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.
5	**Interpretación de los resultados**	- ‹ 6mm Negativo (Resistente) - 6 – 9 mm‹ Intermedio - › 9mm Positivo (Sensible)

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA EN LA EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la realización de la concentración mínima inhibitoria en la evaluación antimicrobiana.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5. **DEFINICIONES:**

Antibiótico: Sustancia antimicrobiana obtenida por cultivo de un microorganismo o producida semisintéticamente que se utiliza en el tratamiento de las infecciones. También está relacionado con la capacidad de destruir o impedir el desarrollo de un organismo vivo.

Sensibilidad: Susceptibilidad a una sustancia como un fármaco o un antígeno.

Actividad bacteriostática: Valor de la actividad antimicrobiana que inhibe el crecimiento de un microorganismo. Se determina in vitro enfrentando una concentración estándar de microorganismo con una serie de diluciones de antimicrobianos.

Actividad bactericida: Valor de la actividad antimicrobiana que destruye a un microorganismo determinado. Se determina in vitro enfrentando una concentración estándar de microorganismos con una serie de diluciones de antimicrobianos.

CMI: Un antibiótico se considera activo frente a una bacteria cuando inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa in vitro determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo.

Técnicas de realización: Para evaluar la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico in vitro se puede determinar mediante técnicas de dilución en medio líquidas, en medio sólidas o por técnicas de gradiente de difusión, como el Épsilon-test. Todos estos métodos requieren una rigurosa estandarización del medio de cultivo, del inoculo bacteriano, de la temperatura, la atmósfera, el tiempo de incubación y de los criterios de lectura.

6. **METODOLOGÍA:** La concentración mínima inhibitoria se realiza luego de obtener los extractos que tuvieron inhibición por el método doble dilución de agar, realizando diluciones de la solución en la cual se inhibió el crecimiento.

7. **DESARROLLO**:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Dilución del inoculo.**	Se prepara el inoculo con las cepas en solución salina a una concentración similar al patrón 0.5 de la escala de MarFarland, al cual se diluye 1/200 obteniendo una concentración microbiana final de 10^5 -10^6
2	**Preparación de subdiluciones.**	Se colocan 8 tubos con 3 ml del caldo tripticasa soja, en el primer tubo se adiciona 1 ml del extracto que presente inhibición en la actividad antimicrobiana, de este se extrae 1 ml y se realizan las diluciones sucesivas de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 hasta el tubo 6. En el tubo 7 se coloca un antibiótico conocido para el control positivo y en último tubo se adiciona 1ml de etanol al 70% que nos servirá como blanco.
3	**Preparación de las muestras.**	En las diluciones anteriores se colocan en los 8 tubos 1ml del inoculo que presenta una concentración microbiana de 10^5 - 10^6.

4	**Incubación.**	Se incuba durante 24 horas a 37 ºC.
5	**Lectura de resultados.**	Se leen los resultados, en los que se considera como CMI la del tubo con mayor dilución del extracto que no presente aumento de turbidez respecto al tubo testigo utilizado como blanco.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA BACTERICIDA EN LA EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la realización de la concentración mínima bactericida en la evaluación antimicrobiana.

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

Antibiótico: Sustancia antimicrobiana obtenida por cultivo de un microorganismo o producida semisintéticamente que se utiliza en el tratamiento de las infecciones. También está relacionado con la capacidad de destruir o impedir el desarrollo de un organismo vivo.

Sensibilidad: Susceptibilidad a una sustancia como un fármaco o un antígeno.

Actividad bacteriostática: Valor de la actividad antimicrobiana que inhibe el crecimiento de un microorganismo. Se determina in vitro enfrentando una concentración estándar de microorganismo con una serie de diluciones de antimicrobianos.

Actividad bactericida: Valor de la actividad antimicrobiana que destruye a un microorganismo determinado. Se determina in vitro enfrentando una concentración estándar de microorganismos con una serie de diluciones de antimicrobianos.

CMB: la menor concentración de un antimicrobiano que reduce la población de un microorganismo a 0.1% o menos del número de células presentes en el inoculo original se conoce como concentración mínima bactericida o letal para al menos el 99.9% del inoculo original.

Variables biológicas de las pruebas del CMB:

Fenómeno de persistencia: Se trata de un pequeño número de bacterias del inoculo bacteriano persistentes que sobreviven a la exposición del antibiótico, pero siguen siendo sensibles si se vuelven a estudiar frente al antibiótico.

Efecto paradójico: En el cual la proporción de supervivientes se incrementa con la concentración de antibióticos.

Tolerancia: Los microorganismos tolerantes son aquellos en los que la viabilidad se pierde lentamente y aquellos en los que la respuesta bacteriostática-bacteriolítica frente a los antibióticos se modifica en la dirección de la bacteriostática.

6. **METODOLOGÍA:** La concentración mínima bactericida se obtiene de la concentración del tubo con menos concentración de extracto que niegue el crecimiento sobre el medio sólido.

7. **DESARROLLO**:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de resultados del CMI.**	Para la realización de las pruebas del CMB primero se debe obtener el resultado sobre el procedimiento de CMI para poder utilizarlos en el mismo.
2	**Sembrado.**	Se realizan siembras a partir de los resultados del CMI en Agar Mueller Hinton y Agar Sangre del tubo de la dilución en el que presento la menor concentración inhibitoria y de los tubos mayor y menor de la dilución antes mencionada.
3	**Incubación.**	Luego de sembrar en los agares se debe incubar a una temperatura de 37ºC por 24 horas y observar los resultados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- http://www.mografias.com/trabajos13/manubio.shtml
- http://capra.iespana.es/capra/bioseguradad/bioseguridad.html
- http://www.qb.fcen.uba.ar/microinumo/higieneyseguridad.htm
- Koneman, E. Diagnostico microbiológico, Editorial médico panamericana, 110 - 111.
- BAILEY & SCOTT DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO, Forbes, Sahm, Weissfeld, 11ª Ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires – Argentina, 2004. Págs. 137, 140, 144.
- MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, Lennette, Balows, Hausler, Shadomy, 4ta Ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires – Argentina, 1989. Pág. 1285.
- www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/.../**pdf**/p11.**pdf** -
- www.britanialab.com.ar/esp/.../**sangreagar**base.htm -
- Revista Cubana Higiene y Epid 2004; 42(1): Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM)
- scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375...script=sci_arttext –
- http://www.rlc.fao.org/es/inocuidad/codex/rla3014/pdf/presen3.pps
- www.mcd.com.mx/pdfs/**AGAR**%20SAL%20Y%20**MANITOL**.pdf –
- www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/**Cetrimide_agar** -
- www.mcd.com.mx/.../**AGAR**%20**DEXTROSA**%20SABORAUD.pdf -
- BAUER, A. W., KIRBY W. M. M., SHERRIS, J. C., o. TURCK, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. - Amer. J. Clin. Pathol., 45; 493-496 (1966).
- www.mastgrp.com/IFUS/IFU335_SPA.pdf
- perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm –
- es.wikipedia.org/wiki/**Absorbancia** –
- es.wikipedia.org/wiki/**Densidad_óptica** –

- www.monografias.com › Salud › General –
- html.rincondelvago.com/evaluacion-del-**control-de-calidad**-interno.html –
- www.monografias.com › Biologia –
- Fisiología y Metabolismo Bacteriano Gustavo Varela.
- Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. Norma aprobada, décima edición M02-A10 Vol. 29 No. 1 Enero 2009 Reemplaza a M02-A9.
- Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) Sandra Parra, María Pérez, Mauricio Morales, Zulma Suárez, Dolly Montoya. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.
- Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay Vacci Monitor 2009; Año 18 No. 1
- Patentabilidad de los extractos vegetales. José Pardo Zapata. Mayo 2002.
- Normas de seguridad Núria Borrell Xavier Mesquida Pedro Alomar ©2001 Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 84-607-3050-6
- Acar JF, Goldstein FW. Disk susceptibility test. En: Lorian V, de. Antibiotics in laboratory medicine, 4ª de. Baltimore, Williams and Wilkins, 1996; 1-51.

ANEXO III

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE TRABAJO

Laboratorio de Fotoquímica del Área de la Salud Humana

Extracto seco

Pesaje

Etanol al 70% v/v agua

Dilución-Extracto

Filtración

Diluciones: 1/100, 1/100, 1/1000

Homogenizar

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana

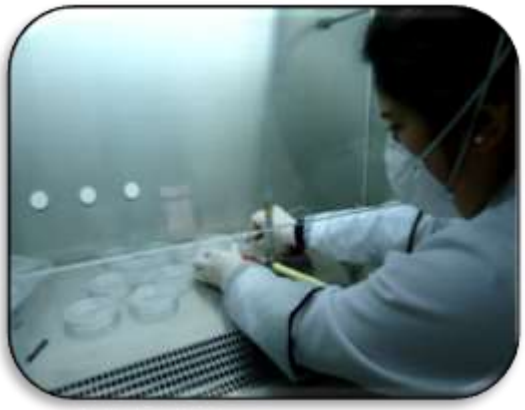
Pesaje

Verter en un matraz

Hidratación del medio

Esterilización mediante autoclave

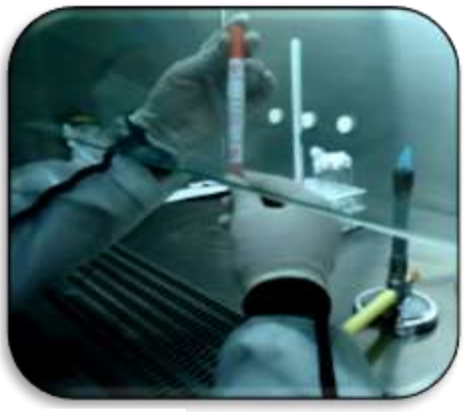
Listo para verter en cajas



Vertiendo el medio

VIABILIZACIÓN DE LAS CEPAS MICROBIANAS

Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana



Cepas ATCC

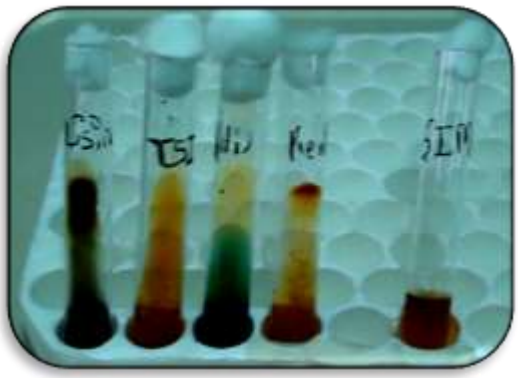
Reconstitución-Caldo Cerebro Infusión 0.5ml

Cepas Microbianas

Siembra por estriación en medios de cultivo

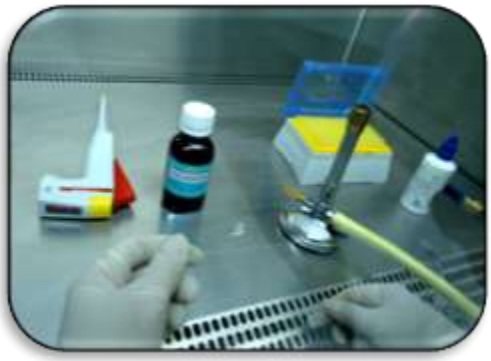
PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PARA BACTERIAS Y HONGOS

Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana



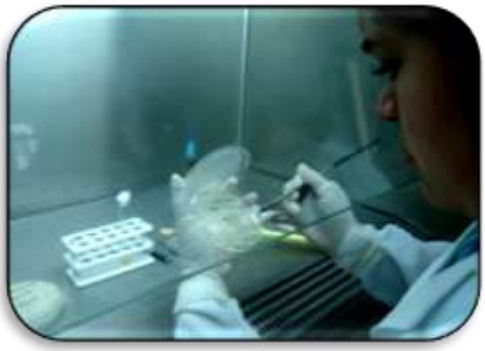
Pruebas Bioquímicas

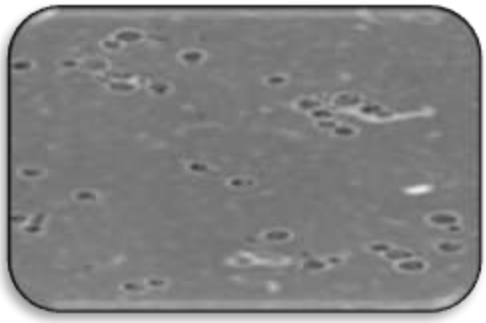
Tinción de Gram



Prueba de la Catalasa

Prueba de la Coagulosa

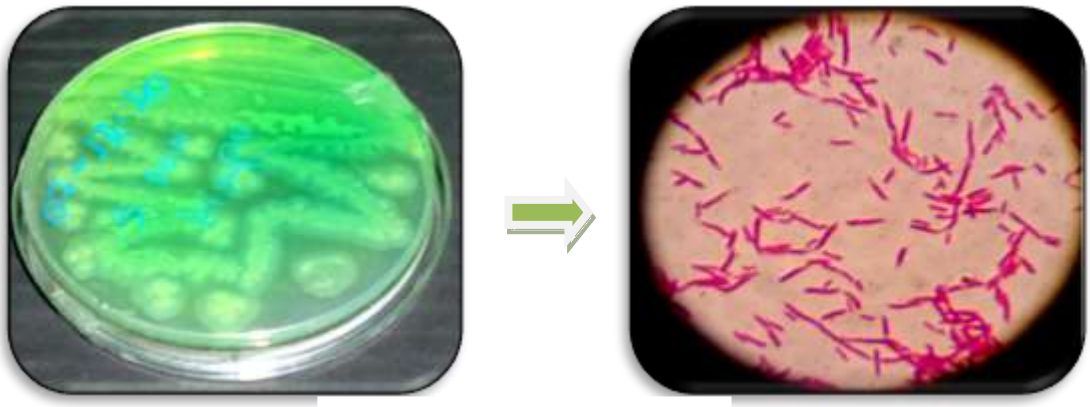




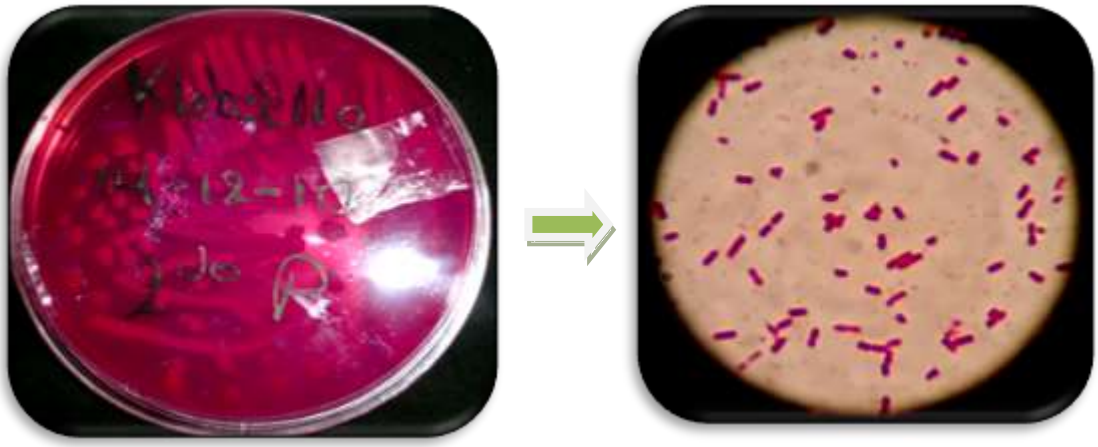
Prueba del Tubo Germinal

CEPAS VIABILIZADAS

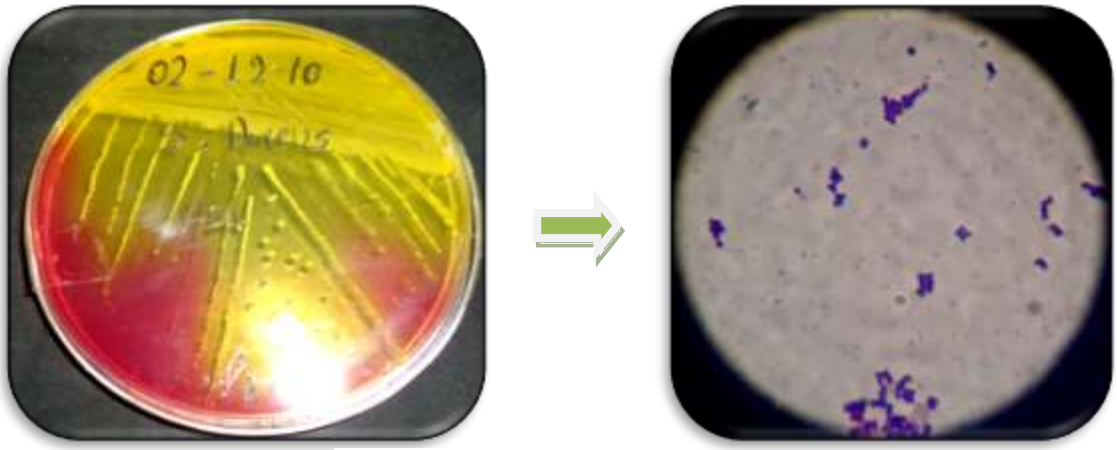
Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana



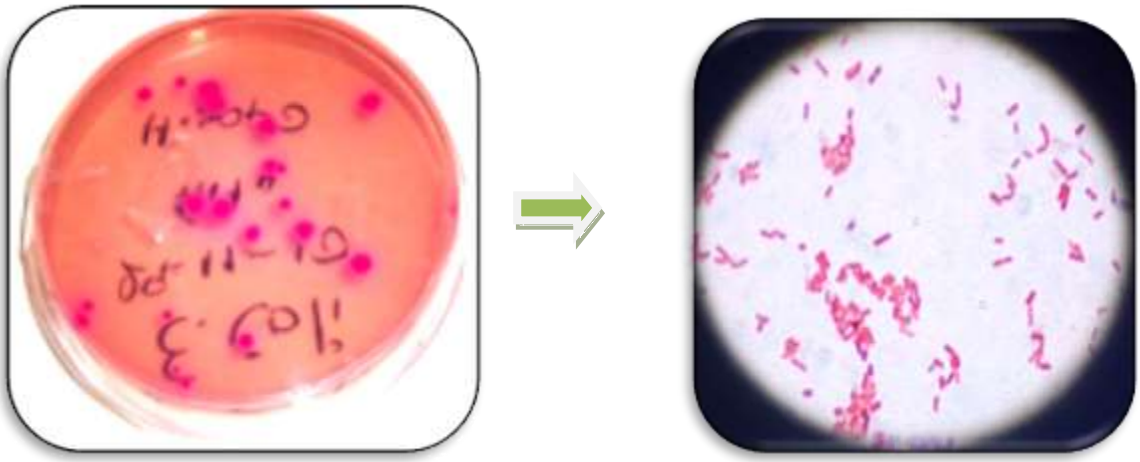
P. aeruginosa



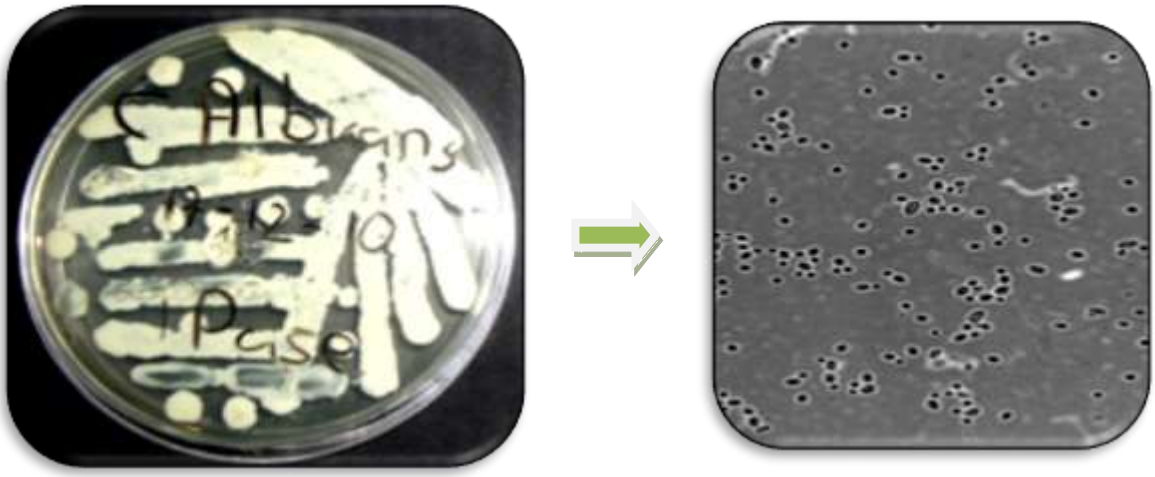
K. pneumoniae



S. aureus



E. coli

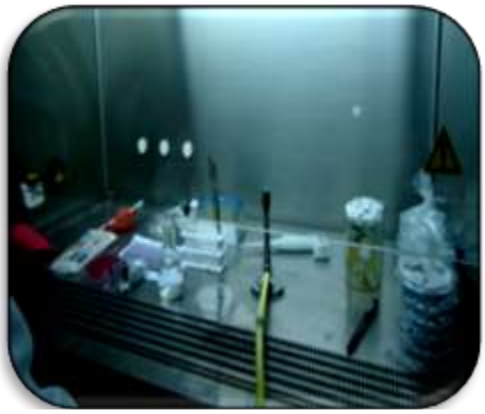


C. albicans

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana

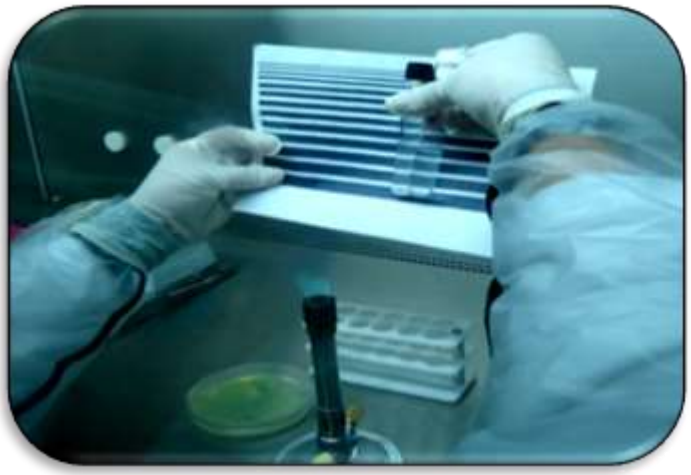
Preparación del inóculo



Material listo

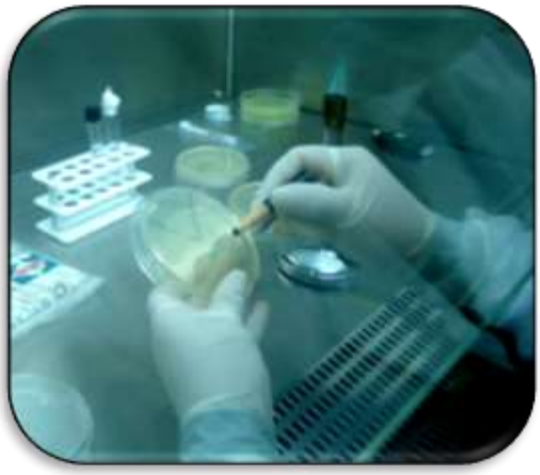
Solución salina 0.9%

Colonias microbianas



Comparación con el tubo N °5 MacFarland

Inoculación de las placas



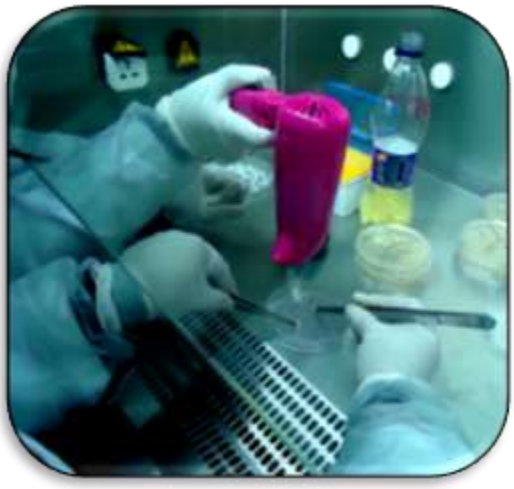
Rotulación

Empapar el hisopo

Siembra

Discos

Impregnación de discos con los extractos

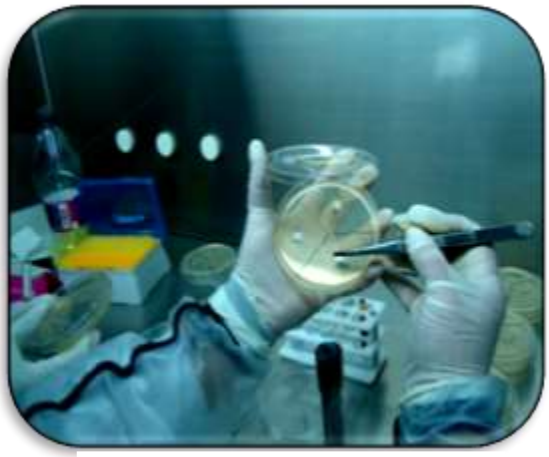


Evaporación del solvente

Colocación de discos y controles

Discos con los extractos

Control positivo



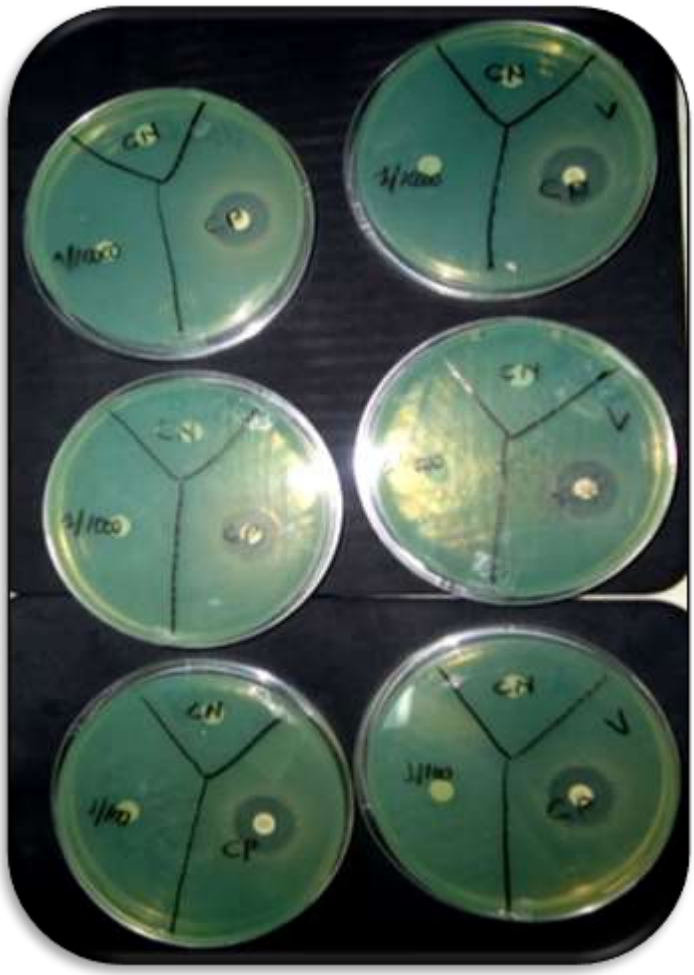
Control negativo

Incubación a 37°C durante 24 horas en el caso de las bacterias, y 48 horas para el hongo

RESULTADOS

Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana

Medición de halos



DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Aula Magna del Área de la Salud Humana