UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÀREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÌNICO

TÍTULO

Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de la flor de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar.

Proyecto de Tesis previo a la obtención del título de Licenciado de Laboratorio Clínico

AUTOR:

Diego Michael Rey Curay

DIRECTOR:

Doc.: Tito Carrión Dávila

LOJA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR

Doctor.
Tito Goberth Carrión Dávila
Docente del Área de la Salud Humana.

CERTIFICA:

Que luego de haber revisado la tesis previa a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico con el tema: **Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Antimicótica de tres extractos de la flor de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar**, de autoría de Diego Michael Rey Curay, puedo manifestar que el presente trabajo cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, por lo que autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa pública.

Dr. Tito Goberth Carrión Dávila
DIRECTOR DE TESIS.

Diego Michael Rey Curay.
AUTOR.

AUTORÍA

Yo Diego Michael Rey Curay declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y su Área de la Salud Humana, así como a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma

Diego Michael Rey Curay
Nro. De cedula 1900498963

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR, PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.

Yo **Diego Michael Rey Curay** declaro ser autor (a) de la tesis titulada: **"Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar"**, como requisito para optar al grado de: Licenciado en Laboratorio Clínico; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los primeros días del mes de junio del dos mil catorce, firma el autor.

Firma: _____

Autor: Diego Michael Rey Curay

Cédula: 1900498963

Dirección: Barrio El Remolino en la provincia de Zamora Chinchipe en la calle pangui frente a la escuela Maria Montessori. **Correo Electrónico**: churobsc@hotmail.com.

Teléfonos: 072-606-544 **Celular:** 099-345-2911

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Doctor: Tito Carrión Dávila

Tribunal de Grado: Dra. Alba Pesantes

Dra. Elvia Ruiz

Dra. Susana González

DEDICATORÍA

Con mucho amor y agradecimiento dedico esta Tesis de grado a mi madre Rosa Marlene Rey Curay, Por el apoyo, confianza que me brinda no solo en la realización de este trabajo sino durante todos mis años vida y de estudio, sé que estará orgullosa de que el esfuerzo realizado durante su vida, este reflejado de la mejor manera en mí. A mi abuelita, que de una u otra manera han estado conmigo en los momentos más importantes de mi vida. Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A una persona muy especial que llego a mi corazón como un *Ángel* y cambio mi vida mi negrita preciosa Narcisa Maldonado. A mis tías (os), primos (as), amigos y a todas aquellas personas a mí alrededor que ayudaron y aportaron en mi trabajo no solo en la realización de este trabajo sino durante todos mis años.

Diego Michael Rey Curay

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS por ser la principal fuente de inspiración diaria para no redirme en la adversidades de la vida, y permitirme estar siempre con salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre, abuelita y familiares por su apoyo incondicional, que han brindado e hicieron posible la culminacion de esta investigacion.

A la Universidad Nacional de Loja, por acogernos en sus aulas y darnos la oportunidad de salir como profesionales en beneficio propio y de la sociedad y de manera particular a la Carrera de Laboratorio Clínico, por ser formadores de profesionales excelente y humana capacidad sufiencte para ejercer mis deberes profesionales.

A los directivos del centro de análisis Químico del Laboratorio de la Unidad de Fitoquímica y Microbiologia de la UNL. Al Dr. Luis Morocho, por permitirme ser parte de esta investigación, por su valiosa asesoría, dedicación y profesionalismo, para la formacion de mi tesis; de igual manera a la Dra. Claudia Cruz, por su paciencia, y conocimientos impartidos diariamente en todo el desarrollo del proyecto.

A mi Director de Tesis Doctor: Tito Carrión Dávila por brindarme su apoyo quien con su dirección y asesoramiento inquebrantable me permitió lograr la culminación de mi trabajo de manera satisfactoria

Finalmente a los licenciados y doctores aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis

TÍTULO:

Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar.

RESUMEN

La presente investigación se realizo en el Laboratorio de Analisis Quimico de la Universidad Nacional de Loja, en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología y Fitoquimica, con finalidad de evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de la flor de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar

En la Provincia de Zamora Chinchipe se recolecto la planta en estudio *Hippobroma longiflora* éstas son utilizadas por los sanadores de las comunidades Shuar, por eso las hojas son usadas para lavar heridas y las flores son consideradas antipirético. También una de las propiedades de esta planta es considerada como analgésico, por algunas de las comunidades que también la saben utilizarlo en algunas bebidas, porque tienen sustancias alucinógenas en especial los chamanes.

Por tal motivo se direcciono la realización de esta investigación con el fin de promover los conocimientos ancestrales de las comunidades Shuar de la Región Sur del Ecuador, apoyándonos en la clínica y la tecnología potenciando la seguridad de las plantas en diferentes grupos étnicos y disponer de herramientas para implementar estrategias de desarrollo, ya que estas no se las reconoce científicamente.

Para la realización de este estudio se prepararon tres diluciones en 1/100, 1/1.000 y 1/10.000, con los solventes Hexanico, Etanólico al (70%) y Acuoso de los extractos liofilizados de la Flor de *Hippobroma Longiflora.* Con las presentes diluciones se evaluó la actividad antibacteriana y antimicótica mediante el método Kirby Bauer modificado frente cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *y Cándida albicans* (ATCC 26790). Este método se fundamenta en utilizar un disco de papel filtro impregnado con la sustancia ensayada en las diluciones de los extractos, para después ser colocado en las cajas de agar Muller Hinton anteriormente inoculada con el microorganismo de referencia, se llevan a incubación y luego de 24 horas se lee los resultados evaluando el diámetro de los halos de inhibición.

De acuerdo a la metodología empleada, las diluciones de la planta Hippobroma Longiflora parte de estudio las Flores no presentan actividad antibacteriana ni

antimicótica; los mismos resultados que se dieron a conocer en primera instancia a los estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Palabras clave: *Hippobroma longiflora,* actividad antimicrobiana, antifúngica y difusión en agar.

SUMMARY

This research was conducted at the Chemical Analysis Laboratory of the National University of Loja, in the Laboratory of Microbiology and Phytochemistry Unit, in order to evaluate the antibacterial and antifungal activity of three extracts Hippobroma Flower longiflora (L.) G. Don (Cholo brave) by the agar diffusion method.

In the province of Zamora Chinchipe plant was collected in study Hippobroma longiflora these are used by healers Shuar communities so the leaves are used to clean wounds and flowers are considered antipyretic and decongestant. Also one of the properties of this plant is considered as anti-inflammatory or analgesic, for some of the communities that also know how to use in some drinks because they have especially hallucinogens shamans.

For this reason was routed to conduct this research in order to promote the ancestral knowledge of the Shuar communities in the Southern Region of Ecuador relying on clinical and safety enhancing technology of plants in different ethnic groups and have the tools to implement development strategies as these are not recognized scientifically.

For this study three dilutions were prepared in 1/100, 1/1000th and 1:10,000, with solvents hexane, ethanolic (70%) and lyophilized aqueous extracts of Hippobroma longiflora flower. With these dilutions was assessed antibacterial and antifungal by Kirby Bauer method modified against Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Klebsiella pneumoniae (ATCC 13883), Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) and Candida albicans (ATCC 26790). This method is based on using a filter paper disc impregnated with the test substance in the dilutions of the extracts, and then be placed in boxes Muller Hinton agar inoculated with the microorganism above reference, is carried incubation and after 24 hours reads the results evaluating the diameter of the inhibition zones.

According to the methodology used, the dilutions of the plant Hippobroma longiflora part of the Flores study exhibit antibacterial and antifungal, the same results were announced in the first instance to the students and faculty of the School of Clinical Laboratory.

Keywords: Hippobroma longiflora, antimicrobial, antifungal and agar diffusion**.**

INDICE

CONTENIDO **Pág.**

CERTIFICADO DEL DIRECTOR II

AUTORIA III

DEDICATORIA IV

AGRADECIMIENTO V

TÍTULO VI

RESUMEN VII

SUMMARY IX

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 13

II. REVISIÓN DE LITERATURA 17

III. MATERIALES Y MÉTODOS 46

IV. RESULTADOS 57

V. DISCUSIÓN 63

VI. CONCLUSIONES 66

VII. RECOMENDACIONES 68

VIII. BIBLIOGRAFÍA 70

IX. ANEXOS 73

INTRODUCCION

Las plantas son una alternativa actual para buscar nuevos agentes terapéuticos, porque contienen principios activos en algunos de sus órganos; como: hojas, tallos, raíces, flores entre otros. Estos principios activos, intervienen en las interacciones ecológicas entre las plantas y su ambiente. De hecho, han sido

utilizadas desde tiempos antiguos en las diferentes tribus con fines curativos, ya que uno de los anhelos de los seres humanos ha sido siempre intentar combatir sus enfermedades. Para ello, han hecho uso de organismos y productos que la naturaleza ofrece. Por muchos años, la humanidad se ha servido de las plantas en su intento de curar las enfermedades y aliviar el sufrimiento físico que padecen; actualmente se estima que el 75% de la población mundial recurre a la medicina habitual o ancestral para poder atender a sus necesidades primarias de asistencia médica. [1-3] Los usos particulares de las plantas en la medicina ancestral se han transmitiendo de forma oral o escrita y de generación en generación a lo largo de la historia, hasta nuestros días. [6]

De este modo, queda clara la importancia de estudiar científicamente las plantas usadas tradicionalmente como medicinales, así como las múltiples especies vegetales silvestres que son desconocidas para la ciencia médica.[2]

En el Ecuador, particularmente es un país con una geografía muy característica y diversa en vegetación por lo que determina la existencia de una gran variabilidad de pisos climáticos, por lo que se puede encontrar aproximadamente del 15 al 20% de todas las especies de plantas del mundo. Teniendo la selva tropical en la Amazonia, una que ofrece grandes probabilidades para realizar investigación de plantas con efectos curativos, pero los estudios son muy pocos, casi un 35%. [4-5]

La resistencia no es un fenómeno nuevo; al principio se reconoció como una curiosidad científica y luego como una amenaza a la eficacia del tratamiento. Sin embargo, el desarrollo de nuevas familias de antimicrobianos en décadas de 1950 y las modificaciones de esas moléculas en la década de 1980 nos indujo a creer que siempre podríamos adelantarnos a los agentes patógenos. Al comenzar el nuevo siglo, estamos pagando muy cara esa complacencia. La generación de medicamentos nuevos se está estancando y son pocos los incentivos para elaborar antimicrobianos nuevos que permitan combatir los problemas mundiales de la fármaco resistencia.

La resistencia recién comienza a verse como problema social desde un punto de vista económico, medios de subsistencia y vidas humanas como una negativa y amenaza con socavar la eficacia de los programas de atención de la salud.

Paradójicamente, esa presión selectiva es resultado de una combinación del uso excesivo que se hace en muchas partes del mundo, en particular para combatir infecciones menores, de un uso incorrecto por falta de acceso a un tratamiento apropiado y de una subutilización debida a la falta de recursos financieros para terminar los tratamientos. [7]

Es así, que en todo el mundo, varios agentes causales de enfermedades importantes se están volviendo resistentes a los antibióticos. [8] Para desmantelar esa resistencia y reemplazar efectivamente a los medicamentos que han perdido su eficacia y no se aprecia una rápida y oportuna elaboración de medicamentos que actúen de forma eficaz en las enfermedades, es necesario volver nuestros ojos a la medicina ancestral.

La salud general es un derecho de todo ser humano, por lo que, dentro de las manifestaciones sobreentendidas de la cultura, debe de ser valorada en sus distintos espacios; Por lo que hoy el lanzamiento de información publicitaria a favor del consumo de diversos medicamentos, ha causado un cambio en las características de automedicación en los usuarios. Se ha realizado encuestas de los medicamentos que más se utilizan por automedicación y son los analgésicos con un 18,8% y los antinflamatorios no esteroides en un 6,9% en Latinoamérica. Por lo que la automedicación es un problema alarmante y en continuo ascenso. [10] El abuso de fármacos de origen sintético ha llegado a desencadenar la resistencia de los microorganismos patógenos, disminuyendo la acción de algunos medicamentos, por lo que se cree conveniente que se haga una investigación de nuevos fármacos.

Componentes activos de las plantas medicinales utilizadas tradicionalmente por distintas comunidades, las cuales deben de tener actividad antimicrobiana, con amplio espectro y deben tener baja toxicidad, por tal motivo que ellas lo utilizan. [10]

Datos epidemiológicos del año 2012, obtenidos por el Ministerio de Salud Pública (MSP) indican que en la región amazónica, específicamente en la provincia de Zamora Chinchipe, la principal causa de morbilidad son por enfermedades diarreicas agudas con un 19,58%, seguida de las infecciones respiratorias agudas con un 18%, seguidos por las enfermedades venéreas, hipertensión arterial, etc. de manera que se puede reconocer que las principales causas de

morbilidad en Zamora son de tipo infeccioso, mismas que con una buena atención y medicación, sin abusar de los antibióticos, sería bueno dar una terapia complementaria basada en el uso de medicina natural, por lo que la población tendría una mejora en su estilo de vida y así mismo de salud [11]

Con estos antecedentes, el objetivo general de la presente investigación fue Evaluar la actividad Antibacteriana y Antimicótica de tres extractos de flor de la planta *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), planta conocida de uso en la medicina tradicional en las comunidades de la provincia de Zamora Chinchipe. Para ello se cumplió los objetivos específicos: Valorar la actividad antibacteriana de tres extractos con flor de la planta de *H. longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), por el método de difusión en agar frente a cepas ATCC (American Type Culture Collection) de E. Coli, S. Aureus. K. Pneumoniae. P Aeruginosa, también Estas bacterias son las que comúnmente causan infecciones gastrointestinales, cutáneas y respiratorias. Evaluar la actividad antimicótica de tres extractos con flor de la planta de *H. longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), por el método de difusión en agar frente a cepas ATCC de Candida albicans. Este hongo investigado es causante de infecciones cutáneas y mucosas, como también de infecciones sistémicas. El último objetivo fue Socializar los resultados del estudio a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja. Se entregaron trípticos y se pidió unas firmas de asistencia a los alumnos para constatar la exposición estos registros están en anexos. Una vez culminado el análisis, se comprobó que las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 hexanico, etanólico al 70% y acuoso no presentaron actividad antibacteriana y antimicótica en el método de difusión en agar frente a las bacterias cepas antes mencionadas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Plantas Medicinales

Concepto

Según en las directrices establecidas por el Comité Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) se halla una amplia definición sobre las plantas medicinales. Los productos medicinales acabados y etiquetados que contienen ingredientes esenciales activos en partes subterráneas u otro material vegetal o sean combinaciones de los mismos en estados concentrados en preparaciones

vegetales. Este material vegetal comprende todo lo que se puede hacer con la planta como: aceites grasos esenciales, zumos y cualquier otra sustancia de esa naturaleza. En la medicina se las considera plantas medicinales a todas las que contienen material vegetal combinando con sustancias activas químicamente definidas con constituyentes aislados de las plantas. Por ello, el uso de tratamientos tradicionales seguros y eficaces que puede jugar un papel importante para mejorar la atención sanitaria. En algunos países excepcionalmente, las medicinas vegetales se las puede tener por tradición o ingredientes activos orgánicos o naturales que son de origen vegetal. [5-25]

Importancia y uso

Esta planta han sido reconocida que son una fuente importante de compuestos activos que sirven para la curación de diversas enfermedades que afectan a la humanidad. La medicina tradicional es válida por lo que muchas instituciones científicas alrededor del mundo están muy interesados en investigaciones bioquímicas de plantas tropicales y especialmente de las que han sido reportadas en algunas zonas de áreas geográficas de centro América, Amazonia y también en los países Andinos. [3]

Medicina Ancestral

En el Departamento de Microbiología y Parasitología. Escuela de Bioanálisis. 2 Instituto de Investigaciones. En la ciudad de Mérida Venezuela se realizaron evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los extractos Etanólico, Acetónico y Acuoso, de la partes aéreas de Baccharis nítida. En algunos países ciertas especies de Baccharis (B. trimera, B. articulata, y B. crispa) son usadas en medicina popular, en forma de infusiones para el tratamiento de reumatismo, desordenes hepatobiliares, diabetes y externamente para los casos de ulceración de la piel y heridas. Por lo que se obtuvieron resultados en la valoración de la actividad antimicrobiana de los extractos Etanólico, Acetónico y Acuoso de la especie vegetal B. nítida, los cuales refieren actividad antibacteriana de todos los extractos sólo contra S. aureus a excepción de la dilución 1:10 del extracto acuoso; además, ninguno mostró actividad anti fúngica contra la levadura. Es importante resaltar que los extractos de B. nítida incrementaron el crecimiento bacteriano de P. aeruginosa, al emplear estos extractos de la especie vegetal se observa en este estudio e indican que las plantas además de poseer compuestos capaces de disminuir o inhibir el

crecimiento de algunos microorganismos, contienen sustancias potenciadoras del desarrollo bacteriano. El método utilizado en estas pruebas fue el de difusión en agar [4]

La planta *Hippobroma Longiflora* más conocida como **Cholo Valiente** ha sido utilizada como planta medicinal según los estudios y bibliografías encontradas en algunos casos se ha utilizado las hojas para lavar heridas y las flores son considerados antipirético y descongestionante.

Por lo que también una de las propiedades de esta planta es considerada como anti-inflamatorios o analgésico, por algunas de las comunidades Shuar y también la saben utilizarla en algunas bebidas porque tienen sustancias alucinógenas. [12-26]

Estudios

Los estudios que se han hecho son del Aceite de semillas de algunas de las familias de la longiflora nueve es reportado a ser medicinal. El componente principal del aceite de semilla de Isotoma longiflora fue el ácido oleico. [12]

Toxicidad

Ha esta planta no se la toma mucho en la medicina por lo que tiene mucha toxicidad porque tiene un alcaloide Isotomine por lo que puede causar parálisis muscular y por lo general afecta las funciones cardiorrespiratorias. [12]

Metabolitos

Los metabolitos son muy abundantes en la naturaleza, son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta; se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y su explotación es relativamente barata y conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentran aminoácidos proteicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, algunos ácidos carboxílicos.

Los metabolitos primarios son compuestos químicos que intervienen en los procesos mencionados: los aminoácidos destinados a la formación de proteínas, los nucleótidos, los azúcares, los acilglicéridos. [13- 14]

Metabolitos secundarios

Son sustancias de origen natural que no son vitales para el organismo que las produce, son menos abundantes que los metabolismos primarios, frecuentemente se observan en células u órganos especializados y están

implicados en la regulación de las plantas con otros organismos de su entorno. (13-14)

También se diferencian de los metabolitos primarios en que cada uno de ellos porque tienen una distribución restringida en el Reino de las plantas, a veces a sólo una especie o un grupo de ellas, por lo que muchos de ellos son útiles en Botánica Sistemática. (13-14)

En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos. La creciente apreciación de los diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas. (13)

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biocinéticas:

- **Fenoles**

  Son derivados hidroxilados de carburos aromáticos. Es una amplia familia dentro del grupo de los fenoles estarán los ácidos fenólicos (ácido elágico) y la amplia familia de los flavonoides, entre otros. Los compuestos más simples son unidades individuales de fenol que se encuentran de forma abundante en las hierbas culinarias, se incluyen el apio (que se encuentra en eneldo y perejil). Los fenoles protegen a las plantas del daño por oxidación y realizan la misma función en los humanos.

- **Terpenos**

  Son moléculas muy abundantes en los vegetales y su clasificación se determina por el número de isoprenos que contienen ejemplo: mono-terpenos (dos isoprenos), di-terpenos (4 isoprenos) etc. Dentro de este grupo se incluyen los carotenoides y limonoides, entre otros. Se encuentran en los alimentos verdes, productos de la soja y en los cereales, constituyen uno de los grupos más amplios de fito nutrientes. Actúan como antioxidantes protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies del oxígeno, como oxígeno y radicales hidroxilo, peróxido y súper óxido.

- **Glucósidos cianogenéticos**

Cumplen funciones de defensa, ya que al ser hidrolizados por algunas enzimas liberan ácido cianhídrico , proceso llamado cianogénesis.

- **Poli acetilenos**

  Grupo grande de metabolitos no nitrogenados, formados por la unión de unidades de acetato por la vía de los ácidos grasos. Se encuentran en algunos grupos emparentados de familias de astéridas.

- **Alcaloides**

  Son productos de una secuencia de reacciones bioquímicas del metabolismo de las plantas. Se encuentran en las plantas con flores aunque también aparecen en un reducido grupo de plantas sin flores. Pertenecen al grupo de sustancias que unidos a los antibióticos representan un amplio arsenal de recursos para el tratamiento y mitigación de diversas disfunciones orgánicas, lo cual les transfiere gran importancia y se mantienen en constante investigación

  Los alcaloides con estructuras complejas, como regla, son específicos de algunas familias de plantas como por ejemplo la hiosciamina en las Solanáceas y la colchicina en las Liliáceas. (14)

Descripción botánica de la especie en estudio

Es un género monotípico de plantas perteneciente a la familia Campanulaceae. Su única especie: *Hippobroma longiflora*

Su taxonomía es la siguiente

Hippobroma longiflora			
Clasificación científica			
Reino:	Plantae	**Subclase:**	Asteridae
Subreino:	Tracheobionta	**Orden:**	Asterales

División:	Magnoliophyta	**Familia:**	Campanulaceae
Clase:	Magnoliopsida	**Subfamilia:**	Lobelioideae
Subclase:	Asteridae	Género:	***Hippobroma*** G.DON

Las propiedades de esta planta es notable por tener principios activos de dos alcaloides: *lobelina y nicotina*. Los efectos de la nicotina y lobelina son bastante similares, con efectos psicoactivos, a dosis pequeñas y con efectos desagradables como vómitos, parálisis muscular y temblor en dosis más altas. Por tal la *H. longiflora* hace referencia en cuanto a su toxicidad en sus usos de etnobotánica. (12)

Al retirar esta maleza, es importante usar guantes: la savia es un irritante que puede ser absorbido por la piel, y una pequeña cantidad de savia en los ojos puede causar ceguera. (12)

Hábito y forma de vida

- Hierba perenne. Que crece alrededor de vertientes o arroyos.

Tamaño

- De hasta 90 cm de alto, aunque generalmente más pequeña.

Tallo

- Erecto o recostado.

Hojas

- Numerosas, alternas, angostas, de hasta 20 cm de largo, gruesas, con dientes triangulares (alternando grandes y pequeños) en los márgenes.

Inflorescencia

- Las flores solitarias sobre cortos pedicelos, ubicadas en las axilas de las hojas. En la base de cada pedicelo se encuentra un par de hojillas muy pequeñas y angostas llamadas bractéolas.

Flores

- Muy largas, vistosas. La parte basal del cáliz es ligeramente acampanada y termina en 5 lóbulos largos y muy delgados, tiene la corola blanca, consiste en un tubo delgado y muy largo (13.5 cm) que

hacia el ápice se divide en 5 lóbulos angostos y puntiagudos que se curvan hacia atrás.

Semillas

- Tiene forma media acampanada y con la superficie reticulada.

Hábitat

- Común en sitios alterados, sobre todo húmedos. Frecuentemente a lo largo de canales de riego o arroyos.

Distribución por tipo de zonas bioclimáticas

- Selva alta perennifolia, selva baja caducifolia.

Distribución altitudinal

- En Nicaragua desde el nivel del mar hasta los 1500 m.

Distribución por tipo de clima

- Trópicos secos y húmedos.

Actividad Antimicrobiana

Es la capacidad que posee un fármaco o compuesto natural para inhibir el crecimiento de bacterias. Ya que estos pueden controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es la menor concentración que inhibe el crecimiento de un inóculo estandarizado. Se hacen diluciones con concentraciones crecientes del antibiótico, diluciones seriadas.

En cada tubo se pone igual concentración de una cepa. Se ve a qué concentración de una cepa. Se ve a qué concentración mínima del tubo se da ausencia de crecimiento.

Cuanto menor sea la CMI el antibiótico será más potente.

Concentración mínima bactericida (CMB)

Es la mínima concentración que lisa los microorganismos. La CMB suele ser mayor que la CMI.

Bacterias

Las bacterias poseen un tamaño medio entre 2y10µm. su citoplasma está repleto de ribosomas, el material genético está constituido de ácido desoxirribonucleico (DNA), forma un nucleoíde carente de membrana nuclear. La membrana está

rodeada de peptidoglucano (glicopéptido, mureina), que confiere la forma de la célula.

La bacteria es el más simple y abundante de los organismos y puede vivir en tierra, agua, materia orgánica o en plantas y animales.

Tienen una gran importancia en la naturaleza, pues están presentes en los ciclos naturales del nitrógeno, del carbono, del fósforo, etc. y pueden transformar sustancias orgánicas en inorgánicas y viceversa.

Son también muy importantes en las fermentaciones aprovechadas por la industria y en la producción de antibióticos.

Las bacterias son muy importantes para el ser humano, tanto para bien como para mal, debido a sus efectos químicos y al rol que juegan en diseminar enfermedades. (15)

Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas

Gram Negativas

Las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, por lo o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue, por tener la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram. (15)

Gram Positivas

Las que las bacterias Gram-positivas presentan sólo una membrana lipídica externa capaz de proteger el **citoplasma bacteriano** y la pared de peptiglicano son mucho más gruesa, que presentan ácidos teicoicos en su superficie. Entre otras cosas, se distinguen especialmente por teñirse de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram aplicada en bacteriología. (15)

Crecimiento Bacteriano

Es el incremento ordenado de todos los componentes de un microrganismo. Por lo tanto es el aumento de tamaño, esto resulta cuando una célula capta agua o deposita lípidos o polisacáridos. La multiplicación celular se da cuando porque es una secuencia de crecimiento de un microrganismo unicelular, esta multiplicación aumenta la cantidad de individuos y da lugar a una población o cultivo.

Fases de crecimiento

- ✓ **Fase De Rezago o Adaptación**

  Las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento. En este período las bacterias individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse. Durante la fase de adaptación del ciclo de crecimiento de las bacterias, se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas. (16)

- ✓ **Fase Exponencial o Logarítmica**

  Es un período caracterizado por la duplicación celular. El número de nuevas bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual. Para este tipo de crecimiento exponencial, representando el logaritmo natural del número de células frente al tiempo se obtiene una línea recta. El crecimiento exponencial no puede continuar indefinidamente, sin embargo, porque el medio llega pronto al agotamiento de nutrientes mientras se acumulan los desechos. (16)

- ✓ **Fase Estacionaria**

  La tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Esta fase se alcanza cuando las bacterias empiezan a agotar los recursos que están disponibles para ellas. Y se caracteriza por un valor constante del número de bacterias a medida que la tasa de crecimiento de las bacterias se iguala con la tasa de muerte bacteriana. (16)

- ✓ **Fase De Declive O Muerte**

  Aquí las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren, este modelo de crecimiento del cultivo básico en lotes se mantiene y pone su énfasis en los aspectos de la proliferación de bacterias que pueden diferir de las del crecimiento de la macro fauna. La tasa de mortalidad aumenta aquí hasta alcanzar un valor sostenido. (16)

Actividad Antimicótica

Las pruebas de sensibilidad Antifúngicos pretenden determinar la actividad relativa de uno o más fármacos frente a un patógeno con la intención de seleccionar una alternativa terapéutica más adecuada como tratamiento de la infección. [16]

Hongos

Los hongos son microorganismos eucariotas que tiene un núcleo específico, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico.

Estos hongos pueden existir en una forma unicelular como levadura, capaz de reproducirse de manera asexual o en forma filamentosa que es moho, capaz de replicarse de forma tanto asexual como sexual. La mayor parte de estos microorganismos existen en forma de levadura o moho. Sin embargo, algunos de ellos pueden adoptar ambas morfologías; se trata de los hongos di mórficos, conocidos como: *Blastomyces e Histoplasma.* [27]

CEPAS BACTERIANAS (ATCC) EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

Las cepas de ATCC son utilizadas controles para identificación rápida, concentración mínima de inhibidores en antibióticos y paneles de susceptibilidad de antibióticos. [26]

Los estándares biológicos ATCC son de vital importancia para garantizar la confiabilidad de los resultados de investigación, reproducibilidad de la experimentación y el método científico. El control de la calidad sobre estas cepas bacterianas de referencia antes de ser expuestas son someten a pruebas con medios de cultivos clínicos. [26]

PSEUDOMONA AEUROGINOSA

Características morfológicas

Es un bacilo Gram Negativo dotado de motilidad, este mide 0,6 por 2µm. Se la encuentra como bacteria única, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas, generalmente son móviles gracias a uno de los flagelos polares que poseen, son catalasa positiva y no forman esporas.

Características del crecimiento

Crece con facilidad en los medios de cultivo, a una temperatura de 10ºC a 42 ºC y produce diferentes tipos colonias pigmentadas se pueden dar en medios especiales como King A y B de color verdoso, hemolíticas de consistencia Mucoídes con un olor a fruta. Entre los pigmentos producidos por la Ps. Aeruginosa están la piocianica, una substancia azul, soluble en agua y en cloroformo, y la fluoresceína, una substancia verdosa, fluorescente, soluble en agua, pero no en cloroformo. La Ps. Aeruginosa es aerobia y posee citocromo - oxidasa.

Esta Pseudomona. Es resiste a los antibióticos como la penicilina, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol.

Pero los antibióticos que han mostrado actividad contra Ps. aeruginosa incluyen:

aminoglicosidos como: gentamicina, amikacina, tobramicina y las quinolonas como: ciprofloxacino, levofloxacino. (17)

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Características morfológicas

El S. aureus es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 µm de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. El estafilococo aureus pertenece a la familia Micrococcaceae hay 20 especies diferentes, pero el estafilococo aureus es el que se encuentra con mayor frecuencia y es la causa principal en las infecciones del ser humano. El estafilococo aureus suele estar en la piel y en las membranas mucosas sin llegar a causar infección, pero cuando penetra en los tejidos puede ser en el caso de una herida por lo que puede ocasionar una amplia gama de infecciones debido a su producción de toxinas.

Características del crecimiento

Los estafilococos crecen con facilidad sobre casi todos los medios bacteriológicos en condiciones aeróbicas o micro-aerofilicas.

Crecen con mayor rapidez a 37 ℃, pero el pigmento se forma mejor a temperatura ambiente (20℃ a 25 ℃). Sobre medios de cultivo sólidos las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes. El Staphylococcus aureus comúnmente forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso

El mecanismo de resistencia a la nafcilina se vincula con ausencia o inaccesibilidad de ciertas proteínas de unión a la penicilina en los microorganismos.

Se considera a S. aureus susceptible a vancomicina si la concentración inhibidora mínima (CIM) es < 4um/ml; de susceptibilidad intermedia si la CIM es de 8 a 16 um/ml. (18)

KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Características morfológicas

Esta bacterias Gram negativas es un bacilo, la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el Agar Mac-Conkey donde las colonias son de color rosado.

Son bacilos rectos, de 0.3-1.0 µm de diámetro y 0.6-6.0 µm de longitud. Las células se disponen individualmente, en parejas o en cadenas cortas. Son inmóviles, Gram negativo y la mayor parte capsuladas. En los cultivos en medios sólidos, las cepas que producen cápsula permiten observar colonias mucosas de una consistencia viscosa.

Características del crecimiento

Sus condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo a 37 °C, ph de 7.0, presión osmótica de 1 atm.

Son resistentes a las penicilinas, cefalosporinas. Y se recomienda el uso de amino glucósidos como la gentamicina o amikacina porque son sensibles.

ESCHERICHIA COLI

Características morfológicas

Es un bacilo corto no porulado y miden 0.5 µ de ancho por 3 µ de largo, se tiñe de color rosado con la tinción de Gram es motil, se mueve por medio de flagelos perítricos fermentan lactosa glucosa y sacarosa, producen vitamina K y B, estos pueden presentar plásmido o vivir sin él. Pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias.[9]

Características del crecimiento

Las colonias de E. Coli en agar E.M.B. (eosina y azul de metileno) tienen 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja.

En agar Mac-Conkey las colonias son rojas con halo turbio. [(19)]

Cepa fúngica (ATCC)

CÁNDIDA ALBICAS

Características morfológicas

El cultivo o tejidos las especies de *Candida* crecen como levaduras ovales en gemación de 3 a 6µm de tamaño. También forma seudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para poder generar cadenas de células alargadas, pinzadas en los tabiques entre las células. C. albicans es di formica, además de las levaduras y las seudohifas, también puede producir hifas verdaderas.

Características del crecimiento

Hay dos pruebas morfológicas simples diferencian la C. albicans, el patógeno más común de otras especies de Candida, después de la incubación en suero durante casi 90 minutos a 37ºC, las células de C. albicans empiezan a formar verdaderas hifas o tubos germinales y en un medio nutritivo insuficiente C. albicans produce clamidosporas grandes y esféricas.

Sobre el medio de agar en las 24 horas a 37ºC o temperatura ambiente, las especies de Candida producen colonias blandas de color cremoso con olor a

levadura. Las seudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar.

MEDIOS DE CULTIVO

El cultivo es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de bacterias de un sitio de infección, por métodos de recolección de muestra y crecimiento en un medio de ambiente artificial en el laboratorio.

Para estudiar estas reacciones metabólicas y fisiológicas de las bacterias es necesario cultivarlas en un medio de cultivo, que es una sustancia sólida como liquida que se la puede utilizar en el laboratorio para el crecimiento de los microorganismos [28]

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

1. **Composición**

   Los medios de cultivo deben incluir los elementos indispensables para la vida bacteriana como;

   - 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.

2. **pH**

   Las bacterias se saben desarrollar en un pH próximo a la neutralidad como es de 6,8 – 7,6 aunque algunas exigen un pH específico distinto.

3. **Presión osmótica**

   Los gérmenes se adaptan bien a las variaciones de la presión osmótica: sin embargo, los medios de cultivo se preparan en condiciones de isotonía.

4. **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.

5. **Hidratación**

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

6. **Temperatura**

   En el caso de bacterias de interés médico, los cultivos se incuban a 35-37ºC.

7. **Atmósfera**

   Algunas bacterias, especialmente algunas aerobias y facultativas, necesitan para su óptimo desarrollo de la presencia de ciertos ambientes gaseosos.

   Como hasta hoy no hay un medio de cultivo universal que cubra todas las necesidades de todas las bacterias, la elección de un medio de cultivo a utilizar para determinadas bacterias las cuales tienen necesidades nutritivas de estas y del hábitat natural de cual se recuperan. [18]

CLASIFICACIÓN

Los medios de cultivo se clasifican en:

- **Medios selectivos**

  Son medios utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias que se quiere aislar. El fundamento de estos medios consiste en facilitar nutricionalmente el crecimiento de una población microbiana específica. Un ejemplo de medio selectivo es el caldo selenito, Mac-Conkey, manitol, etc.

- **Medios de enriquecimiento**

Son aquellos que tienen sustancias nutritivas normales e incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes. Un ejemplo de medio es Agar Sangre, Mueller Hinton.

- **Medios diferenciales**

  Se utilizan para poner en evidencia características bioquímicas que ayuden a diferenciar géneros o especies. El medio Mac-Conkey es un medio diferencial porque permite distinguir los gérmenes que fermentan la lactosa de aquellos que no lo hacen. También lo son el C.L.E.D. da lactosa positiva y lactosa negativa, el agar sangre se ve el tipo de hemólisis, el S.S. que es doblemente diferencial), etc.

- **Medios de identificación**

  Son los destinados a comprobar alguna cualidad específica que puede servirnos para reconocer la identidad de un microorganismo. El agar Kliger, el medio de Simmons y en general, cualquier medio al que se le haya añadido un elemento diferencial de un microorganismo, son medios utilizados en identificación.

- **Medios de multiplicación**

  Estos sirven para obtener una gran cantidad de células a partir de un microorganismo ya aislado. Se emplean en la obtención de vacunas, en la investigación y en la industria. El caldo-infusión cerebro-corazón (BHI), es un ejemplo típico de estos medios.

- **Medios de conservación**

  Se utilizan para conservar una cepa que, por diversas razones nos interese mantener. Fundamentalmente se utilizan como controles de calidad de las pruebas y reactivos utilizados en el Laboratorio de Microbiología. Aquí se siembra y se incubarán de 2 a 4ºC. Ejemplo de estos medio de Stuart, medio de Amies, etc. [18]

Medios de Cultivo

- **Agar Sangre**

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

- **Agar MacConkey**

  Es un medio selectivo diferencial 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.

- **Agar Muller Hinton**

  Es un medio enriquecido, utilizado como medio de elección para realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

- **Agar Sabouraud**

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

- **Agar cetrimide**

  Es un medio utilizado para el aislamiento de Pseudomona, que favorece la pigmentación de Pseudomona aeuroginosa.

- **Agar Champan manitol**

  Es un medio selectivo 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. (18)

Pruebas Bioquímicas

- ✓ **Pruebas de catalasa**

  La enzima catalasa es propia de la mayor parte de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen citocromos, siendo la excepción el estreptococo. La función de esta enzima es descomponer el peróxido de hidrogeno, desprendiendo oxígeno libre. (17)

- ✓ **Pruebas de coagulasa**

  Esta prueba, demuestra la presencia de la enzima coagulasa que poseen algunos estafilococos. Actualmente se sabe que hay estafilococos coagulasa negativa, virulentos y productores de cuadros clínicos. [17]

- ✓ **Prueba de citrato**

  Aquí se determina la capacidad que poseen algunos microorganismos de utilizar como única fuente de carbono, el citrato, produciendo alcalinidad. [17]

- ✓ **Prueba de movilidad**

  Ya que es una característica importante al hacer una determinación bacteriana, pues indirectamente señalaba que el microorganismo posee flagelos, rasgo taxonómico que es difícil poner de manifiesto por otros métodos, incluidos los tintoriales. ([17]

- ✓ **Prueba de triple azúcar hierro (TSI)**

  Es una prueba utilizada 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. [17]

- ✓ **Prueba de fenilalanina**

  Esta se basa en la capacidad que poseen algunas bacterias de desaminar la fenilalanina produciendo ácido fenilpirúvico. [17]

- ✓ **Producción 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-aminobenzaldehido. [17]

- ❖ **Prueba del tubo de germinación**

  Esta una prueba de gran valor para la identificación rápida y presuntiva de Candida albicans, que con la Candida stellatoidea son las únicas

levaduras de género Candida capaces de producir tubos germinales. [17-20]

- **Auxonograma**

  Este se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para el desarrollo. Para la realización pueden emplearse soluciones acuosas esterilizadas por filtración, cilindros de Oxford en pocillos hechos en agar o bien serán discos de papel absorbente empapados con el nutriente. Mientras que las pruebas de asimilación en medios líquidos no ofrecen ninguna ventaja adicional sobre los medios sólidos, por salen muy laborosos y muy costosos. Los medios de cultivo base se los prepara según la técnica habitual y no se necesita ajustar el pH. Estos los expenden en forma deshidratada como medio de base de levaduras. Los medios más utilizados sin carbono y nitrógeno. Como fuente de carbono se puede ensayar todos los azúcares y alcoholes conocidos. Y los que tienen como substrato de nitrógeno se le puede emplear peptona, urea, sulfato amónico, nitrato de potasio y diversos aminoácidos. [21]

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Actividad antibacteriana

Antibióticos

Los antibióticos son compuestos orgánicos naturales o sintéticos que inhiben o destruyen selectivamente las bacterias, por lo general a concentraciones bajas.

Clasificación de los Antibióticos

Inhibidores de la síntesis de la pared celular

- Glucopéptidos
- Betalactámicos

Inhibidores de la síntesis de proteínas

- ✓ Tetraciclinas

- ✓ Aminoglucósidos
- ✓ Cloranfenicol
- ✓ Lincosamidas, Macrólidos y Estreptograminas

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

- Rifampicinas
- Metrodinzol
- Sulfamidas
- Quinolonas

Inhibidores de la membrana citoplásmica

- Polimixinas

ANTIBIOGRAMA

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma son métodos que determinan la susceptibilidad de los microrganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo las condiciones del laboratorio específicas y estandarizadas.

MÉTODOS DE DIFUSIÓN DE KIRBY BAUER

En la prueba de sensibilidad por difusión en agar con discos, la resistencia antimicrobiana se detecta exponiendo los aislamientos bacterianos en discos de antibióticos, que se colocan en una placa de agar en cuya superficie se ha sembrado bacterias.

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 de inmediato y establece una gradiente de concentración alrededor del disco de papel. La concentración más alta es la más cercana al disco. Durante la incubación las bacterias se desarrollan en la superficie de la placa, excepto donde la concertación de antibióticos en el

gradiente formado alrededor de cada disco es suficientemente alto como para inhibir el desarrollo.

Definiciones de la interpretación de las pruebas de sensibilidad

Sensible

Indica que el agente antimicrobiano en cuestión puede ser una elección adecuada para tratar la infección causada por el aislamiento bacteriano probado.

Intermedio

Este se usa para indicar varias posibilidades como utilidad del agente antimicrobiano en sitios del cuerpo en los que pueda concretarse o se puede utilizar concentraciones elevadas del fármaco.

Resistente

Esto se da cuando el microrganismo no es inhibido por los niveles alcanzables en suero del fármaco y el resultado de la prueba se relaciona con un mecanismo de resistencia que se hace dudoso el resultado del tratamiento.

Inoculo

El inoculo es preparado en forma adecuada es la clave para cualquiera de los métodos de prueba de sensibilidad a antimicrobianos. La falta de la uniformidad en la preparación del inoculo a menudo conduce a incoherencias en los resultados de las pruebas de sensibilidad. Lo más importante en la preparación del inoculo es el uso de un cultivo puro y de un inoculo estandarizado.

Patrón de turbidez:

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). El estándar de Mc Farland de 0.5 tiene una turbidez comparable a una suspensión bacteriana que contiene 1.5 x 108 UFC/mL.

Preparar dicho estándar agregando 0,5 ml de $BaCl_2$ 0,048M (1,175% P/V $BaCl_2.2H_2O$) a 99,5 ml de H_2SO_4, 0,18 M (0,36 N) (1% V/V). Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625nm debería ser 0,08 a 0,10, para el estándar 0,5 de Mc Farland. Distribuir en 4-6 ml dentro de tubos similares a los usados para la preparación de los inóculos y mantener guardados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Los tubos se deben sellar estrechamente al ser preparados, para evitar la evaporación de la suspensión.

Agitar vigorosamente con vortex o manualmente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.

Reemplazar o verificar la confiabilidad de los estándares mensualmente. Descartar los estándares, que presenten alguna evidencia de evaporación. Esto pude controlarse marcando los tubos en el momento de la preparación con una marca a la altura del menisco.

Preparación del inóculo:

A partir de 4 o 5 colonias bien aisladas y de igual morfología en un medio de aislamiento primario como por ejemplo, agar de Mc Conkey o agar sangre de carnero, preparar una suspensión en 4 o 5 ml de un caldo apropiado (tripteina soja (soya) u otro) tocando la parte superior de cada colonia. Sumergir el hisopo y enjuagar bien en el medio líquido para descargar todo el material. Incubar el tubo de cultivo en baño María a 35-37 ºC hasta que se alcance o exceda la turbidez del estándar (2 - 4 h).

Diluya el inóculo con solución salina o caldo hasta alcanzar una turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland, por comparación visual con el estándar. Agitar vigorosamente con vortex o manualmente tanto el tubo con el inóculo como el estándar de Mc Farland. Posteriormente mirar los tubos contra un fondo blanco con una o varias líneas negras como contraste. Recordar: La suspensión estandarizada del inóculo debe de ser utilizada en los siguientes 15 minutos de su preparación.

Medios y agentes antimicrobianos

El agar de Muller-Hinton es el medio de base estándar para poder probar la mayoría de los microorganismos bacterianos. Además de los factores como pH y el contenido de cationes, la profundidad del medio sólido por lo que puede afectar la exactitud de la prueba, puede controlarse con cuidado. Debido a que los agentes antimicrobianos se difunden en todas las direcciones desde la superficie de la placa de agar, el espesor del agar afecta el gradiente de concentración del fármaco antibacteriano.

Los agentes antimicrobianos se los selecciona para poder hacer su aislamiento bacteriano al cual de lo denomina bacteria. Un laboratorio puede utilizar diferentes bacterias para la prueba, pero el contenido y aplicación de cada una se basan en diversos criterios, la decisión no puede ser tomada por el laboratorio. Aquí es indispensable el aporte del médico y de las farmacias.

ACTIVIDAD ANTI FÚNGICA

Antifúngicos

También conocido como antimicótico esto engloba a cualquier sustancia capaz de producir una alteración en la estructura de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o bien su capacidad de supervivencia, bien directa e indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

Clasificación

Los antibióticos de incluyen en una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción, por el sitio de acción Antifungicos se clasifican en:

Antifungicos que interactúan en la pared celular

- ✓ Lipopéptidos

Antifungicos que interactúan en la membrana celular

- ✓ Polienos
- ✓ Azoles

- ✓ Alilaminas

Antifungicos que interactúan en el núcleo

- ✓ Pirimidinas fluoradas

ANTIFUNGIGRAMA

Las pruebas de sensibilidad se hacen con agentes Antifungicos se realizan para obtener datos confiables que permitan elegir el agente más activo para usarlo en el tratamiento de infecciones humanas. También se las hace por otras razones a estas pruebas lo que comprenden nuestra incapacidad de predecir probables respuestas clínicas in vitro, las necesidades de explicar los problemas asociados con la resistencia.

El procedimiento de esta prueba con agente Antifungicos va hacer similar el diseño al que se emplea a los antimicrobianos, pero hay ciertas diferencias que hacen algo más difíciles las pruebas con agentes Antifungicos. Las pruebas in vitro con agentes Antifungicos se complican por las características de los mismos hongos como se tiene el dimorfismo, crecen lento y necesitan temperaturas específicas.

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Existen varios factores de intervención para determinar la resistencia a los antimicrobianos, entre los cuales se menciona la variabilidad genética, resultado de la mutación puntual de un par de bases de un nucleótido, lo cual puede alterar el sitio de ataque del antimicrobiano interfiriendo en su actividad; o el fenómeno de reordenamiento de segmentos de ADN de una a otra ubicación en el cromosoma de una bacteria; o la adquisición de una ADN extraño transportado por plásmidos, bacteriógrafos o elementos genéticos de transposición.

Estos mecanismos se dan por el abuso de suministro de medicación anti infecciosa, el uso libre e incontrolado de los anti infecciosos. Esa situación alarmante por lo que avanza de manera inusitada, ha generado esfuerzos de las autoridades sanitarias de los países bajos de liderazgo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) por que hacen una serie de recomendaciones

tendientes a prescripción y el uso de medicamentos. Para poder prevenir la resistencia a los antimicrobianos.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

En microbiología, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación generalmente es de 24 horas.

Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio microbiológico, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos. [22]

CONTROL DE CALIDAD INTERNO (INTRALABORAL)

Es el procedimiento que utiliza los resultados de un solo laboratorio, con el propósito de controlar la calidad, utilizando procedimientos idóneos que permiten descubrir y cuantificar lo errores en la fase analítica, mediante el análisis repetido de materiales de control con el fin de minimizarlos

Incluye los siguientes controles:

- Control de los reactivos y materiales analíticos, colorantes, medios de cultivo.
- Control de material volumétrico
- Control de los instrumentos y equipos

Control de los reactivos y materiales analíticos. Es importante tener en cuenta la caducidad, conservación y sistema de almacenamiento de los reactivos, sustancias y otros materiales utilizados en el área de micología y virología.

Reactivos.- se recomienda correr controles diarios de los reactivos con las muestras y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto al almacenamiento de los reactivos metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote y llevar un registro de su funcionamiento.

Colorantes: El control de calidad de los colorantes debe realizarse primero con cada nuevo lote preparado; luego basta con un control cada semana para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc. [22]

Control de calidad de los medios de cultivo

Aquí se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco.

Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos cuyo comportamiento se conoce, tanto para reacciones positivas, como negativas. Para esto pueden utilizarse cepas bacterianas control de la ATCC. Se debe guardar un registro de los resultados obtenidos. [22]

Los medios deben mantenerse preferiblemente en sitios oscuros, ya que la luz puede afectar algunos de sus componentes. Para evitar la desecación se

aconseja que se guarden en bolsas plásticas bien cerradas. Las cajas Petric almacenados así, deben mantenerse con el fondo hacia arriba.

Se realiza además una esterilización en autoclave a 15lbs de presión, 121ºC durante 15-20 min. En caso de medios de cultivo que no se puedan esterilizar a estas temperaturas se recurrirá a tindalización (30-60ºC procesamiento fraccionado en horno de calor seco)

Cada lote preparado de medio de cultivo se prueba antes de su uso rutinario, por eficiencia o calidad, mediante la inoculación de microorganismos cuyo comportamiento conocemos, tanto para reacciones positivas como negativas.

- Se debe guardar un libro de registro de los resultados obtenidos.
- Evite el congelamiento de los medios preparados o la sangre de carnero.
- Al colocar en la refrigeradora los medios preparados, debe colocar los de más reciente preparación al fondo y los más viejos adelante.
- Rotular todos los medios preparados, tanto en platos Petri como en tubos, indicando además, la fecha de preparación y expiración. [22]

Control de material volumétrico._ Todo el instrumental dedicado a la transferencia de líquido debe estar calibrado en función de la exactitud y precisión requeridas.

Control de instrumentos y equipos._ Los instrumentos existentes en un laboratorio son los de tipo auxiliar o complementario (baños maría, microscopios, autoclave, esterilizador, balanza) deben estar en vigilancia constante para verificar su buen funcionamiento; así también deberá realizarse la limpieza de los equipos. *Por ejemplo:* se debe utilizar una balanza calibrada cuya característica principal es que posee un mínimo margen de error, lo que las hace ideales para utilizarse en mediciones muy precisas.

Supervisión Del Personal: El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio de micología y virología. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

Control de calidad de equipos

Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios. (23)

Control de esterilidad

Se efectúa incubando algunas placas escogidas de lote al azar, durante dos días a 35ºC y cinco días a temperatura ambiente. Este control se debe aplicar a todos los lotes, tanto en medios entubados como preparados en placas. (23)

Control de calidad externo

Es recomendable que los laboratorios de microbiología puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.

La evaluación externa de la calidad constituye un complemento imprescindible del Control Interno de Calidad (CIC). (23)

Control de Calidad de las Pruebas Bioquímicas

PRUEBAS BIOQUIMICAS	ORGANISMOS DE CONTROL	REACCION ESPERADA
TSI	E. coli	Ácido / Ácido
TSI	Shigella flexneri	Alcalino / Ácido
TSI	Pseudomona Aeruginosa	Alcalino / Alcalino
SIM	Proteus mirabilis	Movilidad Positiva
SIM	K. pneumoniae	Movilidad Positiva
CITRATO DE SIMONS	k. peumoniae	Color azul. Crece
CITRATO DE SIMMONS	E. coli	Color verde. No crece
CALDO DE UREA	Proteus mirabilis	Rojo – Morado. Positivo
CALDO DE UREA	E. coli	Color Naranja. Negativo

22

MATERIALES Y METODOS

TIPO DE ESTUDIO

- ✓ La presente investigación es de tipo descriptivo, transversal y cuasi-experimental.

ÁREA DE ESTUDIO

- ✓ La provincia de Zamora Chinchipe

UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN

Planta *Hippobroma longiflora* y sus flores son estudiadas

CRITERIO DE INCLUSIÓN

- ❖ Flores de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don que estén sin signos de deterioro.

CRITERIO DE EXCLUSIÓN

- Flores que no presenten las características morfológicas típicas de la planta.

Metodología

Técnicas de Investigación

Material Vegetal: planta Hippobroma longiflora fue recolectada en el la provincia de Zamora Chinchipe. Este material fue identificado por el encargado del Herbario Reinaldo Espinoza de la universidad nacional de Loja. El material vegetal seco y molido, fue extraído por separado con etanol, hexano y agua. Mediante maceración a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego estos extractos se agitaron en un rotavapor por 30 minutos a diferentes temperaturas según el alcohol y agua utilizada. Luego de esto se liofilizó una parte del extracto obtenido y se llegó hacer las diluciones de 1/100, 1/1.000 y 1.10.000 este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica.

MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DEL ANÁLISIS

Técnica e instrumentos de recolección de datos:

- Cámara Digital
- Hojas de registro de resultados

Actividad Antibacteriana Y Antimicótica De Hippobroma Longiflora

PROCEDIMIENTO

Procesamiento de planta: de estudio y de referencia (pilotaje)

1. **Colecta**

La recolección de las flores se realizó en la zona de estudio, según lo establece el protocolo del Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de Loja. Un ejemplar de la planta fue remitido al Herbario Reinaldo Espinoza para su identificación.

2. **Lavado**

El material vegetal se lavó, tal como lo establece el protocolo, del Laboratorio de Fitoquímica, se realizó el lavado con agua y un poco de hipoclorito y luego se enjuago varias veces con agua corriente, especialmente las flores con el fin de eliminar la suciedad y escurrirlas para eliminar el resto de agua para facilitar el secado de las flores.

3. **Secado**

El secado se realizó según lo establece el protocolo del Laboratorio de Fitoquímica, en el cual indica que después de ser recolectada la planta *Hippobroma longiflora*, especialmente las flores, se secaron a una temperatura ambiente, bajo sombra, o también extendiéndolas sobre papel periódico limpio en una estufa a 35ºC durante 3 días. Hasta que las flores estén totalmente secas.

4. **Molienda**

La molida se realizó según lo establece el protocolo del Laboratorio de Fitoquímica, en lo cual se utilizó un molino de cuchillas con malla de un tamaño de 2 mm. La droga molida se colocó en fundas herméticas que protejan del aire y la humedad.

Obtención De Extractos: Hexanico, Etanólico, Y Acuoso De La Flor De Hippobroma Longiflora

Obtención de extractos

Hexánico

El proceso de obtención de extractos se realizó según lo establece el protocolo del Laboratorio de Fitoquímica, se pesó 30gr de la flor y se la coloco en un Matraz Erlenmeyer de 500ml, luego se colocó en una probeta de 1000ml, 300ml de hexano y se trasvaso al matraz el cual fue macerado por 24 horas a temperatura ambiente en un agitador magnético con un magneto dentro del matraz. Esto se

lo filtro en otro Matraz el cual tiene un embudo con papel filtro. Y se concentrara en Rota vapor a 20° C. El proceso se repitió una vez más y el extracto concentrado fue liofilizado.

Etanólico

El proceso de obtención de extractos se realizó según lo establece el Laboratorio de Fitoquímica, en el cual el extracto tratado con Etanol se le coloco en un Matraz Erlenmeyer de 500ml, luego se puso en una probeta de 1000ml, 300ml de Etanol (99,9%) y se trasvaso al matraz el cual fue macerado por 24 horas a temperatura ambiente en un agitador magnético con un magneto dentro del matraz. Esto se filtró en otro Matraz el cual tiene un embudo con papel filtro. Y se concentró en Rota vapor a 40° C. El proceso se repitió una vez más y el extracto concentrado fue liofilizado.

Acuoso

El proceso de obtención de extractos se realizó según lo establece el protocolo de Laboratorio de Fitoquímica, en el cual el extracto tratado con Agua. Se le colocó en un Matraz Erlenmeyer de 500ml, luego se puso en una probeta de 1000ml, con 300ml de Agua Destilada y se trasvaso al matraz el cual fue macerado por 24 horas a temperatura ambiente en un agitador magnético con un magneto dentro del matraz. Esto se lo filtro en otro Matraz el cual tiene un embudo con papel filtro. Se concentró en Rota vapor a 45° C. El proceso se repitió una vez más y el extracto concentrado fue liofilizado.

Evaluación de Actividad antimicrobiana

Actividad Antimicrobiana: En planta de referencia de AAM

Preparación de soluciones madre

Los extractos vegetales que se utilizaron en la presente investigación son: extracto total Acuoso, Etanólico y Hexanólico de Hippobroma longiflora a partir de los cuales se prepararon 3 diluciones decimales equivalentes a: 1/100, 1/1000

y 1/10.000 usando el mismo solvente con que se hizo la extracción y conservados en frascos ámbar a 4ºC hasta su uso.

Preparación de discos

Los discos fueron elaborados con papel filtro Whatman N° 3, o su equivalente, usando un sacabocados de 6 mm diámetro y 0.6 mm de espesor y a los cuales se les agrego 20 µl de cada dilución con una concentración de 2ug, 20ug y 200ug.

Preparación de soluciones de trabajo

Se hizo un banco de diluciones en el cual se preparan 3 diluciones decimales equivalentes a: 1/100, 1/1000 y 1/10000 usando el mismo solvente con que se hizo la extracción.

Viabilización de cepas de microorganismos

Para la Viabilización de cepas liofilizadas, se lo realizó colocando 0.5 ml de infusión cerebro-corazón en cada uno de los viales que contienen las cepas puras y sembrando en los medios específicos para el desarrollo de cada cepa bacteriana y fúngica.

Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se comercializan disecados, en forma de polvo, para su disolución y esterilización. Actualmente se pueden adquirir también medios sólidos ya preparados, dispuestos en frascos, que se licuan mediante ebullición y se dispensan en placas; medios en tubos y medios sólidos en placa, listos para su inoculación.

En este estudio se utilizaran 5 cepas ATCC, considerando una batería mínima para ensayos de susceptibilidad, estas son:

- Staphylococcus aureus (ATCC 25923),
- Escherichia coli (ATCC 25922),
- Pseudomona aeruginosa (ATCC 27653)

- Klebsiella pneumoniae (ATCC 13883),
- Cándida albicans (ATCC 26790).

De las cepas conservadas en refrigeración se realiza siembras por estría en medios de cultivo adecuados de acuerdo al tipo de bacteria:

- Agar Chapman Manitol: Staphylococcus aureus
- Agar Mac-Conkey: k. Pneumoniae; E. coli
- Agar Cetrimide: Pseudomona Aeruginosa
- Agar Sabouraud dextrosa: Cándida albicans

Incubar por 24 horas a 37ºC en aerobiosis. Se realizan pases sucesivos de tal manera que se asegure que la cepa se encuentre en la fase de crecimiento exponencial.

El inóculo se prepara por suspensión de las cepas en caldo tripticasa de soja, equivalente al tubo 5 de la escala de Mac-Farland (10^8 UFC/ml)

Tinción de Gram

Este método de tinción tiene una enorme importancia bacteriológica, ya que me va permitir clasificar morfológicamente a las bacterias en dos grandes grupos:

- **Bacterias Gram Negativas**

Presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, por lo o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue, por tener la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram [(14)]

- **Bacterias Gram Positivas**

Presentan sólo una membrana lipídica externa capaz de proteger el **citoplasma bacteriano** y la pared de peptiglicano son mucho más gruesa, que presentan ácidos teicoicos en su superficie. Entre otras cosas, se distinguen especialmente

por teñirse de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram aplicada en bacteriología. [14]

Evaluación de Actividad Antimicrobiana

Determinación Concentración Mínima Inhibitoria

De los extractos que tuvieron inhibición, se realizó la prueba de CMI por el método doble dilución de agar, realizando diluciones de 1/2,1/4, 1/8, 1/16 de la solución en la cual se inhibió el crecimiento.

Preparamos el inoculo con las cepas en caldo tripticasa soja a una concentración similar al patrón 5 de Mac-Farland, al cual se diluye 1/200 obteniendo una concentración microbiana final de 10^5 -10^6 se prueba con las concentraciones de los extractos y se incuba durante 24 horas a 37 ºC en aerobiosis, sobre un agitador rotatorio, se revisa el crecimiento bacteriano en el medio líquido.

Se leen los resultados, en los que se consideró como CMI la del tubo con mayor dilución del extracto que no presente aumento de turbidez respecto al tubo testigo guardado en la nevera.

Para conocer si la CMI es de efecto bacteriostático o bactericida, se sembró con un asa sobre agar Muller – Hinton y se observó después de la incubación de 18 a 20 horas a 37°C si se produce o no crecimiento.

Determinación de Concentración mínima bactericida

Para medir la concentración mínima bactericida (CMB), se usarán los resultados anteriores y se dará por la concentración del tubo con menos concentración de extracto que niegue el crecimiento sobre el medio sólido. Evaluación de Actividad Antimicrobiana: En planta de estudio

Preparación de diluciones

Se preparan 3 diluciones decimales equivalentes a: 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 usando el mismo solvente con que se hizo la extracción

Preparación de discos

Estos discos se preparan con las disoluciones de la planta de estudio, estos discos fueron elaborados con papel filtro Whatman N° 3, o su equivalente, usando un sacabocados de 6 mm diámetro y 0.6 mm de espesor

Colocación de los discos o comprimidos.

El microbiólogo escogió los discos o comprimidos que contienen aquellos antimicrobianos que son útiles frente a microorganismos aislados, y que difundan bien hasta el lugar de la infección.

Los discos utilizados fueron de papel estéril y contienen cantidades valoradas de antibióticos, se mantuvieron en refrigerador a +/- 4ºC, excepto los derivados de beta-lactamicos, que se almacenan a -20ºC para evitar que pierdan potencia, guardándose solo en nevera aquellos que se vayan a utilizar en un periodo breve de tiempo (aproximadamente una semana). Los comprimidos pueden guardarse a temperatura ambiente.

La colocación se efectúo individualmente mediante pinzas flameadas o con la ayuda de un dispensador múltiple, asegurándose posteriormente de que mantienen un perfecto contacto con la superficie del medio. Por placa de 9 cm. de diámetro pueden utilizarse de seis a ocho discos comprimidos, colocándose en las placas de 15 cm. Entre 12 y 16.

Antes de incubar, dejar reposar las placas a temperatura ambiente durante siete minutos (no más de diez minutos) para que los discos hagan una pre difusión. Lectura de los halos de inhibición.

Se efectúo de 18-24 horas de incubación a 37ºC en la atmosfera adecuada. Este método es adecuado únicamente para bacterias patógenas de crecimiento rápido. Una incubación más prolongada puede dar lugar a interpretaciones erróneas del halo de inhibición.

La medida de la zona de inhibición de crecimiento alrededor de los discos se realizó con un pie de rey, con una regla milimetrada, o con medidores especiales

Equipos

- ✓ Autoclave
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Estufa
- ✓ Incubadora
- ✓ Mechero Bunsen
- ✓ Microscopio
- ✓ Micro pipetas
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Rota vapor
- ✓ Molino de cuchillas
- ✓ pH metro
- ✓ Cámara de Bioseguridad
- ✓ Esterilizador
- ✓ Liofilizador
- ✓ Densitómetro digital
- ✓ Pinzas
- ✓ Tijeras
- ✓ Regla milimetrada

Reactivos

- ✓ Agua destilada
- ✓ Medios de Cultivo
    - ❖ Agar Sabouraud
    - ❖ Agar Sangre

- ❖ Agar Müller Hinton
- ❖ Agar Chapman Manitol
- ❖ Agar Mac-Conkey

- ✓ Discos de sensibilidad
- ✓ Colorantes de la tinción de Gram

Cristalería

- ➢ Erlenmeyer
- ➢ Frascos de vidrio color ámbar
- ➢ Pipetas
- ➢ Probetas
- ➢ Tubos de ensayo pírex con tapón de rosca 10 y 15 ml
- ➢ Varilla de vidrio estéril
- ➢ Vasos de precipitación
- ➢ Cajas de Petri desechables de 8mm

Consumibles

- ✓ Algodón
- ✓ Asa de nicromo en argolla
- ✓ Aplicadores con mango de madera
- ✓ Papel Filtro Whatman N° 3
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Cinta de autoclave

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

La difusión de los resultados está a cargo del egresado, que se a realizo con la autorización previa de la coordinador de la Carrera de Laboratorio Clínico, que fue dirigida a los estudiantes y docentes que cursan el 7mo módulo, los mismos que se citaron en el auditórium y a través de un tríptico y presentación visual pudieron conocer los resultados del trabajo investigado.

Análisis de datos:

Los datos una vez registrados se dieron a conocer y fueron analizados de acuerdo a la planta para verificar si existe o no actividad antibacteriana y antimicótica.

RESULTADOS

TABLA N.- 1

Resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente) flores.

Nombre de especie de la planta Hippobroma Longiflora Parte utilizada: Flores	Disco	Microorganismo: **Escherichia coli** ATCC: **25922**		
		Disco de control positivo: Ciprofloxacina (CIP 20mcg)		
		Inhibición (mm)		
		Dilución 1/100	Dilución 1/1.000	Dilución 1/10.000
		R1	R1	R1
Solvente Hexánico :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	40 mm	40 mm	40 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
Solvente 2 Etanólico (70%) :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	40 mm	40 mm	40 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
Solvente 3 Acuoso :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	40 mm	40 mm	40 mm
	CN	Neg	Neg	Neg

Leyenda: R: repetición; **SE,** sustancia ensayada; **CP,** Control positivo; **CN,** control negativo.
Fuente: Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.
Autor: Diego Rey

Interpretación

Las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, Hexánico, Etanólico y Acuoso de *Hippobroma longiflora* no presentan actividad antibacteriana frente a la cepa *de E. coli* empleada mediante el método utilizado; al no observarse ningún halo.

En el control positivo, se observó la formación del halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos, los que están dentro de los rangos normales, es decir la bacteria es sensible para la Ciprofloxacina. Por otro lado, en el control negativo no se apreció la presencia de halo de inhibición lo que nos permite constatar que el método empleado está bien por lo tanto los resultados obtenidos son seguros. No se realizó la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antibacteriana de los extractos Hexánico, Etanólico y Acuoso de *H. Longiflora* frente a *E. coli*

TABLA N.- 2

Resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente) flores

Nombre de especie de la planta Hippobroma Longiflora Parte utilizada: Flores	Disco	Microorganismo: **Staphylococcus aureus** ATCC: **25923** Disco de control positivo: Ampicilina + Sulbactan (SAM 10mcg) Inhibición (mm)		
		Dilución 1/100	Dilución 1/1.000	Dilución 1/10.000
		R1	R1	R1
: Solvente Hexánico	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	42 mm	42 mm	42 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
: Solvente 2 Etanólico (70%)	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	42 mm	42 mm	42 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
: Solvente 3 Acuoso	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	42 mm	42 mm	42 mm
	CN	Neg	Neg	Neg

Leyenda: R: repetición; **SE,** sustancia ensayada; **CP,** Control positivo; **CN,** control negativo.
Fuente: Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.
Autor: Diego Rey

Interpretación

Las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, Hexánico, Etanólico y Acuoso de *Hippobroma longiflora* no presentan actividad antibacteriana frente a la cepa *de S.* aureus empleada mediante el método utilizado; al no observarse ningún halo.

En el control positivo, se observó la formación del halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos, los que están dentro de los rangos normales, es decir la bacteria es sensible para la Ampicilina + Sulbactan. Por otro lado, en el control negativo no se apreció la presencia de halo de inhibición lo que nos permite constatar que el método empleado está bien por lo tanto los resultados obtenidos son seguros. No se realizó la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antibacteriana de los extractos Hexánico, Etanólico y Acuoso de *H. Longiflora* frente a *S.* aureus.

TABLA N.- 3

Resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente)

Nombre de especie de la planta Hippobroma Longiflora Parte utilizada: Flores	Disco	Microorganismo: **Klebsiella pneumoniae** ATCC: **13883**		
		Disco de control positivo: Ampicilina + Acido Clavulonico (AMC 20mcg)		
		Inhibición (mm)		
		Dilución 1/100	Dilución 1/1.000	Dilución 1/10.000
		R1	R1	R1
Solvente Hexánico :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	20 mm	20 mm	20 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
Solvente 2 Etanólico (70%) :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	20 mm	20 mm	20 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
Solvente 3 Acuoso :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	20 mm	20 mm	20 mm
	CN	Neg	Neg	Neg

Leyenda: R: repetición; **SE,** sustancia ensayada; **CP,** Control positivo; **CN,** control negativo.
Fuente: Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.
Autor: Diego Rey

Interpretación

Las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, Hexánico, Etanólico y Acuoso de *Hippobroma longiflora* no presentan actividad antibacteriana frente a la cepa *de K.* pneumoniae empleada mediante el método utilizado; al no observarse ningún halo.

En el control positivo, se observó la formación del halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos, los que están dentro de los rangos normales, es decir la bacteria es sensible para la Ampicilina + Acido Clavulonico. Por otro lado, en el control negativo no se apreció la presencia de halo de inhibición lo que nos permite constatar que el método empleado está bien por lo tanto los resultados obtenidos son seguros. No se realizó la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antibacteriana de los extractos Hexánico, Etanólico y Acuoso de *H. Longiflora* frente a *K.* pneumoniae.

TABLA N.- 4

Resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente)

Nombre de especie de la planta Hippobroma Longiflora Parte utilizada: Flores	Disco	Microorganismo: **Pseudomona Aeruginosa** ATCC: **27653**		
		Disco de control positivo: Gentamicina (CN 30mcg)		
		Inhibición (mm)		
		Dilución 1/100	Dilución 1/1.000	Dilución 1/10.000
		R1	R1	R1
Solvente Hexánico :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	21 mm	21 mm	21 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
Solvente 2 Etanólico (70%) :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	21 mm	21 mm	21 mm
	CN	Neg	Neg	Neg
Solvente 3 Acuoso :	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	21 mm	21 mm	21 mm
	CN	Neg	Neg	Neg

Leyenda: R: repetición; **SE,** sustancia ensayada; **CP,** Control positivo; **CN,** control negativo.
Fuente: Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.
Autor: Diego Rey

Interpretación

Las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, Hexánico, Etanólico y Acuoso de *Hippobroma longiflora* no presentan actividad antibacteriana frente a la cepa *de* Pseudomona Aeruginosa empleada mediante el método utilizado; al no observarse ningún halo.

En el control positivo, se observó la formación del halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos, los que están dentro de los rangos normales, es decir la bacteria es sensible para la Gentamicina. Por otro lado, en el control negativo no se apreció la presencia de halo de inhibición lo que nos permite constatar que el método empleado está bien por lo tanto los resultados obtenidos son seguros. No se realizó la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antibacteriana de los extractos Hexánico, Etanólico y Acuoso de *H. Longiflora* frente a P. Aeruginosa.

TABLA N.- 5

Resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente)

Nombre de especie de la planta Hippobroma Longiflora Parte utilizada: Flores	Disco	Microorganismo: **Cándida albicans** ATCC: **26790** Disco de control positivo: Fluconazol (FL 10mcg) Inhibición (mm)		
		Dilución 1/100	Dilución 1/1.000	Dilución 1/10.000
		R1	R1	R1
: Solvente Hexánico	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	16mm	16mm	16mm
	CN	Neg	Neg	Neg
: Solvente 2 Etanólico (70%)	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	16mm	16mm	16mm
	CN	Neg	Neg	Neg
: Solvente 3 Acuoso	SE	Neg	Neg	Neg
	CP	16mm	16mm	16mm
	CN	Neg	Neg	Neg

Leyenda: R: repetición; **SE,** sustancia ensayada; **CP,** Control positivo; **CN,** control negativo.
Fuente: Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.
Autor: Diego Rey

Interpretación

Las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, Hexánico, Etanólico y Acuoso de *Hippobroma longiflora* no presentan actividad antimicótica frente a la cepa *de* Cándida albicans empleada mediante el método utilizado; al no observarse ningún halo.

En el control positivo, se observó la formación del halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos, los que están dentro de los rangos normales, es decir la bacteria es sensible para la Fluconazol. Por otro lado, en el control negativo no se apreció la presencia de halo de inhibición lo que nos permite constatar que el método empleado está bien por lo tanto los resultados obtenidos son seguros. No se realizó la CMI y CMB a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antibacteriana de los extractos Hexánico, Etanólico y Acuoso de H. Longiflora frente a Cándida.

DISCUSIÓN

La presente investigación se realizo en el Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de Loja, en el Laboratorio de la Unidad de Fitoquimica y Microbiología, con finalidad de evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de la flor de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar modificado frente a cinco cepas puras de microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *y Cándida albicans* (ATCC 26790). Con la metodología empleada se constató que las plantas no presentan actividad antimicrobiana contra ningún de los microorganismos empleados en las concentraciones: 1/100, 1/1.000 y 1/10.000, mientras que en el control positivo se observó la formación de un halo alrededor de cada uno de los discos los mismos que se encontraron dentro de los rangos normales esperados. Por otro lado el control negativo no se observó la presencia de halos de inhibición lo que nos permite constatar que el método empleado estuvo bien aplicado por lo tanto los resultados obtenidos son confiables.

Es necesario indicar que los siguientes estos estudios se realizaron empleando la misma metodología de mi estudio pero varían en la utilización de diluciones, sustancia ensayada y algunas bacterias.

En el Departamento de Microbiología y Parasitología. Escuela de Bioanálisis. 2 Instituto de Investigaciones. En la ciudad de Mérida Venezuela un grupo de estudiantes conformado por Damerys Rangel, Ilania García, Judith Velasco, Dio limar Buitrago Y Elsa Velazco se realizaron evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los extractos Etanólico, Acetónico y Acuoso, de la partes aéreas de Baccharis nítida. En algunos países ciertas especies de Baccharis (B. trimera, B. articulata, y B. crispa) son usadas en medicina popular, en forma de infusiones para el tratamiento de reumatismo, desordenes hepatobiliares, diabetes y externamente para los casos de ulceración de la piel y heridas. Por lo que se obtuvieron resultados en la valoración de la actividad antimicrobiana de los extractos Etanólico, Acetónico y Acuoso de la especie vegetal B. nítida, los cuales refieren actividad antibacteriana de todos los extractos sólo contra S. aureus a excepción de la dilución 1:10 del extracto acuoso; además, ninguno mostró actividad anti fúngica contra la levadura.

Ileana Moreira y Elizabeth Arnáez en estudiantes de la Universidad de Costa Rica, del Herbario del INbio y del Herbario del Departamento de Historia Natural del Museo Nacional de Costa Rica. Hicieron un estudio de plantas utilizadas en la medicina popular que han sido usadas en tratamientos curativos de lesiones cutáneas. Para evaluar su actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozos de agar nutritivo con empleo de cepas de Micrococcus Luteus, Proteus mirabilis, E. coli y Staphylococcus aureus. En el cual se emplearon distintas concentraciones por lo que se obtuvieron resultados desfavorables con la actividad antimicrobiana de los extractos para las bacterias empleadas en este estudio.

Es de suma importancia indicar que no hay otros estudios en Ecuador acerca de la familia de Campanulaceae ya que la *H. longiflora* es la única en su especie por lo que tiene nombre propio. Por ello que no se ha descartado la presencia de actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos hexanico, etanólico y acuoso de la flor de la planta *Hippobroma longiflora* empleando otras metodologías y diferente concentraciones en diluciones. Por lo que justifica la realización de este trabajo.

Cabe también resaltar que aparentemente hubo una posible actividad antibacteriana frente a Pseudomona aeruginosa en la dilución de 1/100 del extracto acuoso en flores, pero esto se descartó haciendo la **Concentración Mínima inhibitoria** por lo que salió negativa, pero para descartar cualquier duda de presencia o no de actividad se hizo una siembra con la bacteria antes mencionada luego se colocaron discos con extracto acuoso de mayor concentración haciendo las diluciones 1/40, 1/80 y 1/120 por lo que en las lecturas salieron en algunas positivas y otras negativas por lo que los resultados no son concluyentes y es por ello que se harán estudios posteriormente con diferentes metodologías para descartar toda duda sobre la presencia o no de la actividad de esta planta.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo investigativo se concluye lo siguiente:

- Mediante la técnica implementada el extracto hexanico, etanólico al 70% y acuoso de H. Longiflora no presento actividad en las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 frente a las cepas de Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Escherichia coli (ATCC 25922), Klebsiella pneumoniae (ATCC 13883) y Pseudomona Aeruginosa (ATCC 27653), mediante el método de difusión en agar modificado.

- Mediante la técnica implementada el extracto hexanico, etanólico al 70% y acuoso de H. Longiflora flores no presentan actividad antimicótica en las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 frente a las cepas del hongo Cándida albicans (ATCC 26790 mediante el método de difusión en agar modificado.

- Los resultados fueron difundidos a los estudiantes y docentes del séptimo módulo de la carrera de Laboratorio Clínico, organizando un evento en el Auditorio Antonio Peña Celí del Área de la Salud Humana

RECOMENDACIONES

Al finalizar el presente trabajo investigativo se recomienda lo siguiente:

- Aplicar todas las normas de Bioseguridad antes, durante y después de cada procedimiento realizado en el laboratorio, realizar pruebas piloto para estandarizar procedimientos y validar el método que se va a emplear y hacer control de calidad de los equipos a utilizar y medios de cultivo preparados para evitar contratiempos.

- Utilizar una cepa joven (fase exponencial) para realizar el ensayo de actividad antibacteriana.

- En la preparación de medios de Mueller Hinton verificar el pH y el grosor del medio para obtener un buen halo de inhibición adecuado.

- Emplear un método adecuado para la conservación de las cepas ATCC empleadas, las mismas que servirán para posteriores estudios relacionados con este tipo.

- Emplear nuevos métodos para el estudio de actividad antibacteriana de extractos de plantas, particularmente esta planta.

BIBLIOGRAFIA

1. Colegio Oficial De Farmacéuticos de Lleida, “definición de plantas medicinales según la OMS”, http://www.coflleida.cat/)

2. Plutarco Naranjo, Ruperto Escaleras. La medina tradicional en Ecuador, 1ra edición, Pichincha – Quito, corporación editora nacional.

3. BOTANICAL ON LINE, “Medicina tradicional”, http://www.botanicalonline.com) 2001.

4. Rangel D., García I., Velasco J., Buitragro D., Velazco E. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de Baccharis nitida (Ruiz et Pavon) Pers. Revista de la Facultad de Farmacia –Venezuela.

5. Neil, D. Ecuador: Centro mundial de la diversidad biológica. Rev. Cultura. 1996.

6. Hippobroma». Royal Botanic Gardens, Kew: World Checklist of Selected Plant Families. Consultado el 5 de enero de 2010. http://es.wikipedia.org/wiki/Hippobroma
7. Directrices inter organismos. Directrices sobre donativos de medicamentos, revisión 1999. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1999. WHO/EDM/PAR/99.4. pdf.
8. Plantas con acción antimicrobiana, Servicio de microbiología, Hospital Universitario de la princesa, Madrid.
9. Bacteria Staphylococcus aureus: síntomas, contagio y tratamiento | Suite101.net http://suite101.net/article/bacteria-staphylococcus-aureus-sintomas-contagio-y-tratamiento-a43652#ixzz2LUFtQHDD
10. Automedicación (http://www.redsaf.org/index.php?pag=boletin) 2008
11. http://www.cedimcat.info/html/es/dir2434/doc10636.html
12. http://www.stuartxchange.com/Estrella.html
13. LOCK, OLGA, “Análisis fitoquimico y metabolitos secundarios”, (http://www.maca-peruana.com/analisis.htm) Enero de 2011.
14. http://inmortaldna.com/LMI/blog/2011/10/02/metabolismo-secundario-en-plantas/
15. Henry, J. El laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Homenaje a Todd Sanford, Davidsohh. 20va ed. Madrid. Marbán libros. 2005. Págs. 1120 - 1126.
16. Jawetz, Melnick y Adelberg, Microbiología médica. Editorial El Manual Moderno S.A. México, Ed. 2005. Págs. 56, 57 y 58.
17. *Koneman.* Diagnostico Microbiológico. 6ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina. Pág.325-336.
18. Linares, M. y Solis, F. Identificación de levaduras. Rev. Iberoamericana de Micología – 10-11-2001.
19. Murray Patrick, Rosenthal Ken, Pfauer, Michael. Microbiología médica. Editorial Elsevier, Madrid. Pág. 45-51.
20. M.V. Alvarez. E. Boquet. Manual de Tecnicas en Microbiología Clínica. Edición Original. Pág. 116- 135.
21. http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_resumen.pdf

22. Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
23. Fernández, C. y Mazziota, D. Gestión de la calidad en el Laboratorio Clínico. 1ra ed. Buenos Aires. Medica Panamericana. 2005. Págs. 500 – 508.
24. Departamento de Microbiología y Genética Universidad de Salamanca" http://imb.usal.es/Practicas2/P2/Practicas2.pdf.
25. http://www.asociacionicaro.org/355/plantas-medicinales-amazonicas-2
26. http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/plantas-medicinales.html.
26. Cepas ATCC http://www.sanilabo.com/pdf/pdf_industria/02.Cepas.pdf

ANEXOS

Anexo 1

Certificado de la realización de los ensayos de la tesis en los laboratorios.

1859

Doctor. Luis Morocho Yaguana. **ENCARGADO DEL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE FITOQUÍMICA DE LA UNL.**

CERTIFICO

Que el señor Diego Michael Rey Curay, CC 1900498963, Egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico, realizo las prácticas de su proyecto de tesis bajo mi tutoría, con el tema **"Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de la flor de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar."** por el lapso de nueve meses, esto es de febrero a octubre del 2013.

Es todo lo que puedo certificar en honor a la verdad, facultando al interesado hacer uso del mismo en lo que estimare conveniente.

Loja, a 14 de noviembre de 2013.

Doctor. Luis Morocho Yaguana.
ENCARGADO DE LA UNIDAD DE FITOQUÍMICA DE LA UNL

Anexo 2

Autorización para difundir los resultados.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Ofic. Nro. 959 CLC. ASH-UNL
Loja, 09 de diciembre del 2013

Licenciada Mg.
Enma Flores Pérez
DOCENTE DEL AREA DE LA SALUD HUMANA
Ciudad.-

De mis consideraciones:

En atención a la petición presentada por el señor **Diego Michael Rey Curay,** egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico, quién solicita autorización para socializar los resultados de su proyecto de tesis titulada: "

Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de la flor de *Hippobroma longiflora* (L) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar" con los estudiantes del VII Módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ante lo expuesto solicito a Usted que se de las facilidades necesarias para que el tesista socialice su trabajo investigativo con los estudiantes del VII Módulo de ésta Unidad Académica.

Hago propicia la ocasión para reiterarle mi gratitud y estima personal.

Atentamente,

EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA

Dr. Jorge Reyes Jaramillo Mg. Sc.
DIRECTOR DEL AREA DE LA SALUD HUMANA (E)

Copia: Señor Diego Michael Rey Curay, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico
Archivo

Elaborado: Ing. María Jiménez

Anexo 3

Procedimientos realizados en el laboratorio de Fitoquímica.

ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO

Anexo Nº 1.-

Certificado de la realización de los ensayos de la tesis en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Nacional de Loja.

Anexo Nº 2.-

Procedimientos realizados en laboratorio de Fitoquímica.

Protocolo N.- 001: Instructivo para la colecta de drogas.

Protocolo N.- 002: Obtención de extractos con Etanol de plantas medicinales por maceración.

Protocolo N.- 003: Obtención de extractos con Hexano de plantas medicinales por maceración.

Protocolo N.- 004: Obtención de extractos con Agua de plantas medicinales por maceración.

Protocolo N.- 005: Operación de concentración en rota vapor.

ANEXO N.- 3

PROTOCOLOS DE PROCEDIMIENTOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE FITOQUÍMICA.

1. **TITULO: INSTRUCTIVO PARA LA COLECTA DE DROGAS.**
2. **OBJETIVO:** Garantizar la colección de muestras de drogas para estudios fotoquímicos y de bioactividad.
3. **ALCANCE:** El presente instructivo es aplicable al procedimiento de obtención de drogas a ser estudiadas en el Laboratorio de la Unidad de Fitoquímica-UNL.
4. **RESPONSABILIDADES:**

   Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas, Pasantes.

   Verificación: Responsable del laboratorio de Fitoquímica.

   Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.
5. **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.
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.

Proyecto plantas medicinales, plaguicidas y tóxicas de la RSE: estudio Fotoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.
Responsables: Dr. Luis Morocho.

1. **TITULO: OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES POR MACERACIÓN.**
2. **OBJETIVOS:** Definir el procedimiento para la elaboración de extractos de plantas medicinales por el método de maceración.
3. **ALCANCE**: El presente procedimiento es aplicable al procedimiento de obtención de extractos de plantas medicinales en el Laboratorio de la Unidad de Fitoquímica-UNL.
4. **RESPONSABILIDADES:**

   Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas, Pasantes.

   Verificación: Responsable del Laboratorio de Fitoquímica.

   Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.
5. **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) Agitar por 24 horas en un agitador magnético a temperatura ambiente..

   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 rota vapor (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 24 horas y retomar el proceso de concentración. Repetir este procedimiento dos veces más o hasta agotamiento (hasta cuando el extracto es casi del color del solvente usado) según requerimiento.

1. **TITULO: OPERACIÓN DE CONCENTRACIÓN EN ROTAVAPOR.**
2. **OBJETIVOS:** Garantizar el buen funcionamiento y uso de los rota vapores del Laboratorio de Fitoquímica.
3. **ALCANCE:** El presente procedimiento es aplicable a rota vapores en el Laboratorio de la Unidad 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.

4. **RESPONSABILIDADES:**

Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas.

Verificación: Responsable del laboratorio de Fitoquímica.

Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

5.- 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 rota vapor 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. A cabo de unos 10 minutos encender el rota vapor, presionando el botón de encendido ubicado en la parte superior derecha del panel de mandos.

NOTA: La temperatura del baño María se elige de acuerdo al solvente usado, así hexano a 30 ºC, etanol y metanol a 40 ºC y agua a 45 ºC. Otras temperaturas deberán ser declaradas en los protocolos pertinentes.

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 balón 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.

NOTA: Las temperaturas van a variar de acuerdo al solvente en el baño María, con hexano 20° C, etanol 40° C y con agua es de 45 °C conforme a la técnica utilizada.

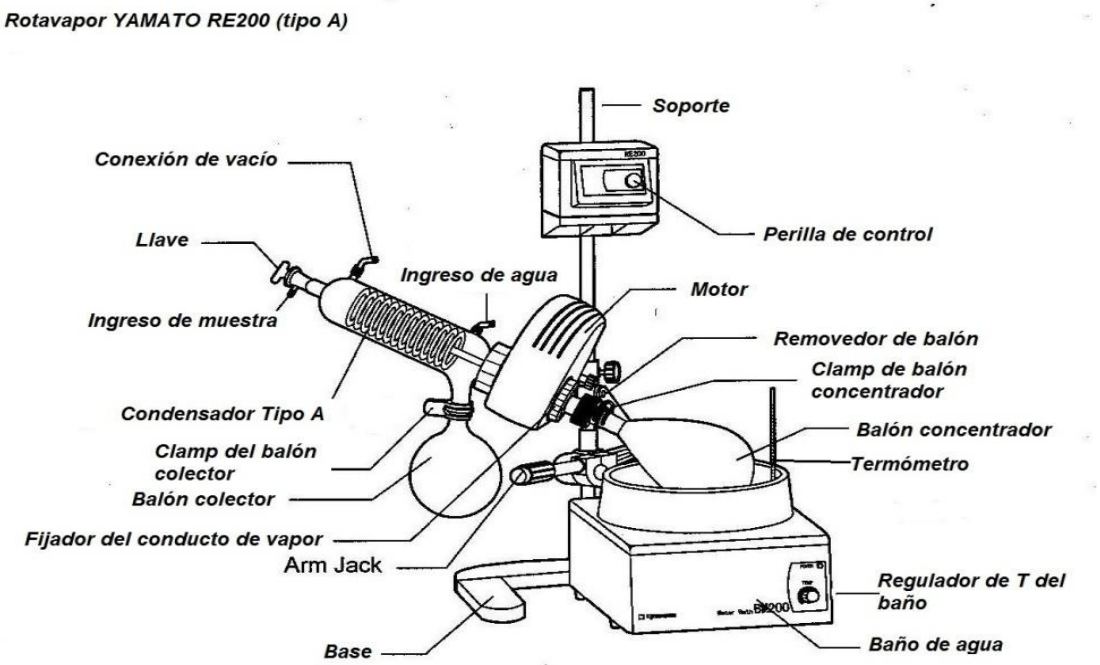
o) Deposite en contenido del balón concentrador en un cristalizador o recipiente adecuado para proceder al secado final o liofilización.

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 pizeta 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.

s) 5.- DIAGRAMA/ANEXOS



Proyecto plantas medicinales, plaguicidas y tóxicas de la RSE: estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.
Responsables: Dr. Luis Morocho.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 4: Procedimientos realizados en el laboratorio de Microbiología.

CONTENIDO

Procedimientos Realizados en el Laboratorio de la Unidad De Microbiología.

Protocolo N.- 001: Bioseguridad

Protocolo N.- 002: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar sangre.

Protocolo N.- 003: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Mac-Conkey.

Protocolo N.- 004: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Mueller Hinton.

Protocolo N.- 005: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: Agar Chapman Manitol.

Protocolo N.- 006: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Cetrimide.

Protocolo N.- 007: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: caldo Tripticasa de Soja.

Protocolo N.- 008: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Tripticasa de Soja.

Protocolo N.- 009: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Dextrosa Sabouraud.

Protocolo N.- 010: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: caldo agar de Infusión Cerebro Corazón.

Protocolo N.- 011: Procedimientos para la preparación del medio Citrato de Simmons.

Protocolo N.- 012: Procedimientos para la preparación del medio Triple Azúcar Hierro: TSI.

Protocolo N.- 013: Procedimientos para la preparación del medio Sulfuro Indol Movilidad (SIM).

Protocolo N.- 014: Procedimientos para la preparación del medio de Fenilalanina Desaminasa.

Protocolo N.- 015: Procedimiento para la realización de la prueba de Catalasa.

Protocolo N.- 016: Procedimiento para la realización de la prueba de Coagulasa.

Protocolo N.- 017: Procedimiento para la realización de la prueba de identificación micótica: KOH.

Protocolo N.- 018: Procedimiento para la realización del test de filamentación.

Protocolo N.- 019: Procedimiento para la realización de la tinción de Gram.

Protocolo N.- 020: Procedimiento para la preparación del patrón n.- 5 de Mac Farland.

Protocolo N.- 021: Procedimiento para la preparación del Inóculo.

Protocolo N.- 022: Viabilización y conservación de *Staphylococcus aureus*.

Protocolo N.- 023: Viabilización y conservación de *Escherichia coli.*

Protocolo N.- 024: Viabilización y conservación de *Klebsiella pneumoniae*.

Protocolo N.- 025: Viabilización y conservación de *Pseudomona aeruginosa***.**

Protocolo N.- 026: Viabilización y conservación de *Cándida albicans*.

Protocolo N.- 027: Preparación de discos de sensibilidad.

Protocolo N.- 028: Comprobación de los discos de sensibilidad.

Protocolo N.- 029: Procedimiento para evaluar la actividad antibacteriana por el método de difusión en discos.

Protocolo N.- 030: Procedimiento para evaluar la actividad antifúngica por el método de difusión en discos.

Protocolo N.- 031: Procedimiento para la realización de la concentración mínima inhibitoria en la evaluación antimicrobiana.

Protocolo N.- 032: Procedimiento para la realización de la concentración mínima bactericida en la evaluación antimicrobiana.

ANEXO N.- 4

PROTOCOLOS DE PROCEDIMIENTOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA.

1. **TITULO: BIOSEGURIDAD**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado sobre normas y procedimientos de bioseguridad.
3. **ALCANCE:** Aplicar las buenas prácticas de Laboratorio en cuanto a bioseguridad en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico 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:**

Accidente: Suceso eventual o acción que involuntariamente resulta dañino para las personas. Para que se produzca un accidente por un agente biológico deben estar presente 4 elementos: un huésped susceptible, un agente infeccioso, una concentración suficiente de éste y una ruta de transmisión adecuada.

Agentes Biopeligrosos: Son todos aquellos agentes biológicos y materiales que son potencialmente peligrosos para los seres humanos, animales y plantas. Entre ellos podemos citar: bacterias, virus, hongos, parásitos, productos recombinantes, alérgenos, priones, etc.

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.

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. Además de proveer al personal que labora en el laboratorio de microbiología la

aplicación de técnicas y equipos necesarios para prevenir la exposición a agentes potencialmente infecciosos.

Descontaminación: proceso utilizado para eliminar o matar microorganismos, para referirse a la eliminación o neutralización de sustancias químicas peligrosas y materiales radioactivos.

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

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

Riesgo Microbiológico: El Riesgo Microbiológico se encuentra presente cada vez que se realiza una actividad práctica en el Laboratorio, donde se requiera la manipulación de cultivos de microorganismos, los cuales pueden alcanzar concentraciones muy elevadas y pueden llegar a provocar una infección si no son manipulados adecuadamente.

6. **METODOLOGÍA:** Normas de bioseguridad que serán aplicadas en el Laboratorio de Microbiología, con la finalidad de asegurar la salud de todos las personas involucradas.
7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Normas de Bioseguridad para el Laboratorio de microbiología**	- El acceso al laboratorio estará limitado solo al personal autorizado. - 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 cada jornada de trabajo y siempre que haya un derrame. - Utilizar cabina de bioseguridad biológica, no olvidar encender la lámpara y el flujo antes de abrir la ventana. - Colocar el símbolo de riesgo biológico en las áreas biocontaminadas. - No guardar alimentos en las neveras ni en los equipos de refrigeración de trabajo deben ser confortables. - El transporte de las muestras dentro o entre laboratorios se realizará en cajas herméticas, para evitar que se produzcan salpicaduras. - Todos los cultivos se autoclavan antes de ser eliminados.

		- Todos los desechos biológicos ya sean líquidos o sólidos deben ser descontaminados antes de eliminarlos.
2	**Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio**	- Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos. Evitar distracciones. - En el laboratorio de microbiología se prohíbe el ingreso con teléfono celular y pertenencias personales, el ingreso al laboratorio será solo con el uniforme específico de bioseguridad. - Nunca se pipeteará con la boca. - 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 - Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito. - El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido. - Emplee mascarilla y protectores oculares durante procedimientos que salpicaduras, aerosoles o derrames importantes de sangre u otros líquidos orgánicos. - Absténgase de tocar con las manos enguantadas alguna parte de su cuerpo puedan generar salpicaduras o gotitas aerosoles de sangre u otros líquidos corporales. - Evite la atención directa de pacientes si usted presenta lesiones exudativas o curitas. - Mantenga actualizado su esquema de vacunación contra Hepatitis B.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- ✓ Garcés A. Normas de seguridad en el laboratorio de microbiología. Abril 2008

- ✓ OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3era edición. Ginebra. 2005. Pags 89-90
- ✓ Vega E. normas de bioseguridad del Sistema Nacional de Laboratorios de Diagnóstico. 2002. Pág. 31-32.
- ✓ Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ra edición; Organización Mundial de la Salud Ginebra Suiza, 2005 En: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf; consultado el 20 de Abril Del 2013.

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: AGAR SANGRE**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Sangre.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

Agar: Sustancia mucilaginosa amorfa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas. Se emplea en la preparación de medios de cultivo en bacteriología, con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias.

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 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 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o

vapor. 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.

5. **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.
6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer el envase del polvo para la preparación de Agar Sangre (Casa Comercial (SCHARLAU), 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**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.

4	**Esterilización del medio de cultivo**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Colocación de la sangre humana desfibrinada**	Enfriar el medio de cultivo preparado hasta la temperatura entre 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5% y homogenizar.
6	**Distribución del medio de cultivo y solidificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
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 colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
8	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Los medios de cultivo en microbiología: disponible en http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/medioscult/_madre_medios.html Consultado 20 de noviembre de 2011 18:00
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: MAC-CONKEY

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

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

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.

3. DEFINICIONES:

Agar: Sustancia mucilaginosa amorfa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas. Se emplea en la preparación de medios de cultivo en bacteriología, con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias.

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 Mac-Conkey: Medio de cultivo usado para el aislamiento selectivo de entero bacterias, se caracteriza por contener lactosa y un indicador de cambio de pH que detecta la actividad fermentadora sobre este azúcar, que vira a rojo ladrillo en medio acido. Las sales biliares y el cristal violeta actúan como inhibidores, además este medio tiene sustancias inhibidoras de Gram-positivos.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. 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.

Cultivo bacteriano: 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).

4. **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.
5. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer el envase del polvo para la preparación de Agar **Mac-Conkey** (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**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
		Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado

4	**Esterilización del medio de cultivo**	de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se cierran adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**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 colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Prep

araci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pag 64
- Prats Pastor G. Microbiología Clínica. 1era edición. Editorial medica panamericana. Madrid 2007
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL AGAR: MUELLER HINTON**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del Agar: Mueller-Hinton.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

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).

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.

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).

5. **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.

6. **DESARROLLO**:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Mueller-Hinton (Casa Comercial SCHARLAU), 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.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Medición del pH.**	Colocar 5ml de medio de cultivo en un tubo de ensayo, esperar que se solidifique, introducir una varilla, realizar un orificio y con la ayuda de la aguja del potenciómetro introducir en el orificio del agar y medir el pH; que oscile ente (7,2 ± 0.2 a 7,4), a temperatura ambiente (25ºC).
6	**Distribución del medio de cultivo y sodificación.**	Verter con ayuda de una probeta de 25ml del medio recién preparado en una placa de petri, 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. Ya sólidas, se cierran adecuadamente, Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.

7	**Control de calidad del medio de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva. Comprobar si hay signos de deterioro como: contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, o agrietamiento en el medio de cultivo el lote debe ser eliminado.
8	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado. La duración de este medio de cultivo es de 7 a 14 días.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

7. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10, 198 y 199.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClasePr

ocariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO** **UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA**	**PR-ACM** **UNL-005**

1. TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: AGAR CHAPMAN MANITOL

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

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. 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.

4. DEFINICIONES:

Agar: Sustancia mucilaginosa amorfa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas. Se emplea en la preparación de medios de cultivo en bacteriología, con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias.

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 Champan Manitol: Medio selectivo- diferenciador de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus,* inhibiendo el crecimiento de otras bacterias al utilizar una alta concentración de sal. Al adicionar cloruro de sodio al 7.5% actúa como inhibidor y no permite el crecimiento de ningún otro microorganismo, las peptonas y el extracto de carne que contiene este medio proporciona la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El rojo de fenol actúa como indicador de pH y el agar es un agente solidificante. Las colonias de *Staphylococcus aureus* fermentan el manitol, son amarillas o anaranjadas.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. 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.

Cultivo bacteriano: 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).

5. 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.

6. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer el envase del polvo para la preparación de Agar Champan Manitol (Casa Comercial SCHARLAU), según la cual se debe suspender 111 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**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
		Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel

5	**Distribución del medio de cultivo y solidificación.**	recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**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 colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 24.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcari

ontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pág. 67
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. 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 e identificación del género Pseudomonas (principalmente *P. Aeruginosa)*; y que sobre la base de este agar se promueve tanto la producción de la piocianina como la fluoresceína. Esta última solo puede observarse bajo una lámpara de luz ultravioleta. Contiene cetrimide, que es el agente selectivo contra flora microbiana alterna (2).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 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. 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.

5. **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.
6. **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 el cual 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 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. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de

		seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
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 incubadora bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Araceli García del Valle. Manual de Microbiología Médica. 1998. Pág. 229.
- María del Rosario Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2ª edición. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid-España. 2000. Pág. 304.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClasePr

ocariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier. 2009. Pág. 162.
- Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias (http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf) consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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: es un caldo de enriquecimiento de utilización general en Microbiología, y recomendado para la determinación de la sensibilidad los antibióticos por el método de las diluciones, para la realización de hemocultivos, los ensayos de esterilidad y para uso general de laboratorio.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. 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.

5. **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.
6. **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 el cual 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 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 utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
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 una incubadora bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.

7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
2. Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
3. Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
4. Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
5. Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 37, 38.
6. Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
7. Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
8. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
9. Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR TRIPTICASA DE SOJA.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Tripticasa de Soja.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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 tripticasa de soja: medio para el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutritivos aerobios y anaerobios. Se puede utilizar como media base para el agar sangre y el agar chocolate. Normalmente contiene varias peptonas o triptonas, NaCl y dextrosa.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. 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.

5. **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.
6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1		Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Triptona de Soja (Casa Comercial

	Lectura de las indicaciones.	HIMEDIA), según el cual 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 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 utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
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 una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
		Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha. Almacenar y

7	**Almacenamiento y conservación.**	conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
2. Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
3. Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
4. Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
5. Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
6. Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9, 10 y 203.
7. Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
8. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
9. Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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.se trata de un medio de cultivo enriquecido que contiene caseína y tejido animal digeridos suplementados con glucosa; se han desarrollado diversas fórmulas, aunque la mayor parte de los micólogos utilizan la que tiene baja concentración de glucosa y un pH neutro. Al reducir el pH y añadir antibióticos para inhibir las bacterias, este medio de cultivo puede ser selectivo para hongos.

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. 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.

5. **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.
6. **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 el 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 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. Mezclar utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
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 una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier. 2009. Pág. 162.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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

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

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

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.

3. 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.

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.

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).

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. 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.

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.

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 Cerebro-Corazón (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada litro de agua destilada debe haber 37g de agar. 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 utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.[9.2i]
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	La preparación debe hervir hasta que tome un aspecto transparente. Evitar que se derrame.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	El matraz debe ser taponado con algodón o gasa, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca papel aluminio 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. se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en los tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**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 una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 28, 29, 37, 39 y 45.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO CITRATO DE SIMMONS.

2. OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del Medio Citrato de Simmons, como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. 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.

4. 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.

Prueba bioquímica: consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. La identificación bioquímica se fundamenta demás en las características metabólicas

específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

Citrato de Simmons: prueba bioquímica que determina la capacidad de un microorganismo de utilizar de citrato como fuente única de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante. Prueba para la identificación de la familia Enterobacteriaceae y de bacterias no fermentadoras.

Conservación y almacenamiento de pruebas bioquímicas: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de pruebas bioquímicas: El control de la calidad de los medios en tubo deben presentar una etiqueta que indique en forma clara el contenido, fechas de preparación y vencimiento, cada lote debe ser sometido a incubación, y realizar el control en forma visual, observan la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano en 48 horas, en caso contrario guardar el lote de medios preparados de 2 a 8ºC.

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer el envase del polvo para la preparación de Medio Citrato de Simmons, según la cual se debe suspender 24.3 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**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del medio, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.

3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**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 colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Colocar los medios en una gradilla. Roturar con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Método de inoculación en el medio.**	Sembrar: punción y estría en pico de flauta con un pequeña colonia de crecimiento del microorganismo.
9	**Incubación del medio**	Colocar en incubación de 35 a 37ºC por 24 horas.
10	**Lectura de resultados**	La producción de un color azul en el medio indica la presencia de productos alcalinos y es un resultado positivo; y en caso de no haber viraje de color es negativo.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

Corrección de ortografía por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Editorial medica panamericana. 6ta edición. Argentina 2008. Pag 64, 217
- Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria del Instituto Catalán de la Salud. Volumen II.1era edición. Marzo 2006. Pags 189-190
- Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial medica panamericana. 3era edición. Madrid 2003
- Tortora B. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9na edición. Madrid 2007. Pag 139
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO TRIPLE AZUCAR HIERRO: TSI**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Triple azúcar hierro (TSI), como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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.

Prueba bioquímica: consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. La identificación bioquímica se fundamenta demás en las características metabólicas

específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

Agar triple azúcar Hierro (TSI): TSI se usa para determinar si un bacilo gramnegativo utiliza la glucosa y lactosa o la sacarosa de manera fermentativa y forma sulfuro de hidrogeno (H_2S). El TSI contiene 10 partes de lactosa, 10 partes de sacarosa, 1 parte de glucosa y peptona. El rojo fenol y el sulfato ferroso funcionan como indicadores de acidificación y formación de H_2S, respectivamente. La formación de CO_2 e H_2 (hidrogeno gaseoso) es indicada por la presencia de burbujas o grietas en el agar o por la separación del agar de los lados o el fondo del tubo. La producción de H_2S requiere un medio ácido y se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.

Conservación y almacenamiento de pruebas bioquímicas: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de pruebas bioquímicas: El control de la calidad de los medios en tubo deben presentar una etiqueta que indique en forma clara el contenido, fechas de preparación y vencimiento, cada lote debe ser sometido a incubación, y realizar el control en forma visual, observan la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano en 48 horas, en caso contrario guardar el lote de medios preparados de 2 a 8ºC.

5. **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.
6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Triple azúcar hierro TSI. (Casa Comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de preparación deben haber 6.5 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 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 utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
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 una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Método de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Se siembra en TSI primero por punción a través del centro del medio hasta el fondo del tubo y después por formación de estrías en la superficie del agar inclinado.
9	**Incubación del medio**	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35 ºC en aerobiosis por un tiempo de 18 a 24 horas.

10	**Lectura de resultados**	Agar inclinado alcalino/sin cambio de color en el fondo (K/NC) = no utilizador de la glucosa, lactosa y la sacarosa; esto puede registrarse como K/K (agar inclinado alcalino/fondo alcalino). Agar inclinado alcalino/fondo ácido (K/A)= fermentación de la glucosa solamente. Agar inclinado ácido/fondo acido (A/A)= fermentador de la glucosa, la sacarosa o la lactosa. La formación de CO_2 e H_2 es indicada por la presencia de burbujas o grietas en el agar. La producción de H_2S se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Corrección de ortografía por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

7. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones,

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO SULFURO INDOL MOVILIDAD (SIM).**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Sulfuro Indol Movilidad (SIM), como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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.

Prueba bioquímica: consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. La identificación bioquímica se fundamenta demás en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

Prueba de Sulfuro Indol Movilidad (SIM): Determinar si un organismo es móvil o inmóvil, si es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro y por último la capacidad de desdoblar el indol de la molécula triptófano, además que la consistencia del medio permite la observación de la movilidad de algunas bacterias.

Conservación y almacenamiento de pruebas bioquímicas: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de pruebas bioquímicas: El control de la calidad de los medios en tubo deben presentar una etiqueta que indique en forma clara el contenido, fechas de preparación

y vencimiento, cada lote debe ser sometido a incubación, y realizar el control en forma visual, observan la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano en 48 horas, en caso contrario guardar el lote de medios preparados de 2 a 8ºC.

5. **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.
6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Sulfuro Indol Movilidad SIM (Casa Comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de preparación deben haber 36.23 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 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 utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml de medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya solidos se cierran adecuadamente, previo a este

		procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
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 una incubadora bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Procedimiento de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Luego se realiza una picadura en el medio en forma vertical.
9	**Incubación del medio.**	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35-37 ºC en aerobiosis por un tiempo de 24 a 48 horas.
10	**Lectura de resultados.**	**Ácido sulfhídrico** Positivo: ennegrecimiento del medio Negativo: sin ennegrecimiento. **Indol** (añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs). Positivo: anillo rojo en la superficie del medio. Negativa: no se produce color. **Movilidad** Positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad. Negativa: crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea se siembra.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Corrección de ortografía por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias (http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf) consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FENILALANINA DESAMINASA.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de fenilalanina desaminasa**,** como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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.

Prueba bioquímica: consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes. La identificación bioquímica se fundamenta demás en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

Agar fenilalanina: Medio que contiene fenilalanina, empleado para determinar la presencia de la enzima fenilalanina desaminasa en las bacterias. El ácido fenilpirúvico resultante se detecta mediante la adición de cloruro férrico con el cual se forma un quelato de color verdoso entre el ácido fenil pirúvico y los iones Fe^{3+}. Además el medio de cultivo, el extracto de levadura aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

Conservación y almacenamiento de pruebas bioquímicas: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

Control de calidad de pruebas bioquímicas: El control de la calidad de los medios en tubo deben presentar una etiqueta que indique en forma clara el contenido, fechas de preparación

y vencimiento, cada lote debe ser sometido a incubación, y realizar el control en forma visual, observan la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano en 48 horas, en caso contrario guardar el lote de medios preparados de 2 a 8ºC.

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo para la preparación de Agar, según la cual se debe suspender 23 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 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 utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5		Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los

	Distribución del medio de cultivo.	tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad**	Realizar el control de calidad retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Procedimiento de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Sembrar con asa por agotamiento, estriando la superficie del medio.
9	**Incubación del medio**	Se deja la tapa floja y se Incuba de 18 a 24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.
10	**Lectura de resultados**	El análisis de los resultados debe realizarse dentro de los primeros 5 minutos. **Positivo:** desarrollo de color verde pálido a intenso en el pico de flauta y en el líquido de condensación. **Negativo:** sin cambios de color. El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Corrección de ortografía por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Agar de Fenilalanina "http://www.mcd.com.mx/pdfs/agar_fenilalanina.pdf" 27 de Noviembre del 2011.
- Koneman, E. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ta ed. Editorial Médica Panamerica. Argentina 2008. Págs. 1401-1402.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1 TITULO: PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA PRUEBA DE LA CATALASA.

2 OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la realización de la catalasa, como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3 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.

4 DEFINICIONES:

Prueba de la catalasa: La enzima catalasa permite la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidróxido, su presencia se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano.

5 METODOLOGÍA: La prueba de la catalasa se realiza en placa con una gota de peróxido de hidrogeno más la colonia a analizar.

6 DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Preparación del material.**	Se debe tener listo un porta objetos, lápiz graso, un hisopo, agua oxigenada y la colonia en la se va a ser el estudio.
2	**Suspensión de la cepa.**	Colocar una gota o 50µl de agua oxigenada en el porta objetos luego con la punta de un hisopo coger de una a dos colonias y mezclar.
3	**Interpretación del resultado.**	Catalasa positiva: producción rápida de burbujas (efervescencia) cuando el desarrollo bacteriano se mezcla con una solución de peróxido de hidrógeno. Catalasa negativa: no se observa la producción de burbujas cuando se mezcla la bacteria con el peróxido de hidrógeno. Nota: Dado que la prueba de catalasa es clave para el esquema de identificación de muchos microorganismos grampositivos, la Interpretación debe hacerse con cuidado. Por ejemplo, los *estafilococos* son positivos para catalasa, mientras que los *estreptococos* y los *enterococos* son negativos.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Corrección de ortografía por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

7 BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott. Diagnostico Microbiológico. Onceava Edición. Editorial Médica Panamericana. Año 2004 Buenos Aires. Pag.157-160
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1 TITULO: PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA PRUEBA DE LA COAGULASA.

2 OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la realización de la prueba de la coagulasa, como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3 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.

4 DEFINICIONES:

Prueba de la coagulasa: La coagulasa libre o no fijada parece formar un complejo con la protrombina para dar un producto parecido a la trombina. Esta forma de coagulasa sirve de base para la prueba de coagulasa en tubo. Permite diferenciar Staphylococus aureus, que es coagulasa positivo, del resto de especies de Staphylococus que son coagulasa negativa.

5 METODOLOGÍA: prueba en tubo donde se coloca plasma y colonias de la bacteria en estudio para diferenciar el tipo de bacteria que se está estudiando.

6 DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Preparación del material.**	Tubo de ensayo, lápiz graso, plasma, asa, incubadora y cepa en estudio.
2	**Suspensión de la cepa.**	Colocar 0.5ml de plasma en el tubo de ensayo luego con el asa coger de dos a tres colonias y suspender en el tubo, dejar reposar en la incubadora a 37ºC por 24 horas, en la mayoría de los casos si la bacteria es coagulasa positiva después de una incubación de 4 horas ya se observa el coagulo.
3	**Interpretación del resultado.**	Coagulasa positiva: formación del coagulo. Coagulasa negativa: no se observa la formación del coagulo.

Elaborado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8 BIBLIOGRAFÍA:

- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual Práctico de Microbiología. Exposición Barcelona-España. 3ra Edición. Editorial MASSON S.A. Año 2005.Pág 195-208.

- John Bernard Henry. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Parte VI Microbiología Médica. 9ªEdición. Editorial Masson-Salvat Medicina. Pág.1070.

1. TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN MICÓTICA: KOH

2. OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la realización de la prueba de identificación de levaduras: KOH

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. 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.

4. DEFINICIONES:

Diagnóstico microscópico directo: medio más simple y rápido de detectar una infección fúngica. Este método proporciona un diagnóstico definitivo si se observa elementos fúngicos comunes tales como: esporas, levaduras, hifas, micelios, conidios, artrosporas, blastosporas, clamidosporas, etc.

KOH: Examen directo que permite observar la morfología celular de los elementos micóticos y su pigmento. Se suelen utilizar en dos concentraciones, una más fuerte del 20-30% para uñas o muestras muy queratinizadas, y al 10% para el resto de muestras.

El KOH disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al

calentar a la llama ligeramente la preparación. Adicionalmente, se puede emplear colorante para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización.

5. METODOLOGÍA: El procedimiento para realizar la prueba de identificación de hongos KOH se realiza tomando en cuenta la preparación en fresco, enfoque microscópico y visualización.

6. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Procedimiento**	En una placa portaobjetos colocar una gota de KOH a la concentración requerida (10-20%), con un asa previamente flameada tomar una colonia y suspender en la gota de KOH, colocar un cubreobjetos, llevar al microscopio.
2	**Enfoque**	Enfocar y observar con lente de 10x a fin de observar los elementos micóticos, para diferenciar con un aumento de 40x.
3	**Observación microscópica**	*Cándida albicans:* células ovales levaduriformes de 1 a 4 um, con paredes finas. Seudohifas que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. A veces se puede observar hifas con múltiples septos y pueden surgir blastosporas (levaduras) en forma ovoide gemantes a hifas.

Elaborado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- MSP. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos y Técnicas de laboratorio para la Identificación de los principales Hongos oportunistas causantes De micosis humanas. PERU 2007 Pág. 28
- Bailey & Scott. Diagnostico microbiológico. Editorial medica panamericana. 11ª edición. Madrid 2007 Pág. 821

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN DE GRAM.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la realización de la tinción de Gram.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

Frotis: Preparación para examen microscópico, generalmente cultivos bacterianos, en la que estas sustancias se disponen sobre un portaobjeto con ayuda de otro, de manera que forman una capa muy fina.

Tinción: Acción y efecto de teñir con Colorantes o Soluciones.

Fijación: Acción y efecto de fijar**,** pasando el portaobjetos tres veces a través de la llama del mechero de Bunsen.

Solución Colorante: Es de naturaleza básica, el compuesto de este tipo más utilizado es el cristal violeta que tiñe bacterias Gram positivas y negativas.

Solución Mordiente: Se combina con el primer colorante y forma un complejo que es insoluble, el mordiente empleado es la solución de Yodo.

Agente Decolorante: Es un disolvente orgánico alcohol cetona. Mientras que este tratamiento decolora a las bacterias Gram negativas.

Colorante de Contraste: Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante. El colorante de contraste más utilizado es la safranina, este colorante teñirá solo a las bacterias Gram negativas.

5. **METODOLOGÍA:** La tinción de Gram se realiza mediante la extensión sobre un portaobjetos de una colonia bacteriana con una gota de agua estéril, se deja secar, fijar y se tiñe con varios colorantes.
6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Preparación del frotis.**	Colocar una gota de agua estéril sobre una porta objetos, con una asa estéril suspender una colonia bacteriana. Dejar secar al ambiente. Fijar el frotis pasando por el mechero de Bunsen. Dejarlo enfriar antes de aplicar la tinción.
2	**Tinción de Gram.**	La tinción de Gram requiere la utilización de cuatro soluciones en el siguiente orden:
	2.1. Primer colorante.	Cubrir el frotis con cristal violeta dejando que el colorante actué por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar escurrir.
	2.2. solución mordiente	Cubrir el frotis con solución de lugol dejando que el colorante actué por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
	2.3. Agente decolorante	Cubrir el frotis con alcohol cetona por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
	2.4. Colorante de contraste	Cubrir el frotis con solución de Safranina dejando que el colorante actué por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar secar la preparación al aire libre.

Elaborado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8. **BIBLIOGRAFÍA:**

- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 9 – 10.
- OPS. Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. Capítulo VII p: 321-322.

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL TEST DE FILAMENTACIÓN.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la realización del test de filamentación.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

Tubo germinal: También llamado test de filamentación se define con un apéndice que tiene la mitad de ancho y 3 a 4 veces la longitud de la célula levaduriforme a partir de la que se origina.

Suero: Parte de la sangre que permanece líquida después de haberse producido la coagulación.

Suspensión: Acción y efecto de suspender o disolver.

5. **METODOLOGÍA:** El test de filamentación es el método más utilizado, el que se realiza mediante la suspensión de un inóculo en suero para la identificación de *Candida albicans.*
6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Suspensión del inóculo.**	Colocar un inoculo muy pequeño de una colonia aislada en 0,5 ml de suero.
2	**Incubación**	Incubar de 35 a 37ºC durante no más de 3 horas.

3	**Observación microscópica**	Después de la incubación se extrae una gota de la suspensión y colocarla sobre un porta y cubre objetos. Observar al microscopio con el lente de 40x.

Elaborado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott: Diagnostico microbiológico. 12ªEd. Editorial medica panamericana. Buenos Aires 2009: p. 825.
- Koneman. Diagnostico microbiológico. 6ªEd. Editorial Médica Panamericana. 2008: p. 1165.

1 TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL PATRÓN N.- 5 DE MAC FARLAND.

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

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3 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.

4 DEFINICIONES:

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.

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

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 especiales. El estándar 0.5 de Mac Farland, proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de 1.5 x 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

5 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.

6 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 un tubo de ensayo de 10ml totalmente estéril, rotularlo.</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla N.- 1.</td><td>Añadir una solución al 1% de Cloruro de Bario Anhídrido y una solución al 1% (en volumen) de Ácido Sulfúrico químicamente puro, según el siguiente tabla:

Tabla N.- 1
<table>
<tr><th>Tubo N.</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 N. 5 de Mc Farland por espectrofotometría.</td><td>Encender el espectrofotómetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar la suspensión en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.080 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 refrigeración.
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>

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Corrección de ortografía por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual Práctico de Microbiología. Exposición Barcelona-España. 3ra Edición. Editorial MASSON S.A. Año 2005.Pág.45-121-122-123.

- Bailey & Scott. Diagnostico Microbiológico. Onceava Edición. Editorial Médica Panamericana. Año 2004 Buenos Aires. Pag.238-240.

1 TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

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

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3 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.

4 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.
- Verificar que la solución salina no esté contaminada, debe estar totalmente esteral.
- Para comprobar la calidad de la solución estéril, autoclavar en tubos adecuados una cantidad de 5 a 6 ml por un lapso de 20 minutos a 121 º C.

5 METODOLOGÍA: El inóculo se prepara por suspensión de las cepas en solución salina, equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mac-Farland (10^8 UFC/ml).

6 DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Preparación del material.**	Se utilizará una cepa joven (Protocolo falta pilas), disponer de 1 tubo de ensayo, un aplicador y una cubeta para espectrofotómetro, solución salina. Todo el material a utilizar debe encontrarse estéril.
		Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina, o tener autoclavado la solución estéril para evitar contaminaciones.

2	**Suspensión de la cepa en la solución salina.**	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 de un espectrofotómetro.**	Es conveniente el uso de un instrumento como el espectrofotómetro para realizar el control de calidad. Encender espectrofotómetro 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.

Elaborado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual Práctico de Microbiología. Exposición Barcelona-España. 3ra Edición. Editorial MASSON S.A. Año 2005.Pág.45-121-122-123.
- Bailey & Scott. Diagnostico Microbiológico. Onceava Edición. Editorial Médica Panamericana. Año 2004 Buenos Aires. Pag.238-240.

1. **TITULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Staphylococcus aureus*.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la Viabilización y conservación de *Staphylococcus aureus*.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; 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, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

Fase Exponencial: La velocidad de crecimiento es máxima. La velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo, depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc.

Microorganismos Liofilizadas: Es uno de los métodos más efectivos para la conservación, pues los microorganismos pueden mantener su viabilidad por años. Una de las principales ventajas de este método es que, una vez liofilizado, el cultivo no necesita tratamientos especiales, solo se debe mantener en refrigeración.

Caracterización De Bacterias*:* Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la visualización macroscópicas (colonias), microscópicas (morfología), y a través, de la realización de pruebas bioquímicas, las mismas que determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

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, y desarrollando sus funciones de una manera normal.

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***S. aureus***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Chapman manitol, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Chapman manitol inoculado, a 37ºC 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 específico para ***Staphylococcus aureus***. Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, 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 macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *S. aureus.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, bordes enteros, prominentes, y brillantes. Sus colonias son de color amarillo dorado intenso por la fermentación del manitol, inclusive el medio se torna a amarillo. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** cocos Gram positivos, dispuestos en pares, tétradas o racimos, con morfología celular redonda. **Pruebas bioquímicas:** **Catalasa:** Positivo **Coagulasa:** Positivo

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
- Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
- Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
- Benintende, S.,"Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.
- Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
- Murray, P.R. Microbiología médica. 6ta Ed. Editorial Elsevier Mosby. España 2009. Pág. 220
- Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 219-220.
- Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".
- Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

1. **TITULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Escherichia coli*.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de ***Escherichia coli***.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; 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, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

Fase Exponencial*:* la velocidad de crecimiento es máxima. La velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo, depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc.

Microorganismos Liofilizadas*:* Es uno de los métodos más efectivos para la conservación, pues los microorganismos pueden mantener su viabilidad por años. Una de las principales ventajas de este método es que, una vez liofilizado, el cultivo no necesita tratamientos especiales, solo se debe mantener en refrigeración.

Caracterización de Bacterias: Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la visualización macroscópicas (colonias), microscópicas (morfología), y a través, de la realización de pruebas bioquímicas, las mismas que determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

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, y desarrollando sus funciones de una manera normal.

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Escherichia coli* ATCC 25922**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Escherichia coli* ATCC 25922 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***E. coli***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Mac Conkey, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Escherichia 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, específico para ***Escherichia coli***. Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, 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 macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *E. coli.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, convexas, bordes enteros, crecimiento regular. Sus colonias son de color rosado o rojas con halo turbio, debido a la fermentación de lactosa en el Agar MacConkey. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** bacilos cortos Gram negativos. **Pruebas bioquímicas:** **TSI:** A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **SIM:** Movilidad (+), Indol (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **Citrato:** Negativo **Lisina:** Positivo **Fenilalanina:** Negativo **Urea:** Negativo

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. Benintende, S.,"Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.
5. Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
6. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Perez "Identificaión Bioquímica de Bacterias más frecuentes".
8. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

1. **TITULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae*.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de ***Klebsiella pneumoniae***.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; 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, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

Fase Exponencial*:* la velocidad de crecimiento es máxima. La velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo, depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc.

Microorganismos Liofilizadas*:* Es uno de los métodos más efectivos para la conservación, pues los microorganismos pueden mantener su viabilidad por años. Una de las principales ventajas de este método es que, una vez liofilizado, el cultivo no necesita tratamientos especiales, solo se debe mantener en refrigeración.

Caracterización de Bacterias*:* Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la visualización macroscópicas (colonias), microscópicas (morfología), y a través, de la realización de pruebas bioquímicas, las mismas que determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

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, y desarrollando sus funciones de una manera normal.

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Klebsiella pneumoniae*** **ATCC 13883**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***K. pneumoniae***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Mac Conkey, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37ºC 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, específico para ***Klebsiella pneumoniae*** Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, 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 macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *K. pneumoniae.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, muy mucoides, bordes enteros, crecimiento regular. Se observa la fermentación de lactosa en el Agar MacConkey donde las colonias son de color rosado. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** bacilos largos Gram negativos. **Pruebas bioquímicas:**

		TSI: A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **SIM:** Movilidad (-), Indol (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **Citrato:** Positivo **Lisina:** Positivo **Urea:** Positivo **Catalasa:** Positivo

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. Benintende, S., "Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.
5. Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
6. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".
8. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

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

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

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **DEFINICIONES:**

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; 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, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

Fase Exponencial*:* la velocidad de crecimiento es máxima. La velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo, depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc.

Microorganismos Liofilizadas*:* Es uno de los métodos más efectivos para la conservación, pues los microorganismos pueden mantener su viabilidad por años. Una de las principales ventajas de este método es que, una vez liofilizado, el cultivo no necesita tratamientos especiales, solo se debe mantener en refrigeración.

Caracterización de Bacterias*:* Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la visualización macroscópicas (colonias), microscópicas (morfología), y a través, de la realización de pruebas bioquímicas, las mismas que determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

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, y desarrollando sus funciones de una manera normal.

5. **METODOLOGÍA:** la conservación se la realiza mediante transferencia periódica de la ***Pseudomona aeruginosa*** **ATCC 27653,** con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial).

6. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Pseudomona aeruginosa*** **ATCC 27653**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27653 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***P. aeruginosa***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Cetrimide, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Cetrimide inoculado, a 37º - 42º C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27653**	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, específico para ***Pseudomona aeruginosa***. Incubar a 37ºC – 42ºC durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, 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 macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *P. aeruginosa.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Grandes, redondas, bordes irregulares, mucoides, produce un olor dulzón semejante al jugo de uva o de maíz, de color verde fluorescente. *P. aeruginosa* también produce el pigmento fluorescente pio verdina que confiere el color verdoso al medio. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** bacilos delgados cortos Gram negativos dispuestos en pares y en cadenas. **Pruebas bioquímicas:**

		TSI: K/A fermentador de glucosa ; Producción de Gas (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **SIM:** Movilidad (+), Indol (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **Citrato:** Positivo **Urea:** Negativo **Catalasa:** Positivo **Oxidasa**: Positivo **Fenilalanina:** Negativo

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. Benintende, S.,"Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.
5. Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
6. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 257-258.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".
8. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 4.

1. TITULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Cándida albicans*.

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

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. 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.

4. DEFINICIONES:

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; 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, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

Microorganismos Liofilizadas*:* Es uno de los métodos más efectivos para la conservación, pues los microorganismos pueden mantener su viabilidad por años. Una de las principales ventajas de este método es que, una vez liofilizado, el cultivo no necesita tratamientos especiales, solo se debe mantener en refrigeración.

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, y desarrollando sus funciones de una manera normal.

5. METODOLOGÍA: la conservación se la realiza mediante transferencia periódica de la ***Cándida albicans* ATCC 26790,** con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial).

6. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Cándida albicans* ATCC 26790**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentra de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC).
2	**Recuperación de *Cándida albicans* ATCC 26790** **Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***C. albicans***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Sabouraud, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Sabouraud inoculado, a 37º - 42º C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar

		colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Cándida 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 Agar Sabouraud, específico para ***Cándida albicans***. Incubar a 37ºC – 42ºC durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo .
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Cándida albicans*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y pruebas específicas de las mismas. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *C. albicans.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, bordes enteros, aspecto cremoso, mucoides, y de color blanco. **Características Microscópicas (morfología):** **Hidróxido de potasio (KOH):** esporas y levaduras aisladas y en gemación. **Otras pruebas:** **Test de filamentación:** Presencia de tubo germinal a las 2 horas.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. Benintende, S.,"Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.
5. Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
6. Tortora B. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9na edición. Madrid 2007. Págs. 346-347.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Perez "Identificaión Bioquímica de Bacterias más frecuentes".
8. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

1. **TITULO: PREPARACION DE DISCOS DE SENSIBILIDAD.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la elaboración de los discos de sensibilidad.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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 hidroxilos (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. .

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de los discos.**	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN Nº 3 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, después de la impregnación con el extracto volver a esterilizar por el lapso de 2 horas.
3	**Impregnación del extracto. Vegetal.**	Utilizar la caja petric, y colocar una malla metálica estéril en esta, a su vez colocar los discos estériles, impregnarlos con 10 ul, luego esperar unos minutos 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 3 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%, esperamos unos minutos 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.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.

Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Concepto de Dilución [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.pcb.ub.edu/centredepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo_patentesextractosplantas.pdf
- Significado de etanol, [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.t3quimica.com/pdfs/49i_etanol.pdf
- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf
- Todd-Sanford. DiagnósticoClínico por el laboratorio. 8ª ed. Salvat; 2001. P. 487.

1. TITULO: 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 de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico 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.

Hexano: El Hexano un es un hidrocarburo alifático líquido incoloro, fácilmente inflamable y con un olor característico a disolvente. Su forma química es C_6H_{14}.

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 3 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, después de la impregnación con el extracto volver a esterilizar por el lapso de 2 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 esperar unos minutos 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 3 de 6 mm de diámetro en una caja petri que va a contener la malla metálica estéril e impregnarlo con 10 ul de hexano, esperamos unos minutos y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de hexano.
5	**Controles positivos.**	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Concepto de Dilución [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.pcb.ub.edu/centredepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo_patentesextractosplantas.pdf
- Significado de etanol, [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.t3quimica.com/pdfs/49i_etanol.pdf
- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf
- Todd-Sanford. DiagnósticoClínico por el laboratorio. 8ª ed. Salvat; 2001. P. 487.

1. **TITULO: 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 de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico 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.

Agua: Es aquella cuya composición se basa en la unidad de moléculas de H2O. Es aquella a la que se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación.

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 3 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, después de la impregnación con el extracto volver a esterilizar por el lapso de 2 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 esperar unos minutos 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 3 de 6 mm de diámetro en una caja petri que va a contener la malla metálica estéril e impregnarlo con 10 ul de Agua destilada, esperamos unos minutos y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de Agua destilada.
5	**Controles positivos.**	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.
Actualizado por: Farfán Betsy, Carpio Roberto, Castillo Jhon y Rey Diego. Año 2013.

8. **BIBLIOGRAFÍA:**

- Concepto de Dilución [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.pcb.ub.edu/centredepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo_patentesextractosplantas.pdf
- Significado de etanol, [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.t3quimica.com/pdfs/49i_etanol.pdf

- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf
- Todd-Sanford. DiagnósticoClínico por el laboratorio. 8ª ed. Salvat; 2001. P. 487.

1. **TITULO: 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.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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.

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Inoculación de las placas.**	- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), 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 inoculo (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 (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 (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 resultados**	- ‹ 6mm Negativo (Resistente) - 6 – 9 mm‹ Intermedio - › 9mm Positivo (Sensible).

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott: Diagnostico microbiológico. 12ªEd. Editorial medica panamericana. Buenos Aires 2009: p. 187
- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf

- Koneman. Diagnostico microbiológico. 6ªEd. Editorial Médica Panamericana. 2008: p. 966.
- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 122-124.
- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 425-436.

1. **TITULO: 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.

ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

3. **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.

4. **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.

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

6. **DESARROLLO**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Inoculación de las placas.**	- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), 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 inoculo (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 (protocolo Nº 8), 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 (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 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).

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.

Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott: Diagnostico microbiológico. 12ªEd. Editorial medica panamericana. Buenos Aires 2009: p. 187
- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf
- Koneman. Diagnostico microbiológico. 6ªEd. Editorial Médica Panamericana. 2008: p. 966.
- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 122-124.
- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 425-436.

1. TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN LA EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.

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

3. ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico 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 el cultivo de un microorganismo o producida semi sintéticamente 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 microorganismos 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: Se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada.

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 MacFarland.
2	**Preparación de subdiluciones.**	Se colocan 8 tubos con 3 ml de caldo tripticasa soja, en el primer tubo se adiciona 1 ml del extracto que presente la 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 el tubo 8 se adiciona 1 ml de etanol al 70% que nos servirá como blanco
3	**Preparación de las muestras.**	En la diluciones anteriores se colocan en los 8 tubos 1ml del inoculo.
4	**Incubación.**	Se incuba 24 horas a 37ºC.
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.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 411-412.
- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 121.
- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 49 – 53.

1. TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA EN LA EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.

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

3. ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico 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 el 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 microorganismos 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: Es la menor concentración de antimicrobiano capaz de eliminar una cepa bacteriana dada.

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 bacteriostasia.

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de resultado 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 Muller 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.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaño. Año 2010.
Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez y Guadalupe Rivera. Año 2011.

8. **BIBLIOGRAFÍA:**

- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 411-412.
- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 121.
- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 49 – 53.

Anexo 5

Certificación de difusión de resultados.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

C E R I T I F I C O

Que el señor **Diego Michael Rey Curay**, con cedula de identidad **190049896-3**, egresado de la carrera de Laboratorio Clínico, cumplió con la socialización de los resultados a los estudiantes de séptimo modulo de la Carrera de Laboratorio Clínico. De su proyecto de tesis titulada: **Evaluación de la Actividad Antibacteriana y Antimicótica de tres extractos de la flor de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar.**

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, autorizando al interesado hacer uso del presente, en lo que estime conveniente.

Licenciada Mg.
Enma Flores Pérez
DOCENTE DEL AREA DE LA SALUD

Anexo 6
Registro de asistencia de la difusión de resultados.

NOMINA DE ESTUDIATES DE SEPTIMO MODULO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO QUE ACUDIERON A LA DIFUNSION DE RESULTADOS

Nombres y Apellidos	Paralelo	Firma
Ingrid Juliana Agreda Cabrera	"B"	
Martha Judith Ambuludi Rabeeza	"B"	
Diluanda del Rocio Pinero Zaraña	"B"	
Dora Eugenia Puchaicela Salinas	"B"	
Walter Ricardo Guamán Guamán	"B"	
María José Díaz Torres	"B"	
Edwin Roberto Calaguay Chamba	"B"	
Tatiana Ojeda Soto	"B"	
Juliana Yavibel Gómez	"B"	
Oswaldo Vicente Chamba Taco	"B"	
Verónica Pauta Ordonez	"B"	
María Dolores Castro Jimenez	"B"	María Castro
Diana Eugenia Guaya Iñiguez	"B"	
Kaila Dennisse Chimbo Uchuari	"B"	
María Belén Cañart Jácome	"B"	
Sandra Mireya Correa Torres	"B"	Sandra Correa
Andrea Nataly Sánchez Alvarez	"B"	Nataly Sánchez
Yessenia Paulina Maza Estrada	"B"	
María Fernanda Pacheco Castro	"B"	Mafer Pacheco Castro
Yassenia Judith Reátegui Luzón	"B"	
Livia Carolina Armijos	"B"	

Anexo 7
Tríptico

Cepas ATCC usadas:

Staphylococcus aureus *(ATCC 25923)*

Escherichia coli *(ATCC 25922)*

Pseudomonas aeruginosa *(ATCC 27853)*

Klebsiella pneumoniae *(ATCC 13883)*

Cándida albicans *(ATCC 26790).*

ESTANDARIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Se validó la técnica mediante un ensayo de actividad antibacteriana con la cepa ATCC de*Staphylococcus aureus, frente* al extracto esencial de clavo de olor, con actividad conocida de acuerdo a estudios realizados.

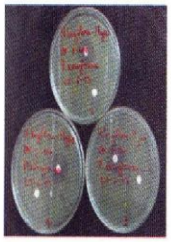
RESULTADOS

Al culminar el presente estudio se determinó que los extractos hexánico, etanólico y acuoso obtenidos de las hojas, raíces, flores y semillas de *H. longiflora no* presento actividad detectable a las concentraciones evaluadas según la metodología descrita. Considerándose que se pueden realizar otros estudios a mayor concentración y utilizando otros métodos.

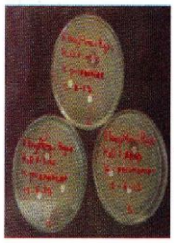
NOTA.- El extracto acuoso de las flores de *H. longiflora* en la dilución 1/100 probado frente a la cepa de *Pseudomona aeruginosa,* en primera instancia presento inhibición por lo que se procedió a su verificación a mayores concentraciones, utilizando la misma metodología, pero el resultado no fue concluyente habiéndose decidido realizar posteriores estudios con otras metodologías.

E. coli

S. aureus



P. aeruginosa



K. pneumoniae

C. albicans

CONCLUCIONES:

- Los extractos etanólico, hexánico, y acuoso de hojas, raíces, flores y semillas de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), no presenta actividad antibacteriana en las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10.000 frente a las Cepas ATCC de *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Klebsiella pneumoniae* (13883), mediante el método de difusión en agar.
- Los extractos etanólico, hexánico, y acuoso de hojas, raíces, flores y semillas de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), no presenta actividad antimicótica en las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10.000 frente a las Cepas ATCC de *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Klebsiella pneumoniae* (13883), mediante el método de difusión en agar.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO
SUBPROCESO DE SALUD INTERCULTURAL
DIRECCIÓN PROVINCIAL DE SALUD DE ZAMORA CHINCHIPE

TEMA:

Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de hojas, raíces, flores y semillas de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de hojas, raíces, flores y semillas de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), por el método de difusión en agar

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la actividad antibacteriana de tres extractos de hojas, raíces, flores y semillas de *H. longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), por el método de difusión en agar.

Anexo 8

Tríptico

- Evaluar la actividad antimicótica de tres extractos de hojas, raíces, flores y semillas de *H. longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente), por el método de difusión en agar.
- Socializar los resultados del estudio a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

METODOLOGÍA

- **Tipo de estudio**

La presente investigación es de tipo descriptivo, experimental.

- **Área de estudio**

La provincia de Zamora Chinchipe

- **Universo**

H. longiflora (L.) G. Don (cholo valiente).

- **Muestra**

Hojas, raíces, flores y semillas de *H. longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente).

- **Criterio de inclusión**

Hojas, raíces, flores y semillas de *H. longiflora* (L.) G. Don, sin signos de deterioro.

PROCESAMIENTO DE PLANTA

La recolección de *H. longiflora* se realizó en la provincia de Zamora Chinchipe, en el cantón paquisha, la parroquia cisan, de acuerdo al protocolo del Laboratorio de Fitoquímica de la UNL.

El material recolectado se lavó con hipoclorito de sodio al 0.5% según el protocolo de lavado de plantas del Laboratorio de Fitoquímica.

1.-La viabilización se realizó con 0.5 ml de infusión cerebro corazón

2.- Se preparó 3 diluciones decimales 1/100, 1/1000 y 1/10.000, usando el mismo solvente utilizado para la extracción.

3.-Los discos se elaboraron con papel filtro Whatman N° 3, usando un sacabocados de 6 mm diámetro a los cuales, se los impregnados veces con 10µ de extracto para una concentración final de 200, 20 y 2 ug por disco.

4.-Preparación de los medios de cultivo específicos de acuerdo a las cepas empleadas en cada etapa del estudio.

El secado de las hojas y raíces se realizó a temperatura ambiente protegiéndola del sol y las flores y semillas, utilizando una estufa a 45º C.

La molienda de las hojas, raíces y flores secas se realizó en un molino de cuchillas con tamiz de 2 mm; y las semillas en un mortero.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se macero la especie vegetal con hexano, etanol y agua, por 24 horas y el extracto fue concentrado en rotavapor, a 20ºC para hexano, 40ºC para etanol y 45ºC para agua. El proceso se repetirá por tres ocasiones.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIMICÓTICA

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos se realizó por el método de difusión en agar con disco, empleando controles positivos y negativos junto a cepas ATCC.

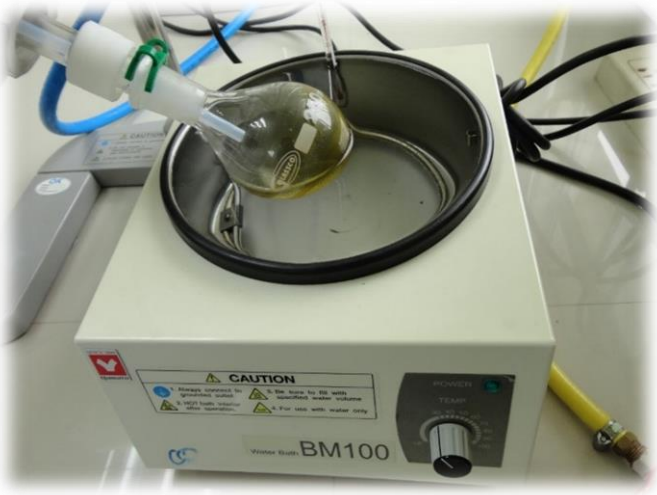
Fotografías

EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS

1.- LIOFILIZADOR

2.- MOLINO DE CUCHILLAS

3.- ROTO VAPOR



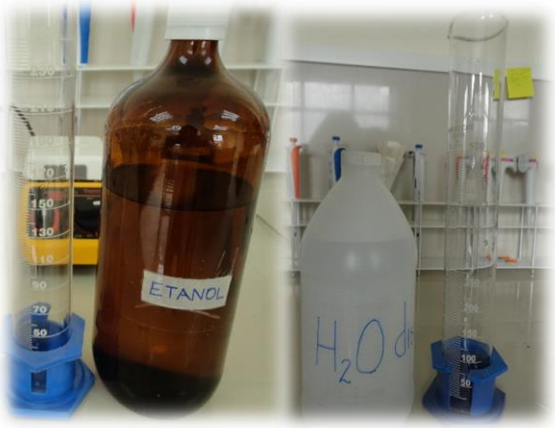
4.- ESPECTROFOTÓMETRO

5.- ESTERILIZADOR

6.- CABINA DE FLUJO LAMINAL

7.- ESTUFA

8.- HEXANO, ETANOL Y AGUA



9.- COLECTA DEL MATERIAL

10.- LAVADO DEL MATERIAL

11.- SECADO DEL MATERIAL

12.- MACERACION

13.- FILTRADO

14.- CONCENTRACIÒN

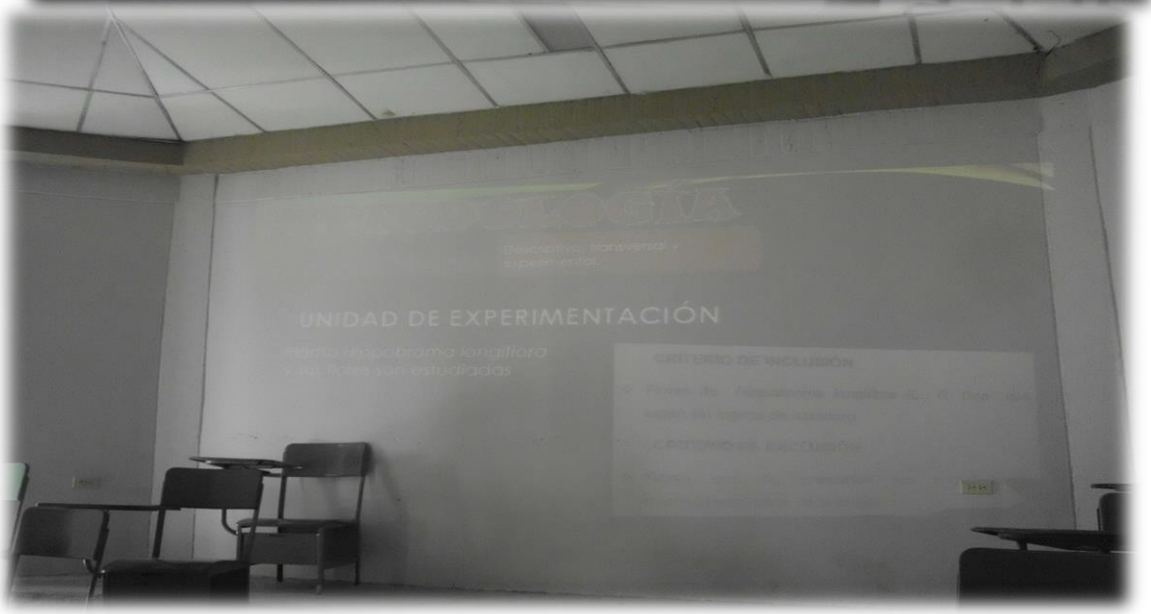
15.- VERTIDO

16.- FRASCOS CON DILUCIONES

17.- SEMBRADO, COLOCACIÓN DE DISCOS 18.- AGARES Y CEPA ATCC

19. PREPARACION DE AGAR

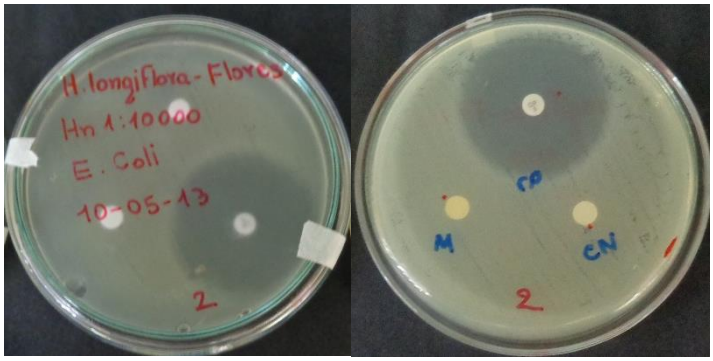
20.- Exposición de los resultados a los alumnos de 7mo


UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN

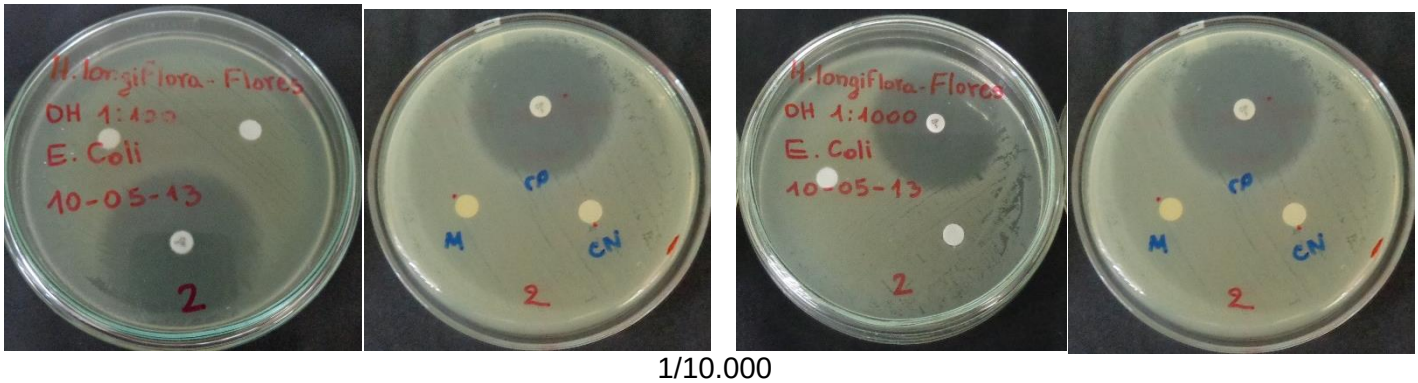
21.- **E. coli.**

Extracto hexanico dilución 1/100, 1/1.000

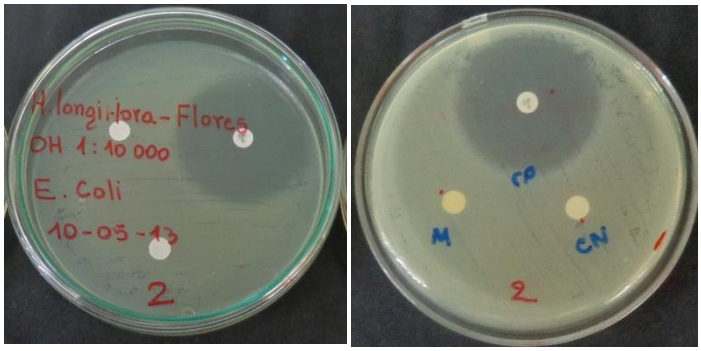
1/10.000



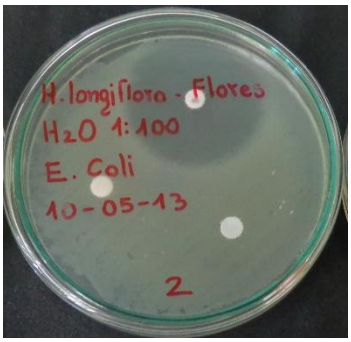
Extracto etanólico dilución 1/100, 1/1.000

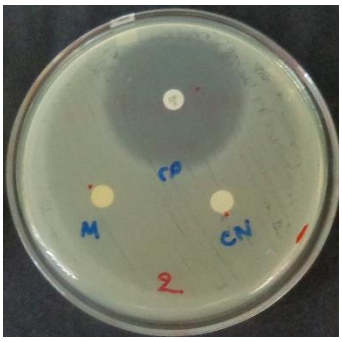


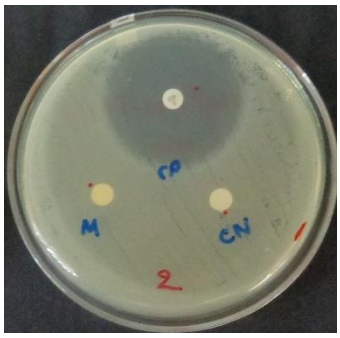
1/10.000



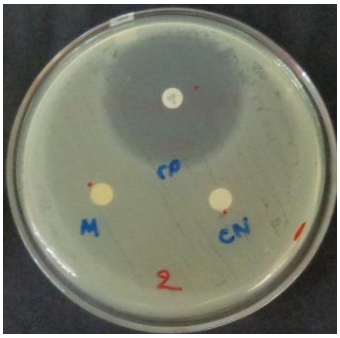
Extracto acuoso dilución 1/100, 1/1.000





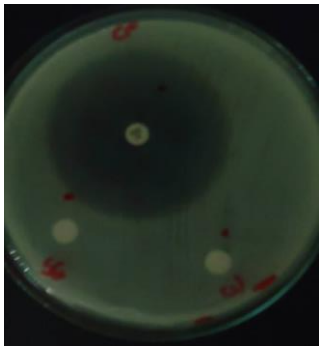


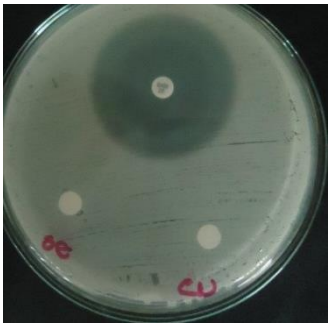
1/10.000



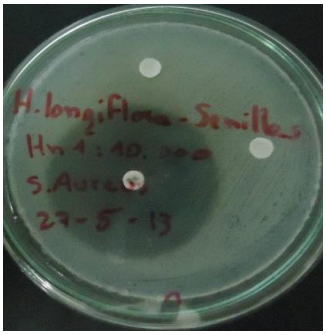
21.- **S. aureus**.

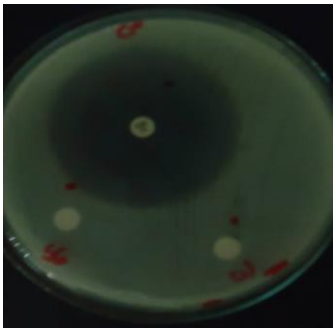
Extracto hexanico dilución 1/100 1/1.000



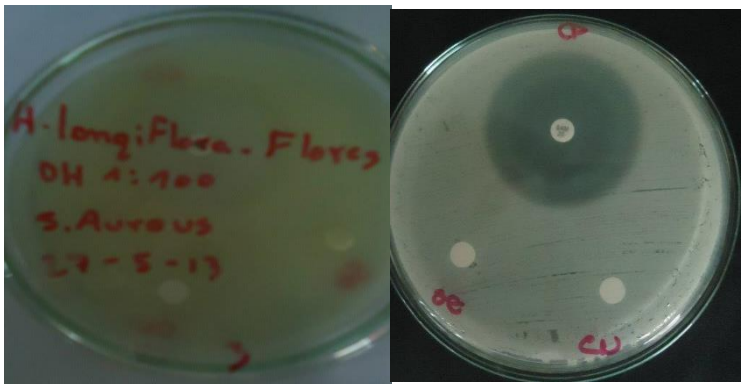


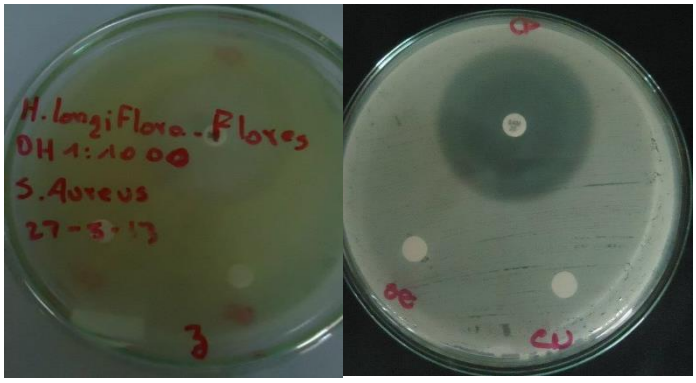
1/10.000



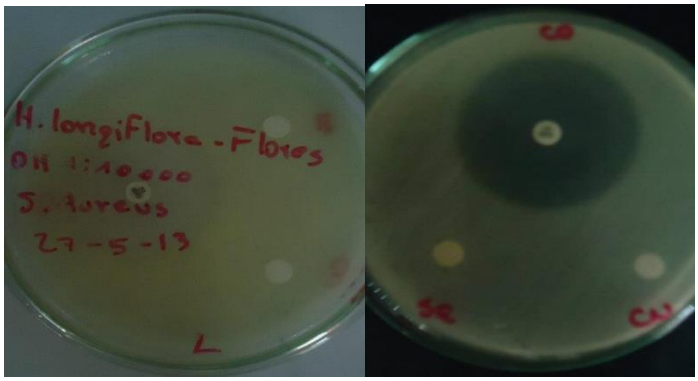


Extracto etanólico dilución 1/100, 1/1.000

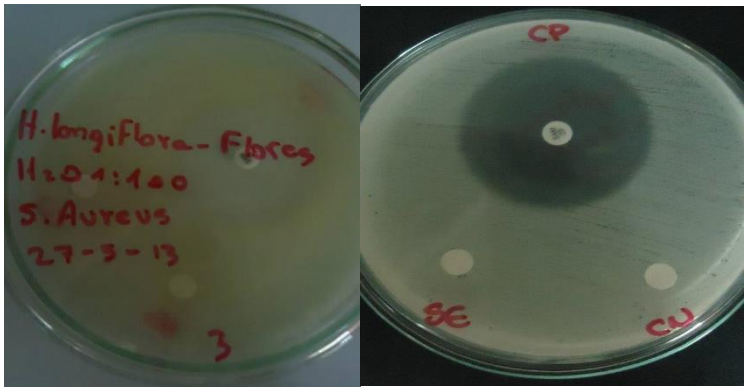


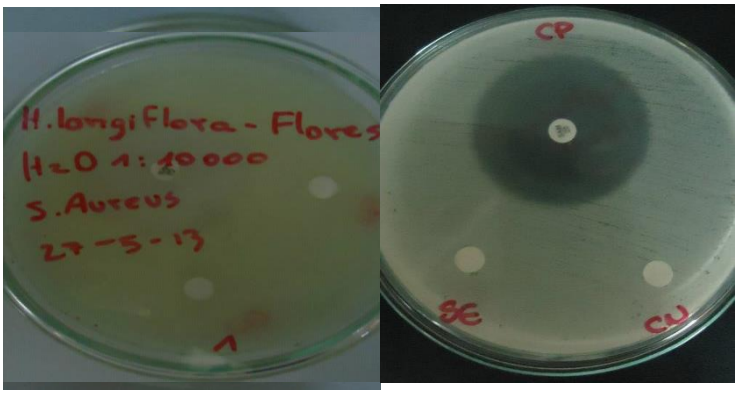


1/10.000

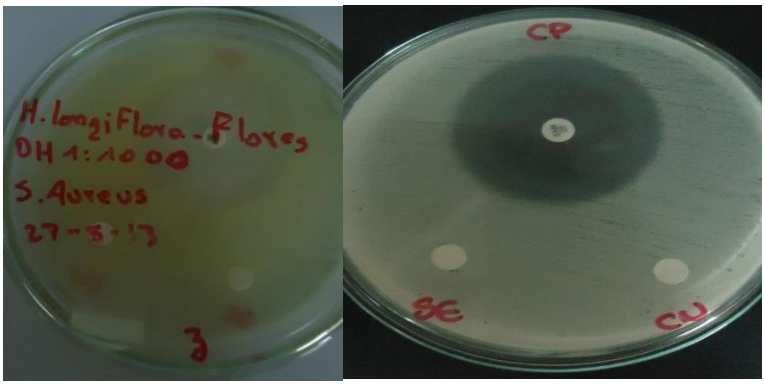


Extracto acuoso dilución 1/100, 1/1.000



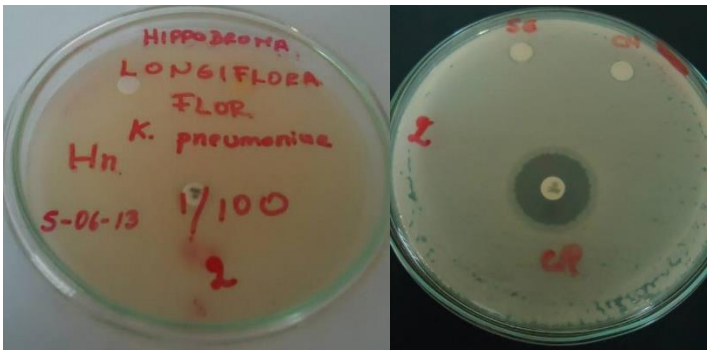


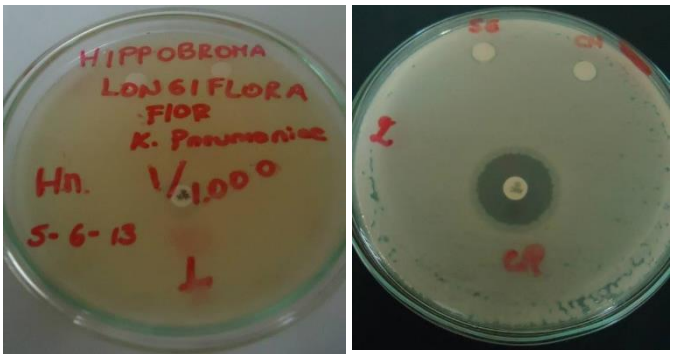
1/10.000



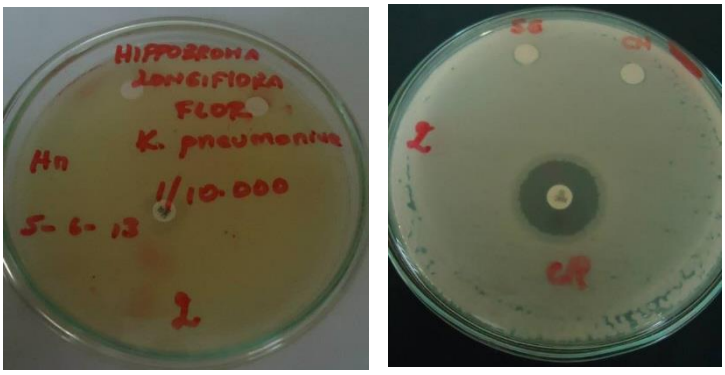
22.- **K. pneumoniae**

Extracto hexanico dilución 1/100, 1/1.000



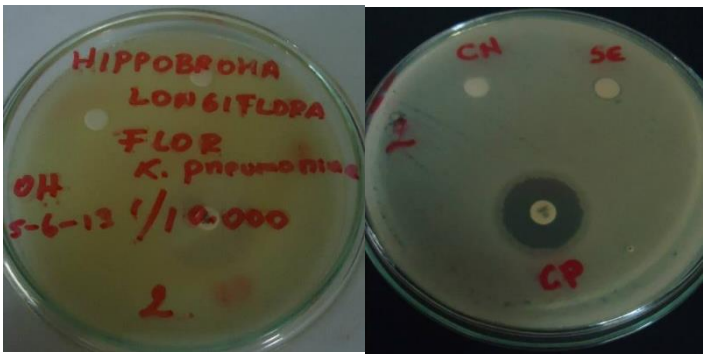


1/10.000



Extracto etanólico dilución 1/100, 1/1.000

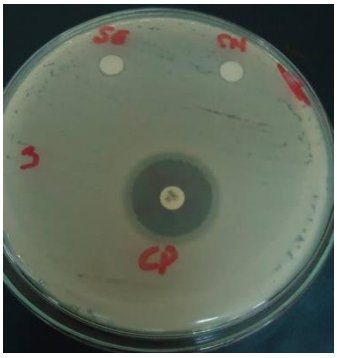
1/10.000



Extracto acuoso dilución 1/100, 1/1.000

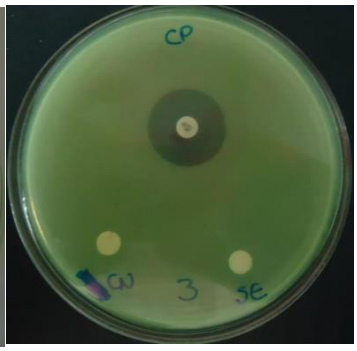
1/10.000

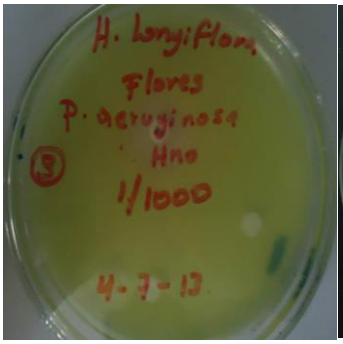
23.- **P.**

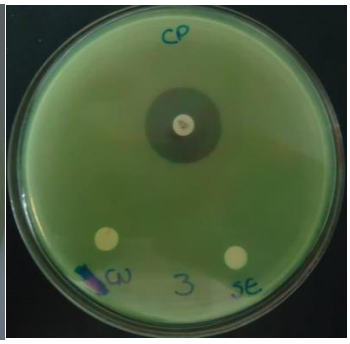


aeruginosa

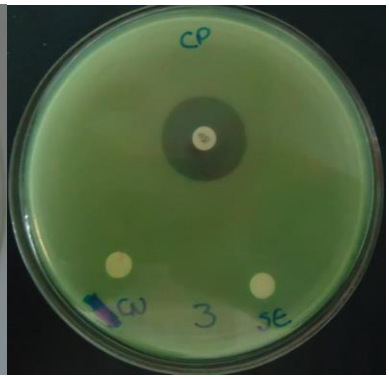
Extracto hexanico dilución 1/100, 1/1.000



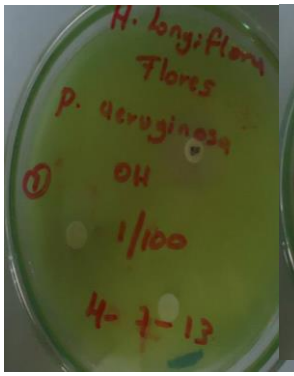


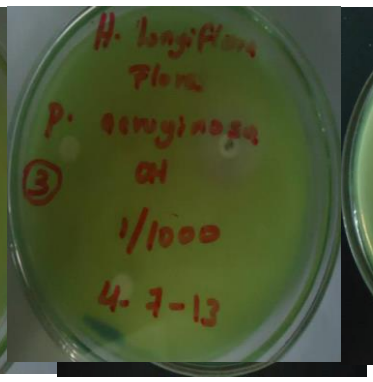


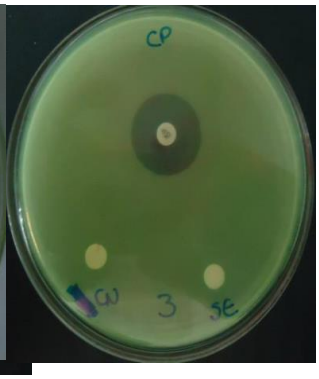
1/10.000



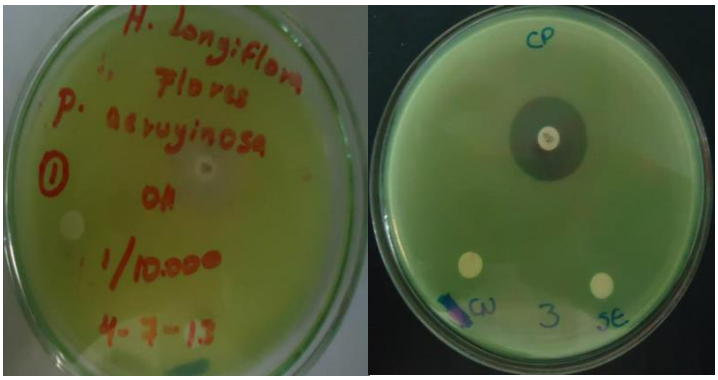
Extracto etanólico dilución 1/100, 1/1.000





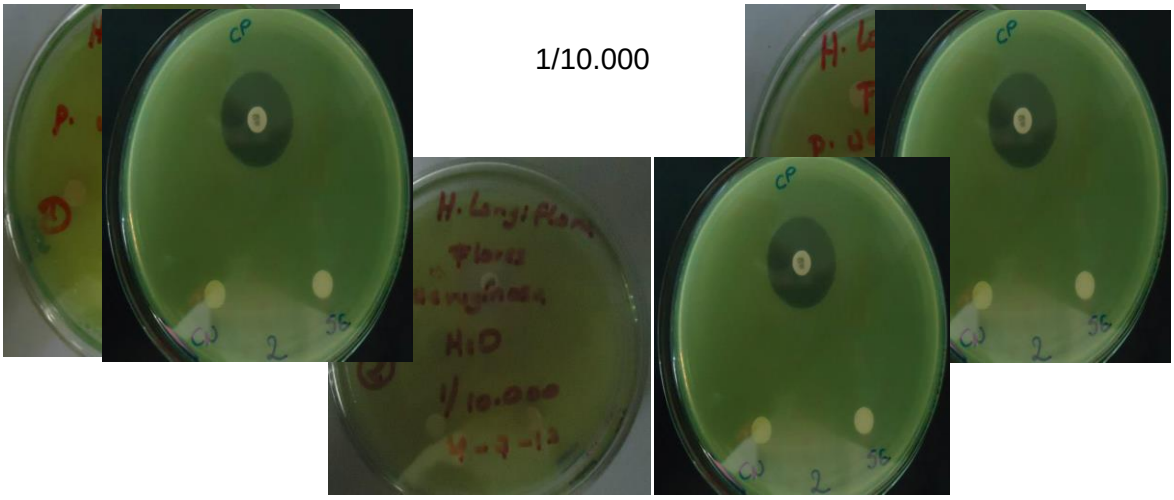


1/10.000



Extracto acuoso dilución 1/100, 1/1.000

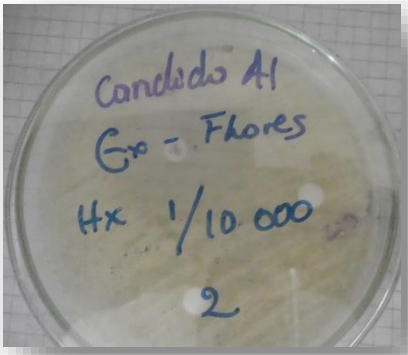
1/10.000



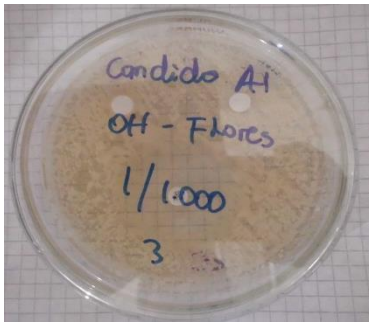
24.- **C. albicans**

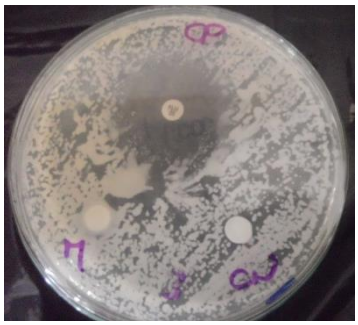
Extracto hexanico dilución 1/100, 1/1.000

1/10.000

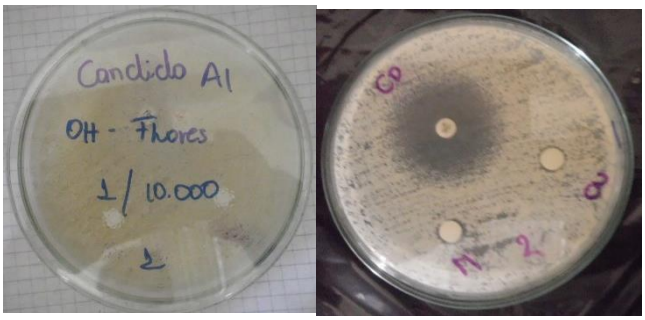


Extracto etanólico dilución 1/100, 1/1.000

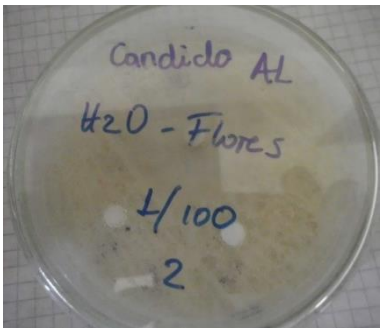


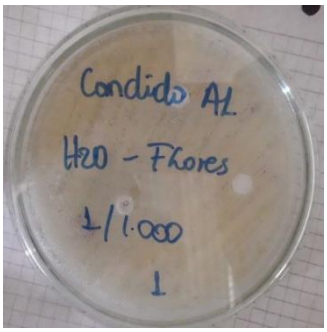
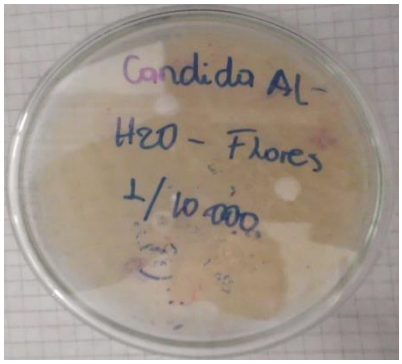
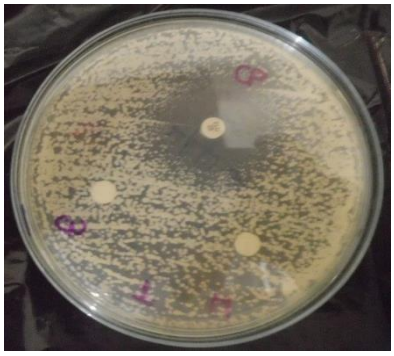


1/10.000



Extracto acuoso dilución 1/100, 1/1.000





1/10.000