



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

**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.**

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE LICENCIADO EN  
LABORATORIO CLÍNICO

**AUTOR:**

**Carpio Toledo Roberto Salvador**

**DIRECTORA:**

**Bioq.Farm. María Elizabeth Betancourt Patiño**

**LOJA- ECUADOR**

**2013**

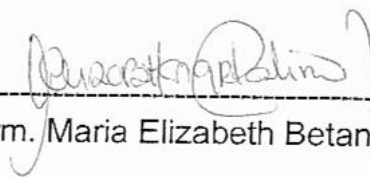
## CERTIFICACIÓN DEL DOCENTE DIRECTOR

Bioq. Farm. Maria Elizabeth Betancourt Patiño

**DOCENTE DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.  
DIRECTORA DE TESIS.**

Certifico:

Que el trabajo de investigación titulado "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.", elaborado por el Sr. Carpio Toledo Roberto Salvador ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana, por lo que autorizo su presentación.



---

Bioq. Farm. Maria Elizabeth Betancourt Patiño

**DIRECTORA DE TESIS**

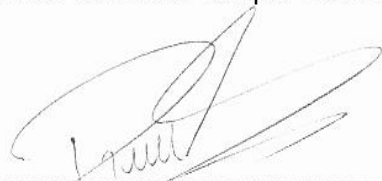
## AUTORÍA

Yo **Roberto Salvador Carpio Toledo** declaro ser autor (a) del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y 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.

**Autor:** Roberto Salvador Carpio Toledo

**Firma:** \_\_\_\_\_



**Cédula:** 1104892300

**Fecha:** 17 de Enero del 2014

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

Yo **Roberto Salvador Carpio Toledo** 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 17 días del mes de Enero del dos mil catorce, firma el autor.

Firma: 

**Autor:** Roberto Salvador Carpio Toledo

**Cédula:** 1104892300

**Dirección:** Daniel Álvarez B., Av. Benjamín Carrión, entre Domingo Sarmiento 22-17 y Salvador Allende. **Correo Electrónico:** beto\_sct@hotmail.com.

**Teléfonos:** 072-57-10-40

**Celular:** 0991-30-60-40

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

**Director de Tesis:** Bioq. Farm. María Elizabeth Betancourt Patiño.

**Tribunal de Grado:** Dr. Tito Carrión Dávila

Dra. Patricia Guerrero

Licda. Glenda Rodríguez

## DEDICATORÍA

Para el Hombre no existen barreras, las barreras se la pone el mismo Hombre como pretexto, para no escalarlas.

A mi madrecita querida , que si bien no estuviste en cuerpo presente en mis momentos mas valiosos de mi vida, espiritualmente siempre estas apoyándome como un ángel enviado por Dios, gracias a tus consejos nunca he decaído, esto es para ti con mucho cariño mi viejita querida.

A mi padre, por ser ese hombre que me ayudó siempre en las buenas y en las malas, por ser padre y madre para mi, en ausencia de lo máspreciado que tuvimos, y además agradecerte por tu confianza conmigo no me alcanzará la vida para agradecerte lo mucho que has hecho por mi viejito

A mi tesoro maspreciado mi hijo Sebastian, eres lo mas valioso que tengo en mi vida, para que recuerdes que tu padre te quiere mucho.

A mi suquita querida por su gran cariño y su amor incondiciona, gracias por estar conmigo en todos los momento de mi vida.

A mis queridos hermanos mayores, Edwin, Guido, Fernando, por su amor y apoyo incondicional, que gracias a su ejemplo de superación no los he defraudado.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, quién me dio la fortaleza diaria para no rendirme en las adversidades de la vida, y permitirme estar siempre con salud.

A mi madre (+), padre, hijo, novia, hermanos y familiares por su apoyo incondicional, han hecho posible la culminación de mi investigación.

A la Universidad Nacional de Loja, de manera particular a la Carrera de Laboratorio Clínico por permitirme estudiar, en tan prestigiosa carrera, y a la vez brindarme una excelente formación profesional y humana, con la capacidad suficiente para ejercer mis deberes profesionales.

Al Laboratorio de Análisis Químicos de la UNL, por permitirme el desarrollo de mi tesis y colaboración en todo lo necesario para su culminación.

A mi ex Director de Tesis Dr. Luis Morocho, por haberme elegido ser una de las personas para realizar esta investigación, así mismo por su valiosa asesoría, dedicación, paciencia, y conocimientos impartidos, que me ayudaron a desarrollar de manera eficiente mi tesis; de igual manera a la Dra. Claudia Cruz, por su colaboración diaria en todo el desarrollo del proyecto.

A mi Directora de Tesis la Bioq. Farm. María Elizabeth Betancourt Patiño, por ayudarme de la manera más desinteresada, en la culminación de mi investigación, y a la vez, por su valioso asesoramiento, y en especial su paciencia, me permitieron culminar.

**EL AUTOR**

## 1. TITULO

**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.**

## 2. RESUMEN: SUMMARY O ABSTRACT

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

Las planta estudiada fue recolectada en la Provincia de Zamora Chinchipe y es usada para tratar la erisipela e inflamaciones (Tsa'chi), además para el tratamiento curativo de lesiones cutáneas producidas por parásitos (*Leishmaniasis*). La infusión preparada con las flores es usada para tratar la gripe. Las hojas, maceradas y en cataplasma, se aplican para tratar la inflamación de ojos. Las hojas, mezcladas con las de *Duroia hirsuta*, sirven para preparar un remedio que se utiliza para tratar la mordedura de serpiente.

Para el estudio se prepararon 3 diluciones, con el solvente, hexánico, etanólico, y acuoso en (1/100,1/1.000,1/10.000) de los extractos liofilizados de la planta *Hippobroma longiflora*. Con estas diluciones se evaluó la actividad antibacteriana y antimicótica mediante el método Kirby Bauer modificado frente *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), y *Cándida albicans* (ATCC 26790).

Obteniéndose en los extractos etanólico, hexánico, y acuoso en las diferentes disoluciones actividad negativa, con las cepas ATCC control.

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



## SUMMARY

This research was performed at the Chemical Analysis Laboratory of the Universidad Nacional de Loja in the Microbiology Laboratory, in order to evaluate the antibacterial and antifungal activity of three extracts of *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo brave) by using the agar diffusion method

The plant studied was collected in the province of Zamora Chinchipe and it is used to treat erysipelas and inflammation (Tsa'chi) in addition to the curative treatment of skin lesions caused by parasites (*Leishmaniasis*). The infusion prepared from the flowers is used to treat the flu. The leaves, macerated and poultice are applied to treat eye inflammation. Leaves mixed with the *Duroia hirsuta*'s ones, serve to prepare a remedy that is used to treat snakebite.

To study three dilutions were prepared with the solvent, hexane, ethanol, and aqueous (1/100, 1/1000, 1:10,000) of freeze-dried extracts of the plant *Hippobroma longiflora*. 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).

Obtained in ethanol, hexane, and aqueous extracts in different dilutions negative activity, with strains ATCC control.

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

### 3. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la Medicina Tradicional (MT), en los siguientes términos:” prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basada en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales, y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades (14).

La utilidad primordial de las plantas medicinales es específica, es decir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud; es decir, disminuye o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad (15).

Las plantas medicinales son muy importantes sobre todo en países en vía de desarrollo que poseen, la mayor biodiversidad del mundo. En Pakistán, por ejemplo se estima que un 80% de las personas dependen de plantas medicinales para curarse y en China un 40%. En países desarrollados como los Estados Unidos se cálculo que un 60% de la población hace uso habitual de plantas medicinales para combatir dolencias. En Japón es mayor la demanda de plantas medicinales que la de medicamentos sintéticos (17).

En Ecuador existen aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas. El 80% de la población ecuatoriana depende del consumo de plantas medicinales y de sus productos para su salud y bienestar (18).

La medicina moderna, mediante los análisis clínicos y bioquímicos, apoyados por el avance de la tecnología y la investigación, han logrado precisar cuáles son los componentes principales de las plantas que actúan sobre la salud, diferenciando aquellas plantas que resultaron ser aptas para ese fin, de aquellas inocuas o potencialmente tóxicas o peligrosas. Se estima que más del 60% de los productos del mercado farmacéutico proviene de las plantas medicinales (18).

Las plantas medicinales son especies vegetales que contienen principios activos en sus órganos, encontrándose en mayor concentración en sus hojas,

tallos y raíces, los mismos que administrados en dosis suficientes ejercen un alto poder curativo. (18)

En nuestro país, Ecuador, son muy pocos los estudios realizados sobre plantas medicinales y, más aún, en la provincia de Zamora Chinchipe la misma que posee una gran variedad de plantas medicinales; destacándose 60 especies diferentes de plantas divididas en 38 familias; de estas 12 nativas y 26 exóticas; de las cuales el 60% se utilizan con fines medicinales(38). Así tenemos que en el año 2010 la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, realizó un estudio sobre plantas medicinales el mismo que evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de cinco especies de plantas medicinales por el método de difusión en agar.

Hoy en día, existen escasas investigaciones dirigidas a evaluar el potencial biológico principalmente antimicrobiano de plantas medicinales, es por esta razón que se realizó el presente proyecto con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos hexánico, etanólico, y acuoso en (1/100,1/1.000,1/10.000), de la especie *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar de kirby-Bauer modificado.

En este estudio se utilizaron diferentes cepas bacterianas como son: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), y *Cándida albicans* (ATCC 26790). Además se realizó diluciones de los extractos con títulos desde 1/100,1/1.000,1/10.000, se utilizaron controles negativos de hexáno, etanol, y acuoso, y controles positivos con discos estándares de antibióticos frente a cada microorganismo, obteniéndose resultados negativos en la actividad antibacteriana y antimicótica para todas las concentraciones evaluadas según la metodología descrita, considerándose que se pueden realizar otros estudios a mayor concentración y utilizando otros métodos.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### **Medicina Tradicional**

#### **Definición de medicina alternativa, medicina tradicional, y medicina complementaria**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la Medicina Tradicional (MT), en los siguientes términos:” practicas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basada en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales, y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades (14).

El termino medicina tradicional es de uso universal y se refiere no solo a la medicina indígena, sino a toda manifestación cultural de los pueblos del mundo por un esfuerzo por contrarrestar los efectos de la enfermedad (14).

Medicina Complementaria, Alternativa o no Convencional (MCA), es un término que se utiliza para referirse a un amplio grupo de prácticas sanitarias que no forman parte de la tradición de un propio país, o no están integrados en un sistema sanitario prevaleciente, como es el caso de la acupuntura y la homeopatía entre otras (14).

### **Definición de plantas medicinales**

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboraron unos productos llamados *principios activos*, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial sobre el organismo vivo.

Su utilidad primordial a veces específica, es decir como droga o, medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud pérdida; es decir, que tiende a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad (15).

### **Estructura de plantas medicinales**

Los órganos de las plantas están constituidos por muchos caracteres morfológicos que pueden ser estudiados a simple vista o con ayuda de

microscopios. La terminología y descripción de caracteres morfológicos y de muchos términos botánicos que se emplea en la mayoría de las plantas son: raíces, ramas, hojas, flores y semillas. Las características medicinales de las plantas se deben a presencia de compuestos químicos llamados principios activos, variando desde el punto de vista de su naturaleza química como el órgano vegetal que radica su existencia (16).

### **Uso e Importancia de las plantas medicinales**

Las plantas nos resultan extremadamente útiles. Por una parte aportan oxígeno necesario para poder respirar. Pero además nos aportan nutrientes para poder alimentarnos. El uso de plantas como alimento ha puesto una búsqueda desde los inicios de la humanidad de aquellas especies que resultan comestibles de aquellas que no lo eran.

Las plantas medicinales son muy importantes sobre todo en países en vías de desarrollo que poseen, a su vez la mayor biodiversidad del mundo. En Pakistán, por ejemplo se estima que un 80% de las personas dependen de estas para curarse y en China un 40%. En países desarrollados como los Estados Unidos se calcula que un 60% de la población hace uso habitual de plantas medicinales para combatir dolencias. En Japón es mayor la demanda de plantas medicinales que la de medicamentos sintéticos (17).

Más de dos terceras partes de las especies de plantas del mundo, de las cuales al menos 35.000 tienen valor medicinal, se originan en los países en vías de desarrollo. Al menos 7.000 compuestos de la farmacopea occidental se derivan de plantas. A mediados de los años 90, 32.000 millones de dólares corresponden al abanico de productos farmacéuticos basados en medicamentos tradicionales, de los cuales sólo 551 millones de dólares fueron recibidos como beneficios en los países en desarrollo. En Ecuador existen aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas. El 80% de la población ecuatoriana depende del consumo de plantas medicinales y de sus productos, para su salud y bienestar.

El doble papel que juegan hoy las plantas medicinales, tanto como fuente de salud como de ingresos económicos para cultivadores, comerciantes, colectores y fabricantes de medicinas basadas en plantas, es una contribución importante al proceso de desarrollo.

La medicina moderna, mediante los análisis clínicos y bioquímicos, apoyados por el avance de la tecnología y la investigación, ha logrado precisar cuáles son los componentes principales de las plantas que actúan sobre la salud, diferenciado aquellas plantas que resultaron ser aptas para ese fin, de aquellas inocuas o potencialmente tóxicas o peligrosas. Se estima que más del 60% de los productos del mercado farmacéutico proviene de las plantas medicinales (18).

### **Efectos secundarios de las plantas**

Con respecto a la seguridad en el uso de las plantas, muchas drogas de origen vegetal provienen de la medicina tradicional y han sido utilizadas durante cientos de años, lo cual proporciona cierta garantía, principalmente en lo que a toxicidad aguda se refiere. A pesar de todo, si bien sabemos que los productos fitoterápicos suelen tener márgenes terapéuticos amplios y menos efectos secundarios, las drogas vegetales y sus derivados, no están exentas de posibles, y a veces incluso graves efectos secundarios, interacciones o incompatibilidades y contraindicaciones; por ejemplo algunos aceites esenciales se consideran irritantes de las mucosas (gástrica, respiratoria y urinaria), este hecho justifica su acción farmacológica como estimulantes de las secreciones digestivas, expectorantes y diuréticos. Otro ejemplo pueden ser las plantas laxantes ricas en antracénosidos; que con el aumento de la dosis se transforman en purgantes o catárticos, ocasionando importantes disfunciones intestinales, hipokaliemia y debilidad muscular, congestión hemorroidal, etc. (19).

### **Definición de principios activos de las plantas medicinales**

Los principios activos de las plantas medicinales, también conocidos como metabolitos secundarios, son sustancias que se encuentran en las distintas

partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. Además, se conocen moléculas activas generadas por diversas especies vegetales, necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas (20).

### **Definición de los principales grupos activos y sus aplicaciones**

#### **Alcaloides**

Son sustancias procedentes de metabolitos secundarios y sintetizados a partir de aminoácidos. Tiene la particularidad de ser amargos al gusto y solubles al alcohol, éter, cloroformo, o hexano, cristalizables o poco solubles en agua. Se localizan generalmente en los tejidos periféricos de la corteza, raíces, hojas, frutos y semillas (21).

#### **Flavonoides**

Se ubican principalmente en la hojas y en el exterior de la planta, apareciendo solo rastro de ellos en las partes de la planta por encima por encima de la superficie del suelo. Estos son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia las vacuolas de las células vegetales.

Estos compuestos poseen efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antialérgicos, antitrombótica, analgésico, antioxidante, protege el hígado y la mucosa gástrica, entre otros beneficios (21).

#### **Glucósidos**

Son compuestos activos que se pueden utilizar en la medicina en pequeñas dosis con una prudente administración. Estos se producen en el metabolismo secundario de la planta, se componen de dos partes, una inactiva en la cual un azúcar tiene efectos favorables en la absorción y solubilidad del glúcido, y la otra activa o genina que se utiliza como carácter terapéutico, y que puede ser un alcohol u otro compuesto orgánico (21).

#### **Quinonas**

Son muy abundantes en la naturaleza, se encuentran tanto en vegetales superiores como son los hongos y bacterias (21).

## **Saponinas**

Poseen propiedades diuréticas, digestivas, antiinflamatorias, expectorantes, adaptógenas, antitusivas, antiespasmódicas. También favorece la utilización o aprovechamiento de otras sustancias como el calcio y el sílice. Estos compuestos poseen una importante actividad antibacteriana, debido a que reducen la tensión superficial y actúan sobre los lípidos de la membrana provocando alteraciones de las mismas, lo que conlleva a la muerte celular; para ello se sugiere la formación de compuesto con el colesterol presentes en la membrana (21).

## **Taninos**

En la medicina se prescriben por su acción astringente, hemostática, antiséptica y tonificante. También son considerados como antídotos para diversos envenenamientos por alcaloides tóxicos. Se emplea en tratamientos de procesos diarreicos, inflamaciones de la piel y de la mucosa bucofaríngea (21).

## **Tripternos y Esteroides**

Muchas de las plantas deben a sus compuestos terpénicos, sus propiedades aromáticas inmersas en los aceites esenciales. Estos compuesto presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado: acción citotóxica, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antiséptica, inhibidoras del crecimiento bacteriana, entre otras (21).

## **Plantas con actividades biológicas**

La actividad biológica de las plantas va a depender de la concentración de los principios activos o metabolitos secundarios que ésta presente.

Los principios activos están influenciados por tres factores principales:

- Características del suelo
- El entorno físico (oxígeno, humedad y temperatura)
- La calidad de la materia orgánica.

Las plantas medicinales puede actuar en diferentes partes del organismo, de ahí tenemos que son importantes para tratar procesos inflamatorios, ayudan en



la digestión, trastornos cardiacos, dolores musculares, mejora la circulación sanguínea y ,sobre todo, contiene una gran riqueza nutricional. Una de las plantas que se ha comprobado que tienen estas capacidades curativas es la ruda, clavo de olor, manzanilla, entre otras (17).

### **Descripción Botánica de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don**



**Fotografía:** *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don.

**Fuente:**<http://flora.huh.harvard.edu/FloraData/1001/Images/Campanulaceae/Campanulaceae-Hippobroma%20longiflora-001.jpg> (22).

### **Taxonomía:**

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteroideae

Orden: Asterales

Familia: Campanulaceae

Subfamilia: Lobelioideae

Género: Hippobroma

Especie: Longiflora

Clasificador: (L.) G. Don (23).

Nombre Común (Ecuador): Cholo Valiente, Jazmincillo (castellano), otopichanga (lengua no específica) (6).

Nombre Científico: *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (23).

Nombre Vulgares (Costa Rica): Jazmin de estrella, cinco estrellas, caraña, doricu, camibar(11).

## **Características generales de la especie**

### **Descripción morfológica**

Es una hierba erecta o raramente decumbente de 15-90 cm de alto, tallo corto pubescente, cercanamente glabro. En la superficie del tallo se observan tricomas unicelulares peltados y en el interior se presenta el colénquima laminar que le da una mayor flexibilidad a este órgano (24).

### **Identificación y descripción**

**Hábito y forma de vida:** Hierba perenne.

**Origen:** Introducida

**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 (24).

**Flores:** Muy largas, vistosas. La parte basal del cáliz (que fusionada con otras estructuras de la flor forma lo que se conoce como hipanto) es ligeramente acampanada y termina en 5 lóbulos largos y muy delgados, con dientes gruesos en el margen; la corola blanca y a veces con las venas de color verde pálido, consiste en un tubo delgado y muy largo (de hasta 13.5 cm) que hacia el ápice se divide en 5 lóbulos angostos y puntiagudos que se curvan hacia atrás; estambres con los filamentos unidos en la parte superior y las anteras

también unidas y algo encorvadas, algunas más cortas, con un mechón de pelos blancos en el ápice (24).

**Frutos y semillas:** El fruto es seco, una cápsula de hasta 2 cm de largo, que en la madurez presenta 2 aberturas hacia el ápice. Semillas con la superficie reticulada (24).

### **Distribución**

Se ha reportado que el período de floración se da a través de todo el año y la distribución altitudinalmente va desde los 100 a los 1.200 msnm. Son plantas que forman un rizoma. Pueden encontrarse en clones de dos a tres individuos, pero en la mayoría de los casos hay un solo individuo (24).

### **Hábitat**

Común en sitios alterados, sobre todo húmedos. Frecuentemente a lo largo de canales de riego o arroyos, en zonas bioclimáticas como la selva alta perennifolia, selva baja caducifolia o en por el tipo de clima como los trópicos secos y húmedos (24).

### **Uso medicinal**

La planta se usa para tratar la erisipela e inflamaciones (Tsa'chi-Pichincha). La infusión preparada con las flores es usada para tratar la gripe. Las hojas, maceradas y en cataplasma, se aplican para tratar la inflamación de ojos. Las hojas, mezcladas con las de *Duroia hirsuta*<sup>1</sup>, sirven para preparar un remedio que se utiliza para tratar la mordedura de serpiente (6).

### **Composición Química**

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 esta

---

<sup>1</sup>*Duroia hirsuta*.- El huitillo, turma de mono, solimán, casa del diablo o borojocillo, es un árbol que se encuentra en los bosques tropicales húmedos del Pacífico y la Amazonia en Colombia, Ecuador y Perú. Las hojas machacadas son usadas en la elaboración de tinturas, y tanto la corteza y las ramas se utilizan en la medicina tradicional contra la diarrea y la fiebre y para aliviar picaduras de animales. [http://es.wikipedia.org/wiki/Duroia\\_hirsuta](http://es.wikipedia.org/wiki/Duroia_hirsuta)

razón, *H.longiflora* (y sus varios sinónimos) hace referencia en cuanto a su toxicidad en sus usos de etnobotánica (25).

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 (25).

Lobelina es el nombre de un alcaloide que se encuentra en varias plantas, entre ellas la Lobelia inflata, la Lobelia tupa, la Lobelia cardinalis, la Lobelia siphilitica y la Hippobroma longiflora. En su forma pura se presenta como un polvo que se disuelve fácilmente en agua (25).

La lobelina se ha usado como sustitutivo de la nicotina en tratamientos para abandonar esa adicción, y se ha aplicado también en tratamientos para la adicción o abuso de otras drogas, como la anfetamina, la cocaína o el alcohol(25).

### **Actividad Antimicrobiana**

Se define como actividad antimicrobiana a la capacidad que posee un fármaco o compuesto natural para inhibir el crecimiento de bacterias. Generalmente los compuestos que poseen dicha actividad vienen a tener un gran interés a nivel mundial, ya que con ellos se puede controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos (26).

En sí, la actividad antimicrobiana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla. Y que se pueda expresar cuantitativamente con pruebas *in vitro*. Además se puede realizar ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de Concentración Mínima Bactericida (CMB)(26).

### **Bacterias**

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared

celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa (27).

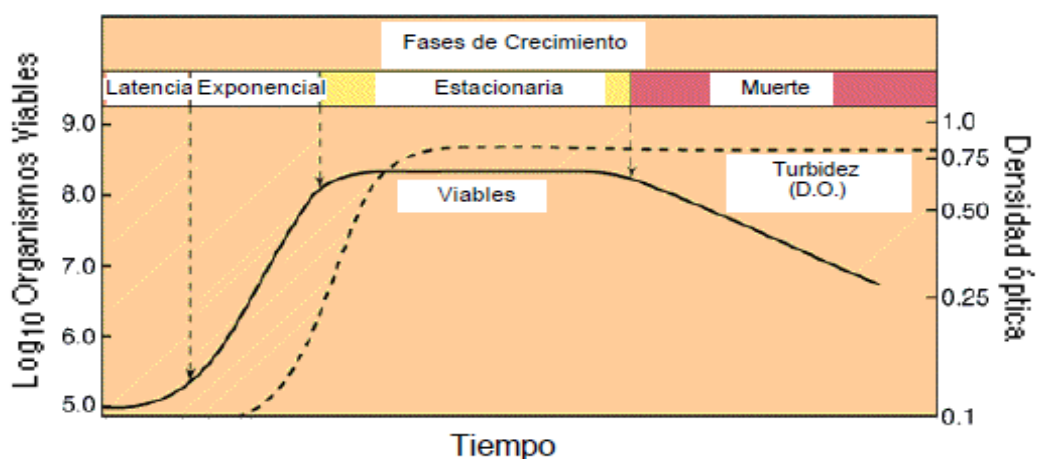
### Crecimiento bacteriano

El crecimiento es el incremento ordenado de todos los componentes de un microorganismo. Por tanto, el aumento de tamaño que resulta cuando una célula capta agua o deposita lípidos o polisacáridos, no es un crecimiento verdadero. La multiplicación celular es una consecuencia del crecimiento; en microorganismos unicelulares, la multiplicación aumenta la cantidad de individuos y da lugar a una población o cultivo (28).

La medición de las concentraciones microbianas se las puede medir en términos de **concentración celular** que es el número de células viables por una unidad de volumen de un cultivo, o de la **concentración de la biomasa** que es el peso seco de las de las células por unidad de volumen de cultivo (28).

### Curva de crecimiento

En la curva se distinguen cuatro fases:



**1. Fase de latencia.** Fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones del medio de incubación al que han sido transferidas. Las células no crecen inmediatamente sino después de este tiempo de latencia. Las

células son metabólicamente activas, se adaptan al medio y eventualmente lo modifican. Para un mismo inóculo, esta fase de latencia varía dependiendo del medio al que se transfieren y de las condiciones de incubación (29).

**2. Fase de crecimiento exponencial.** Fase en la que las células se están dividiendo regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas durante esta fase, el grado de desarrollo es máximo. Es en este periodo donde puede calcularse el tiempo de generación de un microorganismo (29).

**3. Fase estacionaria.** El número de células no se incrementa más porque los nutrientes del medio se van agotando y posibles sustancias tóxicas pueden ir acumulándose. No hay incremento neto del número de células, el número de células que se originan es igual al número de las que mueren (29).

**4. Fase de muerte celular.** Las células mueren a una velocidad mayor a la que se originan debido al agotamiento total de las nutrientes y/o excesivas acumulaciones de sustancias tóxicas. A veces la muerte va acompañada de lisis celular y esto disminuye la absorbancia del cultivo (29).

### **Actividad Antimicótica**

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos pretenden determinar la actividad relativa de uno o más fármacos frente al patógeno con el propósito de seleccionar la alternativa terapéutica más adecuada como tratamiento de la infección. Por tanto, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos se llevan a cabo por las mismas razones por las que se realizan pruebas con fármacos antibacterianos.

Las pruebas de sensibilidad a antifúngicos permiten:

- Obtener una estimación fiable de la actividad relativa de dos o más antifúngicos frente al microorganismo estudiado.
- Determinar la correlación existente con la actividad antifúngica *in vivo* y predecir el desenlace más probable del tratamiento.

- Vigilar la aparición de resistencia en una población normalmente sensible de microorganismos.
- Predecir el potencial terapéutico de los nuevos fármacos en fase de investigación (27).

## **Hongos**

Son microorganismos eucariotas que poseen un núcleo bien definido, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Los hongos pueden existir en una forma unicelular (levadura) capaz de replicarse de manera asexual, o en una forma filamentosa (moho), capaz de replicarse de forma tanto asexual como sexual. La mayor parte de los hongos existen en forma de levadura o bien en forma de moho. Sin embargo, algunos de ellos pueden adoptar ambas morfologías; se trata de los llamados hongos dimórficos, como *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Coccidioides*(27).

## **Cepas Estandarizadas ATCC**

ATCC (Colección Americana de Cultivo Tipo) es un centro de recurso biológico particular, cuya misión se concentra en la adquisición, la autenticación, la producción, preservación, desarrollo y distribución de microorganismos de referencias usuales, líneas de células y otros materiales para investigación en las ciencias naturales. Los estándares biológicos de la ATCC son vitales para garantizar la confiabilidad de los resultados de investigación, reproducibilidad de la experimentación y el método científico (30).

En nuestro medio por situaciones muy especiales y altamente beneficiosas, podemos tener acceso a las cepas control del *America Tipy Culture Collection* (ATCC), la colección más grande e importante del mundo. Estas cepas bacterianas pueden ser utilizadas como control en una gran variedad de utilidades lo cual nos permite conocer el grado de confiabilidad de los productos comerciales o elaborados en el laboratorio (30).

El programa de control de la calidad se basa en el uso de cepas bacterianas de referencia que se someten a pruebas con medios de cultivos clínicos. De

preferencia, este ensayo paralelo deberá hacerse cada semana o cada cinco lotes de pruebas, así como cada vez que empiece a utilizarse un nuevo lote (30).

## **MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE CEPAS ATCC**

### ***Staphylococcus aureus***

Es una bacteria anaerobia facultativa grampositiva que puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, hasta enfermedades de riesgo vital (27).

### **Identificación**

Se pueden utilizar pruebas bioquímicas relativamente sencillas (p. ej., reacciones positivas para la coagulasa, proteína A, nucleasa termoestable y fermentación de manitol) para diferenciar *Staphylococcus aureus* y otros *Staphylococcus*. La identificación de los *Staphylococcus coagulasa-negativos* resulta más complicada y exige el uso de sistemas comerciales diseñados para ello (27).

### **Cultivo**

Las muestras clínicas se deben inocular en medios de agar enriquecidas complementados con sangre de carnero. Los *Staphylococcus* crecen rápidamente en los medios no selectivos, tanto aerobia como anaerobiamente, y se pueden apreciar colonias lisas de gran tamaño en el plazo de 24 horas. Como se ha mencionado anteriormente, las colonias de *Staphylococcus aureus* adquieren gradualmente una coloración dorada, en especial cuando los cultivos se incuban a temperatura ambiente. Casi todas las cepas de *S. aureus* y algunas cepas de *Staphylococcus coagulasa-negativos* producen hemólisis en el agar sangre de carnero. La hemólisis se debe sobre todo a citotoxinas, fundamentalmente la toxina a. (27).

### **Condiciones para el crecimiento**

La bacteria en condiciones aerobias o microaerofílicas, crecen con mayor rapidez a 37°C produciendo colonias típicas a las 18 horas pero el pigmento se forma mejor a temperatura ambiente (20- 25°C). El *Staphylococcus aureus* y,



en ocasiones, otras especies pueden producir hemólisis de grado variables (28).

### **Características macroscópicas de las colonias**

Sobre medio sólido las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes. El *Staphylococcus aureus* comúnmente forma colonias de color gris, amarillo o dorado intenso (28).

### **Pruebas bioquímicas**

El *Staphylococcus aureus* es catalasa positiva, fermenta el manitol, fermentan lentamente muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas (31-30).

### ***Escherichia coli***

Pertenece a la familia de las *enterobacteriaceas*, forma parte de la flora normal incidentalmente causa enfermedad. Son microorganismos aerobios, fermentan una amplia variedad de carbohidratos, posee una estructura antigénica compleja y producen varias toxinas y otros factores de virulencia (27).

### **Identificación**

Bacilos gramnegativos cortos. Cuando crecen in vitro sobre medio sólido se observa la morfología característica, pero en muestras clínicas la morfología es muy variable (27).

### **Cultivo**

Crece sobre peptona o medios con extracto de carne sin adhesión de cloruro de sodio ni otros suplementos; el medio selectivo utilizado para el cultivo de *Enterobacteriaceae* más utilizado es el Mac-Conkey; ya que permite distinguir las colonias fermentadoras de lactosa (pigmentada) de las no fermentadoras de lactosa (no pigmentadas) y permiten una identificación presunta rápida de las bacterias entéricas (29).

### **Condiciones para el crecimiento**

Crece en condiciones aerobias y anaerobias (son aerobios facultativos); su crecimiento es rápido a 37°C (28).

## **Características macroscópicas de las colonias**

Forman colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados presentan brillo metálico sobre medio diferencial; dotado de motilidad; colonias no viscosas, aplanadas. Estas colonias producen hemólisis en agar sangre.

Los organismos fermentadores de la lactosa producen colonias rosadas o rojas que pueden estar rodeadas de una zona de bilis precipitada (28).

## **Pruebas bioquímicas**

Producen la fermentación rápida de la lactosa y glucosa en vez de oxidarla, con frecuencia producen gas; son catalasa- positivos, oxidasa negativos y reducen el nitrato a nitrito (31-30).

## ***Klebsiella Pneumoniae***

Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae*, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas (27).

## **Fisiología e Identificación**

Tienen capsulas grandes y regulares, además se caracterizan por tener fermentación rápida de la lactosa, muy viscosa, crecimiento mucoso, no motil (28).

## **Cultivo**

Agar Mackonkey es un medio selectivo utilizado para el cultivo de *Enterobacteriaceae*. Los organismos fermentadores de la lactosa producen colonias rosadas o rojas que pueden estar rodeadas de una zona de bilis precipitada. Los organismos no fermentadores de la lactosa, forman colonias incoloras y transparentes. La flora gran-positiva es inhibida por el cristal violeta (29).

## **Condiciones para el crecimiento**

Crece en aerobiosis en agar nutritivo a 37 °C con pH de 7.0 (28).

## **Características macroscópicas de las colonias**

Colonias grandes, de color rosado muy mucoides que tienden a confluir cuando la incubación se prolonga (28).

## **Pruebas bioquímicas**

Fermentación rápida de la lactosa más producción de gas (31-30).

## ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas* y otros bacilos no fermentadores constituyen un complejo conjunto de patógenos oportunistas de plantas, animales y el ser humano.

## **Identificación**

*Pseudomonas aeruginosa* crece rápidamente y forma colonias planas con bordes que se van extendiendo, P-hemólisis, una pigmentación verde relacionada con la síntesis de piocianina azul y fluoresceína amarilla, y un olor dulce característico semejante al de las uvas. Aunque la identificación definitiva de *Pseudomonas aeruginosa* es relativamente sencilla, se necesita una amplia batería de pruebas fisiológicas para identificar a otras especies del género *Pseudomonas* (27).

## **Cultivo**

Debido a que *Pseudomonas* tienen unos requerimientos nutricionales sencillos, pueden crecer fácilmente en los medios comunes de aislamiento, como el agar sangre y el agar Mac- Conkey. Necesitan una incubación aerobia (a no ser que se disponga de nitrato), por lo que su crecimiento en el caldo se restringe generalmente a la interfase caldo-aire, en la que la concentración oxigénica es máxima (27). El Agar Cetrimida es un medio utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* ya que favorece su pigmentación.

## **Condiciones para el crecimiento**

Es aerobio obligado, crece bien a 37 a 42°C (28).

## **Características macroscópicas de las colonias**

Forma colonias son mucoides, redondas y lisas de color verde fluorescente. A veces se produce un olor dulzón semejante a jugo de uva o de maíz.

La identificación casi siempre se basa en la morfología de las colonias, positividad a oxidasa, presencia de pigmentos característicos y crecimiento a 42°C (28).

### **Pruebas bioquímicas**

Es oxidasa- positiva. No fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa (31-30).

### ***Cándida albicans***

Las especies del género *Cándida* con forman el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas.

Las especies incluidas en este género constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas (adquiridas en el hospital) (IS) y superan a cualquier patógeno gramnegativo individual (27).

### **Fisiología y estructura**

Todas las especies del género *Cándida* se desarrollan como células levaduriformes ovaladas (3 a 5  $\mu$ m) que forman yemas o blastoconidias. Con excepción de *C. glabrata*, las especies producen también pseudohifas e hifas verdaderas.

### **Identificación**

En condiciones *in vitro*, casi todas las especies de este género dan lugar a colonias lisas en forma de domo de color blanco a crema. *Cándida albicans* y otras especies pueden sufrir modificaciones fenotípicas, en las que una cepa de *Cándida* se transforma de manera reversible en alguna de varias morfologías diferentes que comprenden desde la típica colonia lisa blanca formada principalmente por células levaduriformes de gemación a colonias (27).

### **Cultivo**

Normalmente se deben efectuar hemocultivos, cultivos tisulares y cultivos de los líquidos corporales estériles. Los cultivos en medios micológicos estándar

se emplean con el fin de aislar el microorganismo para su posterior identificación a nivel de especie. Con una frecuencia cada vez mayor, estas muestras se inoculan directamente en un medio cromogénico selectivo, como CHROMagar, el cual posibilita la detección de la presencia de varias especies de *Cándida* en la muestra y la rápida identificación de *Cándida albicans* (colonias verdes) y *C. tropicalis* (colonias azules) en función de sus características morfológicas (27). Agar Sabouraud es el medio para el cultivo de levaduras y hongos (29).

### **Condiciones para crecimiento**

Este tipo de hongo puede crecer con facilidad a temperatura ambiente o 37°C (28).

### **Características macroscópicas de las colonias**

Producen colonias blandas, mucoides, de color cremoso con olor a levadura (28).

## **MEDIOS DE CULTIVO**

Para estudiar las reacciones metabólicas y fisiológicas de las bacterias es necesario cultivarlas en medios de cultivo, son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable todos los elementos necesarios para el crecimiento y multiplicación de los microorganismos (29)

### **Clasificación de los medios de cultivo**

Los medios de cultivo se clasifican en:

#### **Medios selectivos:**

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

#### **Medios de enriquecimiento:**

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

**Medios de diferenciación:**

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

**Medios de identificación:**

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

**Medios de multiplicación:**

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

**Medios de conservación:**

Son aquellos cuya composición favorece el mantenimiento de los microorganismos que en él se siembran y que posteriormente se incuban a +2 - +3°C. Ej. Medios de Stuart, medio de Amies, etc. (29)

**Características de los Medios de Cultivo****Agar MacConkey.**

Separa las bacterias fermentadoras de la lactosa. *Escherichia coli* produce colonias rosadas, mientras que *Salmonella* y *Shigella* producen colonias translúcidas (32).

**Agar Manitol - Sal**

Medio selectivo y diferencial muy utilizado para el aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*. La alta concentración de sal (NaCl al 7.5 %) le proporcionan su carácter selectivo, ya que solo este tipo de microorganismos osmotolerantes pueden multiplicarse en él. Contiene como indicador el rojo fenol para la diferenciación bacteriana (32).

## **Mueller Hinton**

Medio preparado con infusión de carne vacuna, peptonas seleccionadas y almidón. Inicialmente fue descrito como medio para el aislamiento y cultivo de *Neisseria meningitidis* y *Gonorrhoeae* y para pruebas de sensibilidad a sulfamidas por su bajo contenido en ácido p-aminobenzoico (PABA).

Conservación y duración: conservado a temperatura de 2-30°C, puede durar 5 años en frasco cerrado.

Variaciones de Mueller - Hinton

- Mueller Hinton Caldo: Este medio ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad de los antimicrobianos en medio líquido.
- Mueller Hinton Agar: Es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.
- Mueller Hinton Chocolate Agar: Se utiliza para el aislamiento y cultivo de bacterias exigentes a partir de muestras clínicas. También se puede utilizar para las pruebas de sensibilidad de *Neisseria gonorrhoeae*.

## **Agar Sangre**

Este medio es utilizado para el aislamiento primario de la mayoría de las cepas cultivables en el laboratorio, que producen patologías en seres humanos. A las 18 horas de incubación se observan colonias medianas de 2 a 3 mm de diámetro y brillantes. La mayoría de las cepas no producen hemólisis, pero en algunas cepas es posible apreciarla debido a la producción de una esfingomielinasa que es capaz de lisar los eritrocitos del medio. Algunas veces se puede observar la producción de pigmentos como la pioverdina, que se aprecia como una coloración verdosa que difunde en el agar (32).

## **Agar Cetrimida**

Es un medio utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas* que favorece la pigmentación de *Pseudomonas aeruginosa* (29).

## **Agar Chapman Manitol**

Es un medio utilizado para el aislamiento de *Staphylococcus*, basado en la tolerancia que poseen a una alta concentración de cloruro sódico. Sirve

también como medio diferencial de cepas fermentadoras de manitol. *Staphylococcus aureus* en condiciones anaerobias es la única especie que produce la fermentación (29).

### **Caldo triptona soya**

Medio altamente nutritivo para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes y recomendado por los ensayos de esterilidad y para uso generalmente del laboratorio (29).

### **Caldo cerebro corazón**

El caldo cerebro corazón (BHI) es un medio líquido, especialmente adaptado para el crecimiento de microorganismo exigentes (29).

## **PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS**

### **Prueba de la catalasa**

La enzima catalasa es propia de la mayor parte de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen citocromos, siendo la excepción los estreptococos. Su función es descomponer el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) desprendiendo oxígeno libre. La prueba se puede realizar en porta o directamente sobre el cultivo (29).

### **Prueba de la coagulasa**

Esta prueba, indica la presencia de la enzima coagulasa, que poseen algunos *Staphylococcus*. Estos gérmenes, incluidos en la especie *Staphylococcus aureus* son considerados patógenos. Actualmente se sabe que hay *Staphylococcus coagulasa negativo*, virulentos y productores de cuadros clínicos (29).

### **Prueba de la oxidasa**

Consiste en poner en manifiesto la presencia de la enzima oxidasa en determinados microorganismos. La oxidasa o citocromo-oxidasa es una enzima que cede electrones de un sustrato, al oxígeno, en el tren de transporte electrónico (29).



### **Prueba del citrato**

El principio de la prueba de utilización de citrato es determinar la capacidad que poseen algunos microorganismos de utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, produciendo alcalinidad (29).

### **Prueba de movilidad**

La movilidad bacteriana es otro determinante importante para la identificación final de una especie bacteriana. Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y localización varía entre las especies (31).

### **Prueba de ácido sulfhídrico**

La capacidad de ciertas especies bacterianas para liberar azufre de los aminoácidos que lo contienen azufre, produciendo ácido sulfhídrico. La enzima responsable de esta actividad es la cistinasa (29).

### **Prueba de la fenilalanina desaminasa**

La determinación de esta prueba es útil para la diferenciación inicial de especies de *Proteus spp.*, *Morganella spp.* Y *Providencia spp.* de otros bacilos gram-negativos. Solo miembros de estos géneros y algunos aislados relativamente raros del grupo *Enterobacter spp.*, tienen la enzima responsable de la desaminación oxidativa de fenilalanina (31).

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

Son medios utilizados preferentemente para la diferenciación de *Enterobacteriaceae*. En él se puede determinar las fermentaciones de los hidratos de carbono, la producción de gas y ácido sulfhídrico.

El agar hierro de kligler contiene dos azúcares: glucosa (0,1 por 100) y lactosa (1 por 100). El medio TSI lleva incorporado un tercer azúcar: sacarosa (1 por 100) (29).

### **Prueba de la úrea**

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, en amoníaco y CO<sub>2</sub> por la acción de la enzima ureasa, produciendo un cambio de color rojo en

el medio. La visualización del proceso se fundamenta en que la alcalinización producida en el medio de cultivo se detecta mediante un indicador de pH (rojo de fenol) (29).

### **Prueba del indol**

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias gracias a la enzima triptofanasa pueden hidrolizar el triptófano y producir indol, ácido pirúvico y amoníaco. La presencia de indol se detecta en el medio de prueba de triptófano observando el desarrollo de un color rojo en el medio al agregar una solución que contiene para-dimetil-aminobenzaldehído (p. ej., reactivo de Ehrlich o de Kovacs) (31).

### **Agar lisina hierro**

Esta prueba se utiliza para determinar si un bacilo gran-negativo descarboxila o desamina la lisina y forma ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S).

El agar lisina hierro (LIA) contiene lisina, peptonas, una pequeña cantidad de glucosa citrato amóniaco férrico y tiosulfato de sodio. Cuando se produce la fermentación de la glucosa, y el fondo del medio vuelve al estado alcalino (violeta). Si no se produce descarboxilasa el fondo permanece ácido (amarillo). Si hay desaminación oxidativa de la lisina se forma un compuesto que, en presencia de citrato amóniaco férrico y una coenzima, flavinamonucleótido, produce un color borgoña en el agar inclinado. Si la desaminación no tiene lugar la superficie del agar inclinado LIA conserva su color violeta (31).

### **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 (30).

## PRUEBAS PARA IDENTIFICAR HONGOS

**Prueba de tubo germinal.** Es una extensión filamentososa de la levadura, sin estrechamiento en su origen cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre.

Solo *Cándida albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales (30).

**Auxonograma.** Las levaduras contienen sistema enzimáticos específicos que determinan su capacidad para utilizar un hidrato de carbono como única fuente de carbono en un medio de cultivo adecuado (30).

**Zimograma.** Las levaduras tienen capacidad de fermentar uno o varios azúcares, es decir contienen sistemas enzimáticos específicos que permite la degradación anaerobia de los hidratos de carbono específicos con producción de CO<sub>2</sub> (30).

## PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos evalúan la capacidad de un fármaco antibacteriano para inhibir *in vitro* el desarrollo bacteriano. Esta capacidad puede determinarse por el método de dilución o por el método de difusión.

Para evaluar en forma cuantitativa la actividad de un antibiótico se debe enfrentar el microorganismo problema a una serie de diluciones de la droga en estudio. La concentración más baja del antimicrobiano que impide el crecimiento bacteriano después de una noche de incubación se considera como la "concentración inhibitoria mínima" o CIM del fármaco.

### Método de difusión

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con drogas en estado cristalino, etc.) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de

inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria.

Las pruebas de sensibilidad se deben realizar a partir de colonias aisladas. Se debe evitar la realización del antibiograma en forma directa, a partir del material clínico, excepto en las emergencias clínicas donde la coloración directa de Gram sugiera que el cultivo es monobacteriano. En este caso, debe luego repetirse la prueba, usando la metodología estandarizada.

#### **Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión**

Para cada antimicrobiano se establecen "concentraciones críticas" o "puntos de corte" que permiten separar a los microorganismos infectantes en tres categorías, sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia, según si la concentración requerida para la inhibición del desarrollo de cada uno de ellos (CIM) es inferior o no a dichas concentraciones.

**Sensible:** Un microorganismo se considera "sensible" a un antibiótico cuando se puede esperar que una infección causada por el mismo responda al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada.

**Resistente:** este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, cualesquiera que sean la dosis y la localización de la infección.

La categoría **sensibilidad intermedia** se aplica a dos situaciones. Por un lado, se incluyen en ella las cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico que puede utilizarse con éxito, para el tratamiento en dosis más altas, por ser poco tóxico o porque se concentra en el foco de infección (por ejemplo, antibióticos  $\beta$ -lactámicos o quinolonas en la orina) (33).

### **Medio de cultivo**

De los medios disponibles, el agar Mueller Hinton es considerado como el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de microorganismos de rápido crecimiento sin exigencias nutricionales especiales debido a que:

- Muestra buena reproducibilidad entre los distintos lotes.
- Tiene bajo contenido de inhibidores para sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas
- Es adecuado para el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos recopilados (33).

### **Conservación de los discos:**

Los discos deben mantenerse refrigerados a 2 - 8°C (si van a ser utilizados en los siguientes 7 días) o en congelador (freezer) a -14 °C o menos (para conservación a largo plazo). Para mantener su potencia, los discos que contienen drogas de la familia de los  $\beta$ -lactámicos deben mantenerse en congelador (freezer), salvo una pequeña provisión que puede permanecer en el refrigerador (33).

### **Volumen**

El agar Mueller Hinton puede prepararse en el laboratorio a partir de una base comercial deshidratada, siguiendo las instrucciones del productor.

Después de retirarse del autoclave debe permitirse su enfriamiento en un baño María a 45-50°C. Se debe verter en placas de Petri de vidrio o plástico de fondo plano, inmediatamente después de haberse enfriado hasta los 45-50°C.

El volumen del medio de cultivo deberá ser tal que pueda obtenerse una altura de 4 mm; Esto corresponde a 60 - 70 ml de agar para placas de 150 mm de diámetro interno y de 25 a 30 ml para las de 100 mm de diámetro interno. Se demostró que con volúmenes mayores o menores de agar, la prueba pierde reproducibilidad ya que pequeñas variaciones tienen efectos significativos.

Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2 - 8°C.) (33).

## **pH**

El pH debe ser controlado cuando se prepara cada lote de medio de cultivo. El método a utilizar dependerá del tipo de equipo disponible en cada laboratorio. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su esterilización. Las correcciones necesarias serán realizadas por el agregado de NaOH 1M o HCl 1M. Recordar que un pH muy ácido hace que drogas como los aminoglucósidos y macrólidos pierdan potencia mientras que un pH muy alcalino disminuye la actividad de las penicilinas (33).

## **Inóculo**

### **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  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL.

Preparar dicho estándar agregando 0,5 ml de BaCl<sub>2</sub> 0,048M (1,175% P/V BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,18 M (0,36 N) (1% V/V). Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm 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 puede controlarse marcando los tubos en el momento de la preparación con una marca a la altura del menisco (33).

### **Preparación del inóculo:**

A partir de 4 ó 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 ó 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 °C hasta que se alcance o exceda la turbidez del estándar (2 - 4 h) (33).

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 (33).

### **Inoculación de las placas**

Dentro de los 15 minutos posteriores a haberse ajustado el inóculo, sembrar las placas de Mueller Hinton con un hisopo estéril. Presione el hisopo rotándolo firmemente contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo. Inocular la superficie seca del agar por hisopado en dos o tres direcciones para asegurar una completa y homogénea distribución del inóculo. Las zonas de inhibición deberán ser uniformemente circulares y el desarrollo bacteriano confluyente o casi confluyente (33).

### **Aplicación de los discos de antibióticos en las placas inoculadas**

Esperar de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculado, con pinza de punta fina estéril y aplicando una ligera presión, a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. La distancia al borde de la placa al disco no debe ser

menor de 14 mm. En algunos laboratorios se cuenta con dispensadores automáticos.

Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 6 a 7 discos por placa de 100 mm (33).

### **Incubación**

Incubar las placas invertidas a 35 °C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados y sin concentración incrementada de CO<sub>2</sub> con excepción de *Haemophilus* spp, *Neisseria gonorrhoeae* y *S. pneumoniae*. Los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO<sub>2</sub> altera significativamente el tamaño de las zonas de inhibición de algunos agentes antimicrobianos. El tiempo de incubación es de 16 a 18 h, a menos que se trate de una cepa de *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus* spp, que deben incubarse por 24 horas completas para optimizar la detección de resistencia a oxacilina y vancomicina, respectivamente (33).

### **Lectura de las placas**

Se sugiere efectuar dicha lectura con calibre (vernier, nonio, pie de rey), regla graduada en milímetros o plantillas especiales sobre un fondo negro u oscuro y utilizando luz reflejada. Todas las mediciones se efectúan con aproximación de 1 mm y la persona que las interpreta debe de tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo. La lectura se efectúa por la parte posterior de la placa (base del agar). En el caso de medios que contienen sangre, la lectura se efectúa por la parte superior habiéndose removido la cubierta de la placa (superficie del agar). (33).

## **PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA**

Es un método de estudio in vitro del comportamiento de los anti fúngicos frente a los agentes infecciosos, permitiendo determinar su sensibilidad y resistencia. Así también permite establecer las concentraciones inhibitorias de los anti fúngicos que permitan orientar al tratamiento médico.



Normalmente no se estudia la sensibilidad de todos los hongos aislados en el laboratorio y suele limitarse a los procedentes de infecciones micóticas graves o de infecciones persistentemente recidivantes de la piel o de las mucosas (dermatitis, muget, vaginitis).

Las técnicas consideradas de referencia por el NCCLS (CLSI) para el estudio de la sensibilidad de los hongos son técnicas de macro y micro dilución en medio líquido posteriormente estandarizados en cuanto al medio de cultivo (RPMI 1640), tampón, pH, tiempo, inóculo y temperatura de incubación.

Los métodos basados en la difusión en agar han sido poco útiles debido a problemas de difusión de la mayoría de los anti fúngicos. Recientemente, se ha introducido un método cuantitativo de difusión en agar que emplea tiras de plástico inertes que incorpora un gradiente de concentración de anti fúngico y permite determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria).

**Sensibilidad:** Se considera sensible a un determinado anti fúngico cuando este puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria.

**Sensibilidad intermedia:** Es la que se refiere al microorganismo que no es afectado por dosis normales de anti fúngico dadas a intervalos adecuados, pero que si la dosis se eleva no existen efectos tóxicos y la actividad de es la adecuada.

**Resistente:** Un hongo es resistente a un anti fúngico cuando sigue produciendo la enfermedad en el paciente, a pesar de que la concentración del agente antimicótico sea máxima en el lugar de la infección. Lo anterior puede ocurrir porque en muchos casos de infecciones micóticas el paciente tiene un compromiso grave de la respuesta inmune; si es así, por más que se le administren fármacos, su sistema inmunitario no va a ser capaz de eliminar el agente patógeno.

### **Situaciones en las que se solicita un antifungigrama:**

- En caso de fracaso terapéutico;
- Cuando hay enfermos que han recibido profilaxis previa, porque de todas maneras se pueden seleccionar poblaciones más resistentes;
- En caso de aislar una especie poco frecuente, con sensibilidad in vitro desconocida; por ejemplo, cuando aparece una *Cándida* poco común, que no se puede identificar con facilidad en el laboratorio (34).

### **Concentración mínima inhibitoria**

Es la concentración más baja de antibióticos que impide el crecimiento visible de un microorganismo, para determinar el valor de la CMI, expresado en ug/ml o mg/l, se suele realizar diluciones decrecientes en base a 2 del antimicrobiano, bien en medio líquido o en medio sólido (35).

### **Concentración mínima bactericida**

Se la define como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de matar un 99.9% de la población bacteriana inicial. Refleja la posible actividad del antimicrobiano y se expresa, al igual que la CMI, en ug/ o mg/l (35).

## **CONTROL DE CALIDAD**

### **Calidad en el laboratorio**

Son todas aquellas actividades que se realizan con el objetivo de asegurar buenas técnicas del laboratorio, tanto en lo que se refiere a la calibración como estabilidad de procedimientos, reactivos y unos procedimientos fiables. Las ventajas del control de calidad son:

- Previene errores en los resultados
- Orienta al analista sobre un posible error
- Da seguridad en los resultados
- Aumenta la confiabilidad de los procedimientos
- Mejora la comparabilidad de resultados entre diferentes laboratorio

## Control de calidad en laboratorio clínico

Es un sistema diseñado para incrementar la probabilidad de que cada resultado reportado por el laboratorio sea válido, con el grado necesario de precisión y exactitud y pueda ser utilizado con confianza por el médico para tomar una decisión diagnóstica y terapéutica

El control de calidad incluye: control de calidad interno y control de calidad externo

### Control de calidad interno (Intra laboral)

Es el procedimiento que utiliza los resultados de un solo laboratorio, con el propósito de controlar la calidad. Este se basa principalmente en reflejar las variaciones en los resultados de las determinaciones, el cual permite conocer realmente como está funcionando el laboratorio y posibilidad de tomar decisiones oportunas. Por ejemplo:

- Los medios de cultivo de transporte como Stuart deben ser controlados con cultivo conocidos a una concentración conocida, de modo de asegurarse que cumpla su función.
- Los reactivos para la tinción de gram debe controlarse con cepas conocidas gram positivas y negativas.

El control de calidad interno Incluye los siguientes controles:

### Control de materiales y equipos (36)

Equipo	Procedimiento	Cronograma
Refrigeradoras y congeladoras	Llevar un registro de la temperatura	Control diario (2-8 °C)
Incubadoras	Registro de temperaturas	35. 5 a 37°C

<b>Autoclave</b>	Con cinta de autoclave que garanticen una correcta esterilización	Por lo menos semanalmente
<b>Pipetas automáticas</b>	Mediante la toma y expulsión de volúmenes iguales	Semanalmente
<b>Centrifugas</b>	Mediante el control de revoluciones con un tacómetro	Mensualmente
<b>Cabinas de seguridad</b>	Medición de la velocidad del aire a través de la apertura frontal	Cada 4 a 6 meses

### Control de medios de cultivo

**Esterilidad del medio:** Se controlara el 5 -10 % del lote de medios preparados a 35°C por 48 horas, si el porcentaje de placas contaminadas es mayor al 10% se descartara el lote completo

**Eficacia del medio:** Se comprobara el crecimiento de microorganismo en distintos medios selectivos - diferenciales, confirmando que crece según las características determinadas de cada uno (P. ejemplo, se verificara la hemólisis de las placas de Agar sangre sembrando cepas con distintas hemolisis) ejemplo.

<b>Medio</b>	<b>Microorganismos de control</b>	<b>Reacciones esperadas</b>
Agar MacConkey	<i>Escherichia coli</i>  <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Verdosas, brillo metálico y centro negro azulado.  Rosadas (fermentación de lactosa), y transparentes (no fermentadoras de lactosa).

### **Control de pH:**

Se controlara el pH del medio en cada lote de preparación, teniendo como rango de 7.2 a 7.4, controlar el pH antes de gelificar. Por ejemplo: utilizar el pHchmetro en el agar Muller- Hinton

### **Control de reactivos y discos para pruebas diferenciales**

#### **Los reactivos:**

Se controlan cada vez que se preparan o se abre un nuevo frasco. El control va dirigido principalmente a los colorantes de tinción y reveladores de las pruebas bioquímicas. Su eficacia se comprueba con microorganismos que dan respuesta positiva y negativa (ejemplo: indol positivo para *Escherichia coli*)

El control de calidad de los tubos Bioquímicas se deberá realizar usando cepas ATCC, por ejemplo:

- TSI: *Escherichia coli* ácido/ácido
- TSI: *Pseudomonas aeruginosa* alcalino/alcalino

#### **Control de los discos para antibiograma**

Los discos de antibiótico se conservaran en refrigeración en frascos cerrado con desecadores (2-8°C). El control de actividad de los discos se efectúa con cepas cuya sensibilidad se conoce (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 etc). Por ejemplo la cepa de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 se enfrentara con disco de gentamicina de 10ug, el halo de inhibición debe ser de 16 a 21 mm para ser sensible a dicho antibiótico

#### **Supervisión del personal**

El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio de microbiología. 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, esto se lo puede realizar controlando periódicamente los resultados obtenidos por el personal del laboratorio por un facultativo responsable.

## **Evaluación del personal**

La competencia del personal de microbiología, debe ser certificada por la revisión de su hoja de trabajo, la interpretación de muestras desconocidas, su habilidad técnica y exámenes escritos anuales.

Se debe llevar un registro profesional acerca de su evaluación académica, reporte sobre su capacidad de trabajo, asistencia a programas de educación continuada, responsabilidad, asistencia, trabajos de investigación, charlas, conferencias y su evaluación profesional anual.

Todo nuevo empleado que se adicione a la plantilla de la sección, debe ser documentado, evaluado y certificado, incluyendo las fases pre-analíticas, analíticas y post-analíticas de funcionamiento del laboratorio.

## **Control de calidad de la infraestructura del laboratorio**

- Locales de extensión adecuada, al volumen y necesidades de los trabajos que en ellos se realizan
- Limpieza, ventilación y temperatura adecuada
- Buena distribución y uso asignado a los diferentes espacios que facilite el flujo del personal y los materiales de trabajo, evitando idas y venidas inútiles y pérdidas de tiempos
- Correcta ubicación e instalación de los equipos, con espacios suficientes para su operación
- Equipamiento (Baños, lavamanos, desinfectantes, agua potable) que facilite la higiene del personal de los pacientes
- Medios y equipos comunes(almacén, refrigeradores, congeladores, centrifugas, agua destilada) en calidad y cantidad necesaria, fácilmente accesibles para el personal que los use
- Señalización visible y clara donde se requiera por razones de privacidad, necesidad profesional, riesgo o peligro

## **Control de calidad externo**

Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar un desconocido y llegar a un resultado seguro. Los mismos consisten en la

identificación de muestras o microorganismos desconocidos en los cuales se debe informar del resultado de la identificación, pruebas utilizadas para el diagnóstico etiológico y sensibilidad a los antibióticos.

Es el proceso que utiliza los resultados de varios laboratorios que analizan la misma muestra con el propósito de controlar la calidad. Es decir es la evaluación por parte de una agencia externa, el objetivo es alcanzar la capacidad de comparación entre laboratorios y entre métodos, pero esto no garantiza la exactitud al menos que las pruebas hayan sido analizadas por un laboratorio de referencia que de un valor conocido

### **Ventajas de un control de calidad externo**

- Permite la detección de fuentes de variabilidad analítica, su control y mejora continua
- Posibilita validar el nivel de exactitud para cada procedimiento analítico
- Es esencial para el proceso de control y mejora de fuentes de inexactitud analítica
- Nos permite obtener un resultado parcialmente confiable

### **Normas aplicadas para el control de calidad en el laboratorio**

**ISO 9001:2000:** Es una norma genérica para sistemas de gestión de calidad, es aplicable a los laboratorios clínicos, su finalidad es especificar el sistema de gestión de calidad

**ISO 15189:2003:** Es una norma de acreditación que cumple con los requisitos de gestión de calidad, lo cual asegura la competencia técnica del laboratorio y añade las condiciones para todas las actividades específicas de nuestro ejercicio profesional, en las fases preanalítica, analítica y post analítica (37).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Tipo de estudio**

La presente investigación es de tipo descriptivo, experimental.

- **Área de estudio**

La provincia de Zamora Chinchipe

- **Universo**

*Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente).

- **Muestra**

Hojas de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (cholo valiente).

- **Criterio de inclusión**

Hojas de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don, sin signos de deterioro.

- **Criterio de exclusión**

Hojas que no presenten las características morfológicas típicas de la planta.

## MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DEL ANÁLISIS

### Técnica e instrumentos de recolección de datos:

- Cámara fotográfica y Hojas de registro de resultados

## METODOLOGÍA

### 1. PROCESAMIENTO DEL ESPÉCIMEN VEGETAL (*HIPPOBROMA LONGIFLORA*)

#### 1.1. Colecta

La recolección de la planta se realizó en la zona de estudio, según lo establece el protocolo de recolección de plantas del Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de Loja. Un ejemplar de la planta fue remitido al Herbario Reinaldo Espinoza para su identificación. (**Protocolo N.- 01**).

#### 1.2. Lavado

El material vegetal se lavó, según lo establece el protocolo de lavado, se realizó varias veces con agua corriente, especialmente las raíces con el fin de eliminar suciedad y escurridas para eliminar el resto de agua. (**Protocolo N.- 01**).



### **1.3. Secado**

El secado se realizó según lo establece el protocolo de secado del Laboratorio de Fitoquímica, en el cual indica que después de ser colectada la planta, especialmente hojas y flores, se secan a una temperatura ambiente, bajo sombra, o también extendiéndolas sobre papel periódico limpio (en blanco). **(Protocolo N.- 01).**

### **1.4. Molienda**

La molienda se realizó según lo establece el protocolo de molienda del Laboratorio de Fitoquímica, en lo cual se utilizara un molino de cuchillas con malla de un tamaño de 2 mm. Además los materiales de mayor dureza, deben ser cortados en un tamaño que facilite su posterior tratamiento (molienda). **(Protocolo N.- 01).**

## **2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS: HEXÁNICO, ETANOL, Y AGUA**

### **2.1. Hexánico**

El proceso de obtención de extractos se realizó según lo establece el protocolo de obtención de extractos de plantas del Laboratorio de Fitoquímica, en el cual el extracto tratado con hexánico será macerado por 24 horas a temperatura ambiente se separara el extracto y se concentrara en Rotavapor a 20° C. El proceso se repetirá una vez más y el extracto concentrado será liofilizado. **(Protocolo N.- 02).**

### **2.2. Etanol**

El proceso de obtención de extractos se realizó según lo establece el protocolo de obtención de extractos de plantas del Laboratorio de Fitoquímica, en el cual el extracto tratado con Etanol será macerado por 24 horas a temperatura ambiente se separara el extracto y se concentrara en Rotavapor a 40° C. El proceso se repetirá una vez más y el extracto concentrado será liofilizado. **(Protocolo N.- 02).**

### **2.3. Acuoso**

El proceso de obtención de extractos se realizó según lo establece el protocolo de obtención de extractos de plantas del Laboratorio de Fitoquímica, en el cual

el extracto tratado con Agua será macerado por 24 horas a temperatura ambiente se separara el extracto y se concentrara en Rotavapor a 45° C. El proceso se repetirá una vez más y el extracto concentrado será liofilizado. **(Protocolo N.- 02).**

### **3. PRUEBAS PILOTO:**

Este proceso me permitió validar los protocolos, los cual los realice cautelosamente en cada procedimiento, dentro de los cuales considere:

- 3.1.**Preparación de los medios de cultivo selectivos para cada tipo de bacteria de acuerdo a protocolos establecidos. **(Protocolos N.- 2, 3, 5, 6).**
- 3.2.**La viabilización de los microorganismos con el fin de trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas. **(Protocolo N.- 22).**
- 3.3.**Elaboración del tubo N.- 5 de la Escala de Mac-Farland para preparar el inóculo y poder realizar la respectiva siembra; además a este inoculo se le realizó la lectura en el espectrofotómetro el mismos que se encontró dentro del valor promedio que es entre 0.085 a 1.0nm **(Protocolo N.- 20).**
- 3.4.**La elaboración de los discos se realizó con papel filtro Whatman N° 3, usando un sacabocados de 6 mm diámetro.
- 3.5.**Se realizaron pruebas para la comprobación del método, utilizando el extracto de una planta de actividad antimicrobiana conocida como es aceite esencial de clavo de olor. El mismo que nos dio resultados positivos.
- 3.6.**Se practicaron ensayos de la CMI y CMB gracias a los resultados positivos que se obtuvo del aceite esencial de clavo de olor obteniendo como resultado del CMI en el tubo 5 y CMB 30UFC/ml **(Protocolos N.- 32, 33).**
- 3.7.**Se estandarizaron tiempos de incubación, esterilización del material, temperatura de incubadora.

## 4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y DE DISCOS CON EXTRACTOS

### 4.1. Preparación de soluciones de trabajo

Los extractos vegetales que se utilizaron en la presente investigación son: extracto total acuoso, etanólico y hexánico de *Hippobroma longiflora* a partir de los cuales se prepararan 3 diluciones decimales equivalentes a: 1/100, 1/1000 y 1/10.000 usando el mismo solvente con que se hizo la extracción y conservadas en frascos ámbar a 4°C hasta su uso.

### 4.2. Preparación de discos con extractos

- Los discos fueron elaborados con papel filtro Whatman N° 3, usando un sacabocados de 6 mm diámetro.
- En el proceso de esterilización de los discos consiste en la colocación en una caja petri estéril, después a una cabina de flujo laminar mediante rayos ultravioleta (UV), por el lapso de dos horas.
- Por ultimo los discos van a ir en una caja petri que va a contener la malla metálica estéril y procedemos a impregnar con 10 ul de extracto (acuoso, etanólico y hexánico) esperamos unos minutos y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de extracto (acuoso, etanólico y hexánico), cada dilución contiene una concentración de 200 ug, 20 ug y 2 ug.

## 5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIMICÓTICA

### 5.1. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se comercializan desecados, en forma de polvo, para su disolución y esterilización. En este estudio se utilizaran 4 medios de cultivo específicos para cada cepa ATCC, considerando los más específicos para cada microorganismo y los de más disponibilidad.

- Agar Chapman Manitol: *Staphylococcus aureus*
- Agar Mac-Conkey: *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*
- Agar Cetrimide: *Pseudomonas aeruginosa*
- Agar Saboraud dextrosa: *Cándida albicans*

## 5.2. Viabilización de cepas 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.

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

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),
- *Escherichia coli* (ATCC 25922),
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883),
- *Cándida albicans* (ATCC 26790).

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

- Agar Chapman Manitol: *Staphylococcus aureus*
- Agar Mac-Conkey: *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*
- Agar Cetrimide: *Pseudomonas aeruginosa*
- Agar Sabouraud dextrosa: *Cándida albicans*

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

## 5.3. Tinción de Gram

Este método de tinción tiene una enorme importancia bacteriológica, ya que me permitió clasificar morfológicamente a las bacterias en dos grandes grupos: 1) Bacterias Gram positivas; 2) Bacterias Gram negativas.

## 5.4. Pruebas bioquímicas

Sirven para el reconocimiento bacteriológico y micótico, existen un sin número de pruebas bioquímicas, en este tipo de estudio tuve una batería de pruebas específicas para 5 cepas ATCC, dentro de las cuales tenemos: Prueba de la

catalasa, Prueba de la coagulasa, Prueba de la oxidasa, Prueba del citrato, Prueba de movilidad , Prueba de ácido sulfhídrico, Prueba de la fenilalanina desaminasa, Prueba con agar triple azúcar hierro (T.S.I), Prueba de la úrea, Prueba del indol, Agar lisina hierro, SIM, Auxonograma y el Zimograma.

## **6. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR**

### **6.1. Selección de discos o controles positivos**

Para la selección de los antibióticos, se utilizaron los flujogramas realizados por el Programa Microbiología Avanzada de la Universidad de Guayaquil / Instituto Nacional de Higiene, y con un control de calidad de acuerdo al CLSI año 2010, estableciendo puntos de corte de control de calidad de discos para: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), (SAM), ampicilina + sulbactam. *Escherichia coli* (ATCC 25922). (CIP), Ciprofloxacina. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), (CN), Gentamicina. *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), (AMC), amoxicilina + ácido clavulánico. Y *Cándida albicans* (ATCC 26790), (FI), Fluconazol, no presentan punto de corte para disco de sensibilidad, solo para CMI según CLSI, dentro de los cuales tenemos una sensibilidad de  $\geq 19$  mm, sensibilidad intermedia de 13 a 18 mm, y una resistencia de  $\leq 12$  mm.

### **6.2. Preparación del medio agar Mueller – Hinton**

Procedemos a la deshidratación del medio en agua estéril e inmediatamente, después de autoclavar se deja enfriar hasta que este el medio se encuentra en la temperatura idónea, ahora procedemos a verter el preparado fresco a una placa petri de vidrio o plástica, de fondo plano en un nivel, superficie horizontal para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Debe guardarse en refrigerador (2 - 8° C). La medición del pH debe ser examinado cuando el medio es preparado, debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 después degelificar a temperatura ambiente, para evitar el exceso de humedad se deja en una cámara de flujo laminar con las placas entreabiertas hasta que haya perdido por evaporación el exceso de humedad (usualmente 10 a 30 minutos).

### **6.3. Técnica de difusión en el medio**

Para esta técnica se preparó placas con Mueller – Hinton, en el caso de bacterias y agar Saboraud dextrosa en el caso de Hongos, una vez solidificado, se preparó el inóculo de cada microorganismo y al patrón estándar 0.5 de Mac Farland, que proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Se procede a sembrar en la superficie del medio del agar con un hisopo estéril, luego de 10 minutos, se coloca en la superficie del agar inoculado los disco de papel filtro, con 20ul de los extractos y controles negativos (acuoso, etanólico y hexánico), y los controles positivos que son discos de antibióticos de referencia para cada microorganismos. Procedemos a incubarlos a 37° C por un periodo aproximado de 18 a 24 horas. Pasado el tiempo estipulado procedemos a la lectura del halo de inhibición y en el caso de los Hongos a las 48 horas.

### **Difusión de resultados**

La difusión de los resultados estuvo a cargo del egresado, que se realizaron con la autorización previa del coordinador de la Carrera de Laboratorio Clínico, que fue dirigida a los estudiantes y docentes a través de un tríptico y presentación visual podrán conocer los resultados del trabajo investigativo.

### **Análisis de datos:**

Los datos una vez inspeccionados en la hoja de registro serán organizados y sustentados uno por uno de acuerdo a la bacteria y diluciones de las hojas, con el fin de verificar si existe o no actividad antibacteriana o antimicótica, y los cuadros de resultados fueron realizados usando el programa Excel.

## 6. RESULTADOS

**TABLA N.-1**

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

MICROORGANISMO	SOLVENTE	DILUCIONES	RESULTADOS				
			EXTRACTO	CONTROL POSITIVO Zona de diámetros en mm*			CONTROL NEGATIVOS
				S	I	R	
				≥21	16-20	≤15	
			<i>Hippobroma longiflora</i> (L.) G. Don				
<i>Escherichia coli</i>	HEXANO	1/100	Negativo	CIP	40 mm (s)	Hn	Negativo
		1/1000	Negativo		40 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		40 mm (s)		Negativo
	ETANOL	1/100	Negativo	CIP	40 mm (s)	OH	Negativo
		1/1000	Negativo		40 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		40 mm (s)		Negativo
	AGUA	1/100	Negativo	CIP	40 mm (s)	H2O	Negativo
		1/1000	Negativo		40 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		40 mm (s)		Negativo

**Leyenda:** s, sensible; mm, milímetros; CIP, Ciprofloxacina; Hn, Hexano; OH, Etanol; H2O, Agua; Negativo

\*: Diámetros de Inhibición establecidos por *Clinical and Laboratory Standards Institute*, año 2008

**Fuente:** Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.

**Autor:** Carpio Roberto, 2013

### INTERPRETACIÓN:

En las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, etanólico, hexánico y acuoso de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don, no presentan actividad antibacteriana contra la cepa de *Escherichia coli*, no se desarrolló halo de sensibilidad.

**TABLA N.-2**

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

MICROORGANISMO	SOLVENTE	DILUCIONES	RESULTADOS				
			EXTRACTO	CONTROL POSITIVO Zona de diámetros en mm*			CONTROL NEGATIVOS
				S	I	R	
			<i>Hippobroma longiflora</i> (L.) G. Don	≥15	12-14	≤11	
<i>Staphylococcus aureus</i>	HEXANO	1/100	Negativo	SAM	43 mm (s)	Hn	Negativo
		1/1000	Negativo		43 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		43 mm (s)		Negativo
	ETANOL	1/100	Negativo	SAM	43 mm (s)	OH	Negativo
		1/1000	Negativo		43 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		43 mm (s)		Negativo
	AGUA	1/100	Negativo	SAM	43 mm (s)	H2O	Negativo
		1/1000	Negativo		43 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		43 mm (s)		Negativo

**Leyenda:** s, sensible; mm, milímetros; SAM, ampicilina + sulbactam; Hn, Hexano; OH, Etanol; H2O, Agua; Negativo

\*: Diámetros de Inhibición establecidos por *Clinical and Laboratory Standards Institute*, año 2008

**Fuente:** Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.

**Autor:** Carpio Roberto, 2013

**INTERPRETACIÓN:**

En las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, etanólico, hexánico y acuoso de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don, no presentan actividad antibacteriana contra la cepa de *Staphylococcus aureus*, no desarrolló de halo de sensibilidad.



**TABLA N.-3**

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

MICROORGANISMO	SOLVENTE	DILUCIONES	RESULTADOS						
			EXTRACTO	CONTROL POSITIVO Zona de diámetros en mm*			CONTROL NEGATIVOS		
				<i>Hippobroma longiflora</i> (L.) G. Don	S	I	R		
					≥18	14-12	≤13		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEXANO	1/100	Negativo	AMC	23 mm (s)			Hn	Negativo
		1/1000	Negativo		24 mm (s)				Negativo
		1/10.000	Negativo		23 mm (S)				Negativo
	ETANOL	1/100	Negativo	AMC	24 mm (s)			OH	Negativo
		1/1000	Negativo		24 mm (s)				Negativo
		1/10.000	Negativo		23 mm (s)				Negativo
	AGUA	1/100	Negativo	AMC	24 mm (s)			H2O	Negativo
		1/1000	Negativo		23 mm (s)				Negativo
		1/10.000	Negativo		24 mm (s)				Negativo

**Leyenda:** s, sensible; mm, milímetros; AMC, amoxicilina + ácido clavulánico; Hn, Hexano; OH, Etanol; H2O, Agua; Negativo

\*: Diámetros de Inhibición establecidos por *Clinical and Laboratory Standards Institute*, año 2008

**Fuente:** Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.

**Autor:** Carpio Roberto, 2013

**INTERPRETACIÓN:**

En las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, etanólico, hexánico y acuoso de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don, no presentan actividad antibacteriana contra la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, no desarrolló de halo de sensibilidad

**TABLA N.-4**

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

MICROORGANISMO	SOLVENTE	DILUCIONES	RESULTADOS				
			EXTRACTO	CONTROL POSITIVO Zona de diámetros en mm*			CONTROL NEGATIVOS
				S	I	R	
			<i>Hippobroma longiflora</i> (L.) G. Don	≥21	16-20	≤15	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HEXANO	1/100	Negativo	CN	22 mm (s)	Hn	Negativo
		1/1000	Negativo		22 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		21 mm (s)		Negativo
	ETANOL	1/100	Negativo	CN	23 mm (s)	OH	Negativo
		1/1000	Negativo		22 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		21 mm (s)		Negativo
	AGUA	1/100	Negativo	CN	22 mm (s)	H2O	Negativo
		1/1000	Negativo		23 mm (s)		Negativo
		1/10.000	Negativo		22 mm (s)		Negativo

**Leyenda:** s, sensible; mm, milímetros; CN, Gentamicina; Hn, Hexano; OH, Etanol; H2O, Agua. ; Negativo

\*: Diámetros de Inhibición establecidos por *Clinical and Laboratory Standards Institute, año 2008*

**Fuente:** Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.

**Autor:** Carpio Roberto, 2013

**INTERPRETACIÓN:**

En las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, etanólico, hexánico y acuoso de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don, no presentan actividad antibacteriana contra la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, no desarrolló halo de sensibilidad.

**TABLA N.-5**

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

MICROORGANISMO	SOLVENTE	DILUCIONES	RESULTADOS					
			EXTRACTO <i>Hippobroma longiflora</i> (L.) G. Don	CONTROL POSITIVO Zona de diámetros en mm*			CONTROL NEGATIVOS	
				S	I	R		
				-	-	-		
<i>Cándida Albicans</i>	HEXANO	1/100	Negativo	FL	24 mm (s)	Hn	Negativo	
		1/1000	Negativo		24 mm (s)		Negativo	
		1/10.000	Negativo		24 mm (s)		Negativo	
	ETANOL	1/100	Negativo	FL	24 mm (s)	OH	Negativo	
		1/1000	Negativo		24 mm (s)		Negativo	
		1/10.000	Negativo		24 mm (s)		Negativo	
	AGUA	1/100	Negativo	FL	24 mm (s)	H2O	Negativo	
		1/1000	Negativo		24 mm (s)		Negativo	
		1/10.000	Negativo		24 mm (s)		Negativo	

**Leyenda:** s, sensible; mm, milímetros; FL, Fluconazol; Hn, Hexano; OH, Etanol; H2O, Agua; Negativo.

\*: Diámetros de Inhibición establecidos por *Clinical and Laboratory Standards Institute, año 2008.*, No hay puntos de corte, para discos de sensibilidad

**Fuente:** Registro de resultados de la actividad antibacteriana y antimicótica.

**Autor:** Carpio Roberto, 2013

**INTERPRETACIÓN:**

En las tres diluciones realizadas 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos, etanólico, hexánico y acuoso de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don, no presentan actividad antimicótica contra la cepa de *Cándida Albicans*, no desarrolló halo de sensibilidad.

## 7. DISCUSIÓN

La presente investigación se realizó en la Unidad de Microbiología y Fitoquímica del Laboratorio de Análisis Químicos de la Universidad Nacional de Loja, con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos (hexánico, etanólico, y acuoso) de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar modificado frente a cinco cepas ATCC de microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) y *Cándida albicans* (ATCC 26790). Según los resultados obtenidos, las hojas de la planta en estudio no presentaron actividad antibacteriana y antimicótica contra ninguno de los microorganismos empleados en diluciones: 1/100, 1/1.000, 1/10.000.

Según un estudio realizado en la ciudad de Imbabura – Peguche en el año 2010, se realizó un ensayo de tres plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de enfermedades bucofaríngeas, como tratamiento empírico ya que no se conoce información sobre las características fitoquímicas; estas plantas fueron *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), las cuales fueron extraídas en tres solventes. Los tres extractos fueron sometidos a pruebas microbiológicas, con cepas ATCC *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Klebsiella pneumoniae*, *Cándida albicans*, en las cuales mediante la impregnación del extracto sobre el disco se realizaron las pruebas de sensibilidad. Obteniéndose sensibilidad del extracto de la planta *Myrcianthes hallii* (arrayán) en etanol, mientras que el resto de análisis la sensibilidad fue negativa, no hubo desarrollo de halo, lo que difiere con el presente estudio en el cual no presentaron ninguno de los extractos sensibilidad frente a las cepas ATCC en estudio.(39).

Rangel Damerys, realizó un ensayo en el año 2001 de la planta *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon), En el presente estudio se lograron realizar evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso, de la partes aéreas, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Cándida albicans* (aislado

clínico), por el método de difusión en agar modificado, con el extracto puro y la dilución 1: 10. En el cual presentaron sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* en los tres solventes a excepción del extracto acuoso de la dilución 1:10, que no presentó sensibilidad; lo que difiere del presente estudio ya que no se presentó sensibilidad en ninguno de los extractos tanto en etanol, hexano y agua frente a cepas control ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae*(ATCC 13883) y *Cándida albicans*(ATCC 26790).(40).

El estudio ejecutado en la provincia de la Pampa, Argentina, se realizó un estudio primario de 80 extractos vegetales metanólicos provenientes de plantas silvestres recolectadas en diferentes áreas geográficas de la provincia con el objeto de detectar especies vegetales con propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, aplicando la técnica de difusión en agar, según el método de Kirby Bauer la cual fue modificada. En cada pocillo se colocó 60 µl de la solución del extracto vegetal y se utilizó como referencia estándar discos de Azitromicina. Como resultado del total de 80 especies vegetales estudiadas, treinta y tres de ellas presentaron resistencia frente a *Staphylococcus aureus*. En comparación con el presente estudio se utilizaron discos impregnados con los extractos en las diferentes diluciones obteniéndose resultados negativos. (41).

Es preciso indicar que estos estudios se realizaron empleando procedimientos diferentes al de mi estudio ya que varía en el método utilizado, diluciones y sustancias. Es por ello que no se descarta la presencia de actividad antimicrobiana de hojas *Hippobroma longiflora* empleando otras metodologías y diferentes concentraciones de las diluciones. Además *Hippobroma longiflora* de acuerdo a estudios taxonómicos es única especie, razón por la cual no hay estudios comparativos ya realizados, por lo que la actividad antibacteriana y antimicótica no está conocida para ser comparada con otros estudios de toxicidad, por los datos obtenidos el efecto terapéutico dicho por las personas que la utilizan no se validan con los datos obtenido en el estudio, de alguna manera deben ser utilizadas como efecto placebo porque terapéuticamente no tiene efecto las hojas de la planta, lo que requiere que la toxicidad puede estar presente en otras partes de la planta como raíz, flores y semillas.

## 8. CONCLUSIONES

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

- Los extractos etanólico, hexánico, y acuoso 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* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), mediante el método de difusión en agar.
- Los extractos etanólico, hexánico, y acuoso 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 la Cepa ATCC de *Cándida albicans* (ATCC 26790), mediante el método de difusión en agar.
- Los resultados fueron difundidos através de un tríptico, y una presentación visual, el lunes 11 de noviembre del 2013, a los alumnos del II ciclo a las 7 horas am, y al módulo V a las 18 horas pm, del mismo día.

## 9. RECOMENDACIONES

- La aplicación de las normas de bioseguridad en todo momento, en el laboratorio de microbiología.
- Mejorar los protocolos cada vez que se realice este tipo de investigaciones, con el fin de afianzar los mismos.
- El control de calidad de todos los equipos y un mantenimiento previo, con fin de no tener contratiempos.
- Mantener estéril todo material de vidrio o de plástico, con el fin de evitar contaminaciones.
- En la preparación del medio de Mueller Hinton verificar el pH y el grosor del medio para obtener un halo de inhibición adecuado.
- Realizar un control de las cepas abiertas cada semana en el medio de cultivo adecuado para observar, el tiempo que puede ser útil.
- Realizar diferentes diluciones y otro tipo de pruebas de toxicidad en las diferentes partes de la planta en estudio, con el fin de obtener mejores resultados.
- Mejorar la técnica de esterilización y perforación de discos de papel filtro.
- Realizar diluciones más concentradas, con fin de cambiar la metodología y obtener resultados positivos.
- Emplear un método adecuado para la conservación de las cepas ATCC empleadas, las mismas que servirán para posteriores estudios relacionados con este tipo.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Kowii, A. (2001). Sociedades diversas y educación. Revista Iberoamericana de Educación. Editada por la Organización de Estados Iberoamericanos (OEI).Número 26. Extraída el 24 de octubre, 2012 de: <http://www.rieoei.org/rie26f.htm>.
2. Heras, A. (1997). Conocimiento sobre plantas medicinales en una comunidad estudiantil de Atlautla, estado de México. México. Extraído el 23 de octubre, 2012 de: <http://www.tlahui.com/tlahui2/tlapiz1.htm#aida>.
3. Leon Jimenez, Vianey. 2005. Elaboracion de una base de datos de plantas utilizadas en la medicina tradicional de Mexico. [En línea] Octubre de 2005. [Citado el: 23 de Octubre de 2012.].
4. Espinoza Salazar, Inés Mercedes. 2003. Proyecto de Investigación Análisis Fitoquímico Y Actividad Antibacteriana de Tillandsia recurvata. [En línea] 2003. [Citado el: 25 de Octubre de 2012.]
5. Naranjo, P., Escaleras, R., (1995). La Medicina Tradicional en el Ecuador. Corporación Editora Nacional, Quito, pp.:192
6. De la Torre, L; Navarrete, H; Muriel, P; Macía, M; Balsle, H (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus, p. 271.
7. Boletín Epidemiológico. Volumen 20. Número 2. 1999. Conferencia Panamericana de resistencia Antimicrobiana en las Américas.
8. Trease, G.E. y Evans, W.C. 1993. Tratado de Farmacognosia.15ª ed. Editorial Blume. España. Pp. 263-280, 728-7.
9. Gualavisi Niquinga, Lilian Margoth. 2008. Creacion e introduccion del manejo de la historia clinica, el parte diario y el concentrado mensual de la Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del Ministerio de Salud Publica. [En línea] Agosto de 2008. [Citado el: 18 de Octubre de 2012.] <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/698/1/90047.pdf>.



10. Empresario, El Nuevo. 2012. Revista OPS dedica número especial a la resistencia antimicrobiana. [En línea] 27 de febrero de 2012. [Citado el: 19 de Noviembre de 2012.] [http://www.elnuevoempresario.com/noticias\\_125501\\_revista-ops-dedica-numero-especial-a-la-resistencia-antimicrobiana.php](http://www.elnuevoempresario.com/noticias_125501_revista-ops-dedica-numero-especial-a-la-resistencia-antimicrobiana.php).
11. Distribución y fenología de *Hippobroma longiflora* (Campanulaceae) y *Clematisacapulsensis* (Ranunculaceae) y. Moreira, Ileana. Costa Rica: s.n., Tecnología en Marcha., Vols. 17-4. [En línea]. 2004. [Citado el: 23 de octubre del 2012.] <http://cro.ots.ac.cr/rdmcnfs/datasets/biblioteca/pdfs/nbina-3224.pdf>.
12. Farinango, M. Ñacato, V. Quilo, N. Vaca, M. Pichasaca, A. Ortiz, M. (2005). Salud Intercultural. Direccion Nacional de Salud de los Pueblos y Nacionalidades Indigenas. Direccion Provincial de Salud de Pichincha. Quito.
13. Rios, M. Kaziol, M. Borgtoft, H, Granda, G. (2007). Plantas útiles del Ecuador. Aplicaciones, Retos y Perspectivas. Quito: Abya-Yala. pp 31-38, 54, 433.
14. OMS, Estrategias de un Nuevo Milenio para la Medicina Tradicional y Medicina Complementaria y Alternativa.
15. Fernando, M, Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Editorial S.A. España-Madrid 2002. Pág. 15.
16. Freire, A. Botánica Sistémica Ecuatoriana. Editorial Missouri Botanical Garden. Ecuador. Pág. 16
17. Botanica Online SI, "Libro de Botanica", (<http://www.botanical-online.com/botanica2.htm>) 22 de octubre del 2012.
18. Alternativa Herbal. "Plantas medicinales una alternativa natural" (<http://www.alternativaherbal.com/medicina-natural/plantas-mediciales-una-alternativa-natural/>) 22 de octubre del 2012.

19. Jiménez, J. Plantas medicinales. Medicina naturista fitoterapia. Año 2007. Pág. 28, 29, 32.
20. Andrea Jimena Lizcano Ramón, Jenny Lisseth Vergara González. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y Aceites Esenciales de las Especies Vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles Ferruginea*, *Myrcianthes hopaloides* y *Passifloramanicta* Frente a Microorganismos Patógenos y Fitopatógenos. Primera edición. Editorial Bogotá D.C. Año 2008. Pág.12-25-26-27.
21. Sulca Villamarin, Tania Salome. 2012. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmella repens*, *Urtica dioica*, y *Sonchus oleraceus*. Salgolqui : s.n., 2012. págs. 23-27-72.
22. Fotografía de la planta *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don. [En línea], <http://flora.huh.harvard.edu/FloraData/1001/Images/Campanulaceae/Campanulaceae-Hippobroma%20longiflora-001.jpg>.
23. Taxonomía de *hippobroma* [En Línea]. <http://www.hondurassilvestre.com/search/taxa/taxa.aspx?tsn=34577>. 22 de octubre del 2012.
24. Ficha informativa [En Línea], <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/campanulaceae/hippobroma-longiflora/fichas/ficha.htm>. 22 de octubre del 2012.
25. Propiedades de *Hippobroma longiflora*. [En Línea], <http://es.wikipedia.org/wiki/Hippobroma#Propiedades>. 23 de octubre del 2012.
26. Estrada, S. Tesis de grado sobre actividad antimicrobiana *in vitro*, Riobamba 2012. Pág. 2.
27. Murray, P.R. Microbiología médica. 6ta Ed. Editorial ElsevierMosby. España 2009. Pág. 2- 229.

28. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 17ª Edición. Publicación México. D.F - Santafé de Bogotá. Editorial El Manual Moderno. Año 2002. Capítulo V. Pág. 243-248-269-271-285-289-296-621
29. M.V. Alvarez, E. Boquet y M. I. de Fez. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 28-29-32-33-34-35-38-39-226-227-234-235-2356-238-240-244.
30. Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual Práctico de Microbiología. Publicación Barcelona-España. 3ª edición. Editorial MASSON S.A. Año 2005. Pág. 45-195-122-124-127-128-129-130-131-208.
31. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico. Publicada en Buenos Aires. Onceava Edición. Editorial Médica Panamericana. Año 2004. Pág. 137-157-160-232-238-239-242
32. Rojas, Norman. 2006. Bacteriología Diagnóstica. [ed.] Facultad de Microbiología. Costa Rica : s.n., 2006. Pág. 23-41
33. Galas, Marcelo. 2001. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por método de difusión. 2001. Pág. 12-13-14-15-16-17-18.
34. Martín Mazuelos E. Métodos de estudio de sensibilidad in vitro de levaduras. Rev. Esp. Quimioter 2000; 13: 99-103.
35. Zaragoza Crespo, R. 2008. *Microbiología aplicada al paciente crítico*. Buenos Aires : Medico Panamericana, 2008. págs. 56-57.
36. Fernández Espina, Camilo. 2005. Gestión de la calidad en el laboratorio clínico. Madrid : panamericana medica, 2005. págs. 501-506.
37. García Martos, Pedro. Microbiología clínica práctica. segunda. Madrid : s.n. págs. 158-162.
38. GEO LOJA. Perspectivas del medio ambiente urbano. Año 2007. Pág. 96-97.

39. Gómez Dayana (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *amaranthus plundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (patakuyuyo), especies reportadas en peguche – imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cándida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas.
40. Rangel D., García I., Velasco J., Buitrago D., Velasco E (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. *REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Vol. 42*.
41. Toribio, M. S.; Oriani, S.D.; Toso, R. E.; Tortone, C.A., Fernández, J.G. *Staphylococcus aureus* sensible a extractos metanólicos obtenidos de plantas nativas de la provincia de la pampa, argentina.

## **11. ANEXOS**

### **Anexo 1**

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

### **Anexo 2**

Certificado de la planta de estudio por el encargado del herbario de la UNL.

### **Anexo 3**

Autorización para difundir los resultados a los docentes y alumnos de la carrera de Laboratorio Clínico

### **Anexo 4**

Certificación de difusión de resultados.

### **Anexo 5**

Registro de asistencia de la difusión de resultados.

### **Anexo 6**

Trípticos

### **Anexo 7**

Formato de registro de resultado

### **Anexo 8**

Fotografías de los procedimientos realizados

### **Anexo 9**

Procedimientos realizados en el Laboratorio de la Unidad de Fitoquímica.

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

Protocolo N.- 002: Obtención de extractos con Etanol, Hexano y Agua de plantas medicinales por maceración.

Protocolo N.- 003: Operación de concentración en rota vapor.

## **Anexo 10**

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 MuellerHinton.

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 Trypticase de Soja.

Protocolo N.- 008: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Trypticase 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 *Escherichiacoli*.

Protocolo N.- 024: Viabilización y conservación de *Klebsiellapneumoniae*.

Protocolo N.- 025: Viabilización y conservación de *Pseudomonaaeruginosa*.

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

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

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

Protocolo N.- 029: Comprobación de los discos de sensibilidad.

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

Protocolo N.- 031: Procedimiento para evaluar la actividad antifúngica por el método de difusión en discos.

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

Protocolo N.- 033: Procedimiento para la realización de la concentración mínima bactericida en la evaluación antimicrobiana



## Anexo 1

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**Dirección de investigaciones**  
**Laboratorio de Análisis Químico**  
**Unidad de Fitoquímica**

Loja, 25 de Noviembre del 2013

Dr. Luis Morocho Yaguana

**RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE FITOQUÍMICA DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO-UNL.**

**CERTIFICA:**

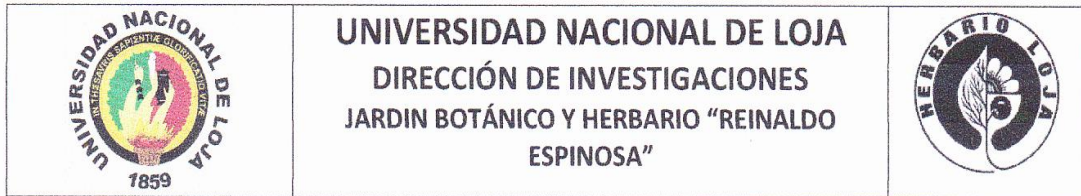
Que el egresado Carpio Toledo Roberto Salvador de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la UNL, realizó la parte práctica de su proyecto en nuestras instalaciones dando cumplimiento con los objetivos planteados en el trabajo de Investigación titulado **“Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar”**, el mismo que lo realizó desde día 8 de octubre de 2012 al 22 de noviembre del 2013.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y, por lo tanto, autorizó el uso del presente para los fines consiguientes.

Dr. Luis Morocho Yaguana  
**Responsable Unidad de Fitoquímica-LAQ**

## Anexo 2

Certificado de la planta de estudio por el encargado del herbario de la UNL.

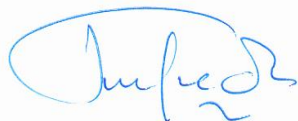


### A QUIEN INTERESE:

Certifico que en el herbario Reinaldo Espinosa –LOJA- de la Universidad Nacional de Loja, se ha realizado la identificación taxonómica de la planta denominada cholo valiente, que corresponde a la especie *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don., de la familia Campanulaceae, que consta en el catálogo de plantas vasculares del Ecuador.

Lo certifico para los fines pertinentes.

Loja, octubre 23 del 2013



Ing. Zhofre Aguirre Mendoza M.Sc.

**DIRECTOR DEL HERBARIO**



Bolívar Merino

**TÉCNICO DEL HERBARIO**

### Anexo 3

Autorización para difundir los resultados a los docentes y alumnos de la carrera de Laboratorio Clínico



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

Ofic. Cir. N° 909- CLC - ASH-UNL  
Loja, 28 de octubre del 2013

Señores  
**DOCENTES DEL II CICLO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO DEL  
AREA DE LA SALUD HUMANA**  
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Mediante el presente me permito dirigirme a usted, con la finalidad de poner a su consideración la petición enviada por el señor **ROBERTO DSALVADOR CARPIO TOLEDO**, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico, quien solicita que se le permita llevar a cabo la socialización de su proyecto de tesis titulado: **"Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los tres extractos de Hippobroma Longiflora ( L) G. Don ( Cholo valiente), por el método de difusión en agar"** con los señores estudiantes de la Carrera.

**Ante este pedido solicito a Usted que se de las facilidades a fin de que el señor egresado socialice su proyecto de tesis con los señores estudiantes del II Ciclo d la Carrera.**

Con los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,  
**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA  
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA**

  
Dra. Beatriz Bustamante García  
**COORDINADORA (E) DE LA CARRERA DE  
LABORATORIO CLINICO**

cc. archivo

Elaborado: María Jiménez



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

Ofic. Cir. N° 909- CLC - ASH-UNL  
Loja, 28 de octubre del 2013

Señores  
**DOCENTES DEL V MODULO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**  
**DEL AREA DE LA SALUD HUMANA**  
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Mediante el presente me permito dirigirme a usted, con la finalidad de poner a su consideración la petición enviada por el señor **ROBERTO SALVADOR CARPIO TOLEDO**, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico, quien solicita que se le permita llevar a cabo la socialización de su proyecto de tesis titulado: **“Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los tres extractos de Hippobroma Longiflora ( L ) G. Don ( Cholo valiente), por el método de difusión en agar”** con los señores estudiantes de la Carrera.

**Ante este pedido solicito a Usted que se de las facilidades a fin de que el señor egresado socialice su proyecto de tesis con los señores estudiantes del V MODULO de la Carrera.**

Con los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,  
**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA**  
**ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA**

*Dra. Beatriz Bustamante García*  
Dra. Beatriz Bustamante García  
**COORDINADORA (E) DE LA CARRERA DE**  
**LABORATORIO CLINICO**

cc. archivo

**Elaborado: María Jiménez**

## Anexo 4

### Certificación de difusión de resultados.

Loja, 11 de Noviembre de 2013

Dra. Fabiola María Barba Tapia

**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.**

Certifica:

Que el egresado Carpio Toledo Roberto Salvador, con numero de cedula 1104892300, de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana, realizo la difusión de los resultados, dando cumplimiento al objetivo planteado en el presente proyecto investigativo titulado "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.", el mismo que se realizo el dia lunes, 11 de noviembre de 2013, a las 18 pm horas a los alumnos del V modulo de la carrera .

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



Dra. Fabiola María Barba Tapia

**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**

Loja, 11 de Noviembre de 2013

Dra. María Susana Gonzales García

**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.**

Certifica:

Que el egresado Carpio Toledo Roberto Salvador, con numero de cedula 1104892300, de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana, realizo la difusion de los resultados, dando cumplimiento al objetivo plateado en el presente proyecto investigativo titulado "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.", el mismo que se realizo el dia lunes, 11 de noviembre de 2013, a las 7 am horas a los alumnos del II ciclo de la carrera .

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



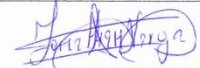





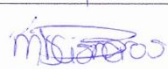

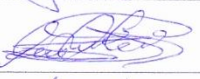

Dra. María Susana Gonzales García

**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**

## Anexo 5

Registro de asistencia de la difusión de resultados.

### REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
Jonathan Vargas	1104112502	Laboratorio Clínico	II	
Jonathan Arcapina	1104318892	Lab. Clínico	II	
María Virginia Mora	0706897949	Lab. Clínico	II	Ma. Virginia Mora.
Robertt Mauricio Córdova	190047822	Lab. Clínico	II	
Miguel Soto	110577757	Lab. Clínico	II	
Miriam A. Tuco y	1105009516	Lab. Clínico	II	
Estefanía CARRIÓN	0106673254	LABORATORIO Clínico	II	
Mayuri Chamba		Laboratorio Clínico	II	
María Coneros	1106021882	Laboratorio Clínico	II	
Adriana Sánchez Jaramillo	110501125-6	Laboratorio Clínico	II	
Gabriela Jirán Soto	19007171-9	Laboratorio Clínico	II	
Andy Lauren Cordero Tabora	110469301-3	Laboratorio Clínico	II	
Adrián Freije	070642993	Laboratorio Clínico	II	

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.



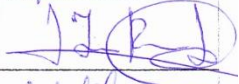




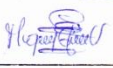

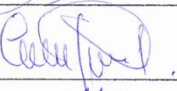
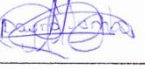
NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
David Andres	1104804172	Laborat. Clinica	II	
Lesly Vivanco	1150137311	Laborat. Clinico	II	
Glenda Moracho	1900815695	Laborat. Clinico	II	
Lady Eredia	1105970238	Laboratory Clinica	II	
Sofia Sorica	1106022187	Lab. Clinico	II	
Xavier Gordillo	1104357346	Lab. Clinico	II	
Katherine Mithquezo	1105752909	Lab. Clinico	II	
Shirley Lucero	1150130258	Lab. Clinico	II	
Jessica Moracho	1103655847	Lab. Clinico	II	
Jessica Elizabeth Torres	1106049842	Lab. clinico.	II	
Jasmina Ordóñez	1900697630	Lab- Clinico	II	
Daniela Armijos	1150007472	Lab- Clinico	II	





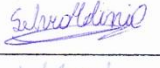
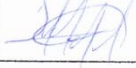
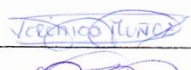
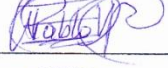
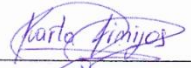


REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
Cristian Lojón	110517297-6	Lab. Clínico	✓	
Kleber Yurochumba	1104894643	Lab. Clínico	✓	
Gustavo Riosrio	1105668204	Lab. Clínico	✓	
Andrés Canión	1104206618	Lab. Clínico	✓	
Karen P. Zojan M.	1105140840	Lab. Clínico	✓	
Gianella Jalarezo	0705745545	Lab. Clínico	✓	
Janeith Torres	1103134876	LABORATORIO CLÍNICO	✓	
Eulalia Cuenca	1104966294	Laboratorio Clínico	✓	
Carol Chellogallo	1105809451	Lab. Clínico	✓	
William Guanda	1104681497	Lab. Clínico	✓	
William Silva	1104518715	Lab. Clínico	✓	
Nathaly Granda	11049104526	Lab. Clínico	✓	
Ulises Encalado	110526333-7	Lab. Clínico	✓	
Alicia Villavicencio	1104723067	Lab. Clínico	✓	
Marlon Bravo	1104806797	Lab. Clínico	✓	

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
Andrea Carolina Jiménez	1900706407	Laboratorio Clínico	✓	
Glenda Soto	1105116527	Laboratorio Clínico	✓	
Irene Sequilonda	0705634632	Lab. Clínico	✓	
Cristian Luna	1104398563	Lab. Clínico	✓	
Jessica Peratta Domijos	1105226623	Laboratorio Clínico	✓	
Carmen Gladys Castillo	1105119430	Lab. Clínico	✓	
Deyslaniso Andrade	1104493254	Lab. Clínico	✓	
Hergeory Grande	1105626004	Lab. Clínico	✓	
Cabeza Marin. A	1104936150	Laborat. Clínico	✓	
Uliana Jimas.	1105032070	Laborat. Clínico	✓	
Dayra Jumbo S.	1104055111	Laborat. Clínico	✓	

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
Daniela Alej. Flores Pazaca	1105164915	Laboratorio Clínico	V	
Karla del Corno Durán H.	1105146631	Laboratorio Clínico	V	
Silvia Susana Madro Castro	1105619165	Lab. Clínico	V	
Mayra Alexandra Medina Lara C. H. E.	1105195077	Lab. Clínico	V	
VERÓNICA CRISTINA MURAZ JUNCA	1103624795	lab. Clínico	V	
Pablo Andrés Villavicencio	1104811334	Laboratorio Clínico	V	
Karla Armijos Macos	1104672264	Laboratorio Clínico	V	
Silvana Ugo Alcaraz	1900746221	Laboratorio Clínico	V	
Olivero Lanche S.	1900592856	Lab. Clínico	V	

## Anexo 6

### Trípticos

**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 *Pseudomonas 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.



**CONCLUSIONES:**

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

- Evaluar la actividad antimicrobica 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.

- La viabilización se realizó con 0.5 ml de infusión cerebral corazon



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



- 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 45° C.

La molida 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 20°C para hexano, 40°C para etanol y 45°C para agua. El proceso se repetirá por tres ocasiones.



**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIMICROBICA**

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.

## Anexo 7

Formato de registro de resultados.

### PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIMICOTICA DE TRES EXTRACTOS (HEXANICO, ETANOLICO Y ACUSO) DE HOJAS DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA* (CHOLO VALIENTE).

**FECHA:**

**BACTERIA ATCC:**

	DILUCION	N°	MUESTRA (mm)	CONTROL POSITIVO (mm)	CONTROL NEGATIVO (mm)	SENSIBILIDAD	RESISTENCIA	OBSERVACIONES	RECOMENDACIONES	
<b>HEXANO</b>	<b>1/100</b>	1								
		2								
		3								
	<b>1/1000</b>	1								
		2								
		3								
	<b>1/10.000</b>	1								
		2								
		3								

**PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIMICOTICA DE TRES EXTRACTOS (HEXANICO, ETANOLICO Y ACUSO) DE HOJAS DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA* (CHOLO VALIENTE).**

**FECHA:**

**BACTERIA ATCC:**

	<b>DILUCION</b>	<b>N°</b>	<b>MUESTRA (mm)</b>	<b>CONTROL POSITIVO (mm)</b>	<b>CONTROL NEGATIVO (mm)</b>	<b>SENSIBILIDAD</b>	<b>RESISTENCIA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>
<b>ETANOL</b>	<b>1/100</b>	<b>1</b>							
		<b>2</b>							
		<b>3</b>							
	<b>1/1000</b>	<b>1</b>							
		<b>2</b>							
		<b>3</b>							
	<b>1/10.000</b>	<b>1</b>							
		<b>2</b>							
		<b>3</b>							

**PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIMICOTICA DE TRES EXTRACTOS (HEXANICO, ETANOLICO Y ACUSO) DE HOJAS DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA* (CHOLO VALIENTE).**

**FECHA:**

**BACTERIA ATCC:**

	DILUCION	N°	MUESTRA (mm)	CONTROL POSITIVO (mm)	CONTROL NEGATIVO (mm)	SENSIBILIDAD	RESISTENCIA	OBSERVACIONES	RECOMENDACIONES
<b>ACUOSO</b>	<b>1/100</b>	1							
		2							
		3							
	<b>1/1000</b>	1							
		2							
		3							
	<b>1/10.000</b>	1							
		2							
		3							

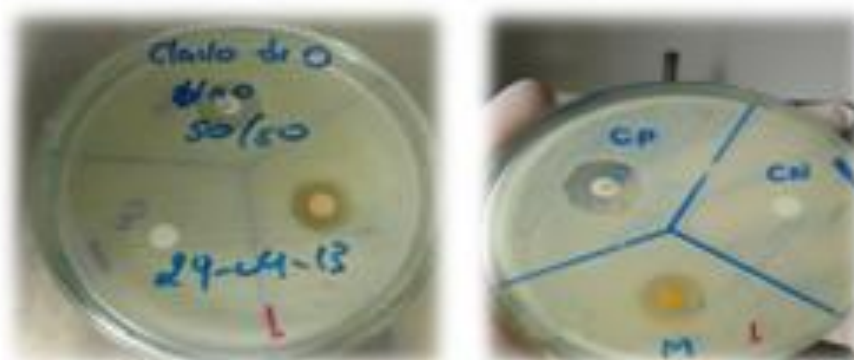
## Anexo 8

Fotografías de los procedimientos realizados  
ESTANDARIZACION DE PROCEDIMIENTOS: PRUEBA PILOTO  
CEPA JOVEN CONOCIDA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

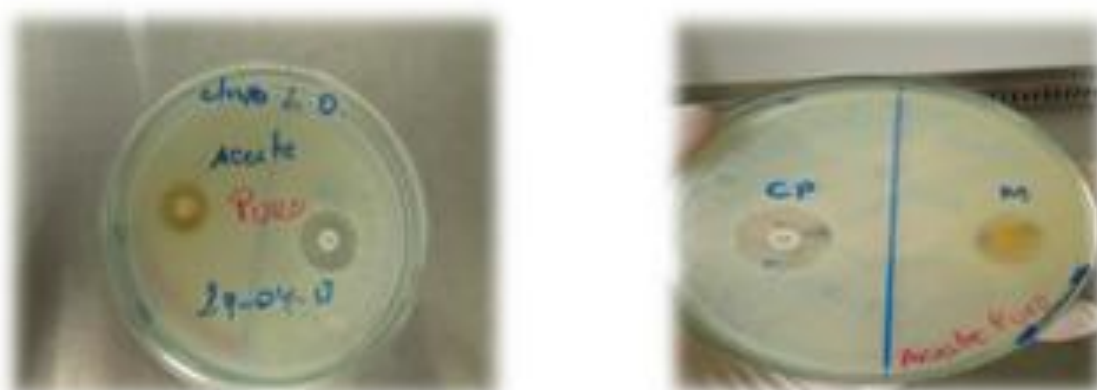
### VIABILIZACION DE CEPA



### ACEITE DE CLAVO DE OLOR 50/50



### ACEITE PURO DE CLAVO DE OLOR





PREPARACIONES DE DILUCIONES EN LA UNIDAD DE FITOQUIMICA DEL  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS DE LA UNL



RECOLECCION DE HOJAS



MOLIDA DE HOJAS



PESAJE DE HOJA



ROTOVAPOR



LIOFILIZACION

## PREPARACION DE SOLUCIONES

### HEXANO



### ETANOL



### AGUA



## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

LABORATORIO DE LA UNIDAD DE MICROBIOLOGIA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS DE LA UNL



PESAJE



HIDRATACION



DILUSION EN FUENTES DE CALOR



AUTOCLAVAR



VETIR EN CAJAS PETRI



MEDICION DE pH DE LOS MEDIOS

## VIBILIZACION DE CEPAS DE REFERENCIA

LABORATORIO DE LA UNIDAD DE MICROBIOLOGIA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS DE LA UNL

MATERIAL PREPARADO



CEPAS ESTANDARIZADAS ATCC



RECONSTITUCION CON 0.5 ml. DE CALDO DE INFUSION CEREBRO CORAZON



ROTULACION

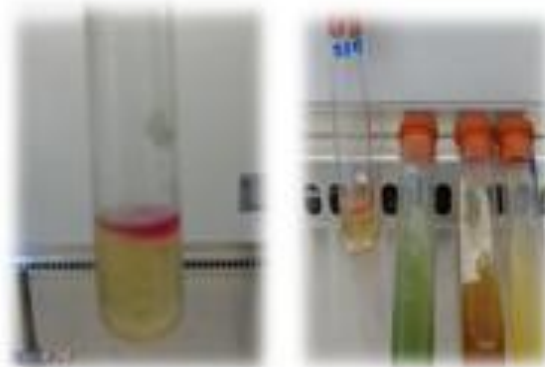
SEMBRAR EN MEDIOS DE CULTIVO



PRUEBAS PARA IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

LABORATORIO DE LA UNIDAD DE MICROBIOLOGIA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS DE LA UNL

PRUEBAS BIOQUIMICAS



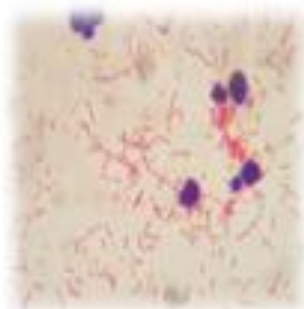
PRUEBA DE CATALASA

PRUEBA DE CUAGULASA



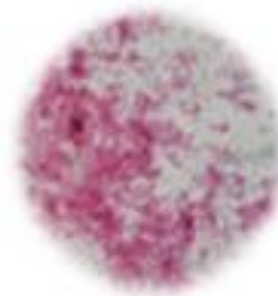
TINCION DE GRAM

KOH PARA HONGOS

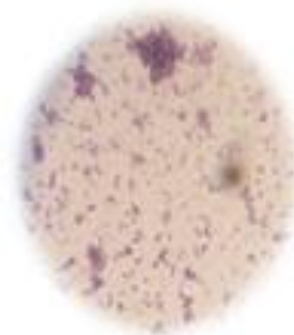


CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y MORFOLOGICAS DE MICROORGANISMOS VIALBILIZADOS

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS      CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS  
MEDIO DE MAC-CONKEY      ESCHERICHIA COLI



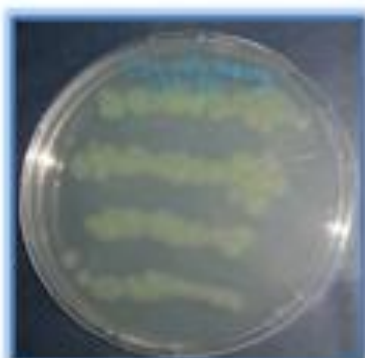
MEDIO DE CHAPMAN MANITOL      STAPHYLOCOCCUS AUREUS



MEDIO DE MAC-CONKEY      KLEBSIELLA PNEUMONIAE



MEDIO DE AGAR CETRIMIDE PSEUDOMONA AERUGINOSA



MEDIO DE AGAR SABOURAUD CANDIDA ALBICANS



LECTURA DE PLACAS



PREPARACION DE TUBO Nº 0.5 DE MF



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIMICOTICA POR EL METODO DE DIFUSION EN AGAR

MATERIAL EN UV



ROTULACION DE LAS CAJAS



REALIZACION DEL INOCULO

SELECCION DE COLONIAS



SUSPENDER EN SOLUCION SALINA



COMPARACION VISUAL TUBO N. 5 MEDIR LA TURBIDEZ OSCILAR ESCALA DE MACFARLAN 0.085 Y 0.10 NM







INOCULACION EN EL MEDIO



SELECCION Y COLOCACION

DE DISCOS EN MALLA DE PLASTICO



AGREGAR 20 UL A CADA DISCO



IMPREGNACION DE DISCOS



INCUBAR A 37° C

RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



ESCHERICHIA COLI



STAPHYLOCOCCUS AUREUS

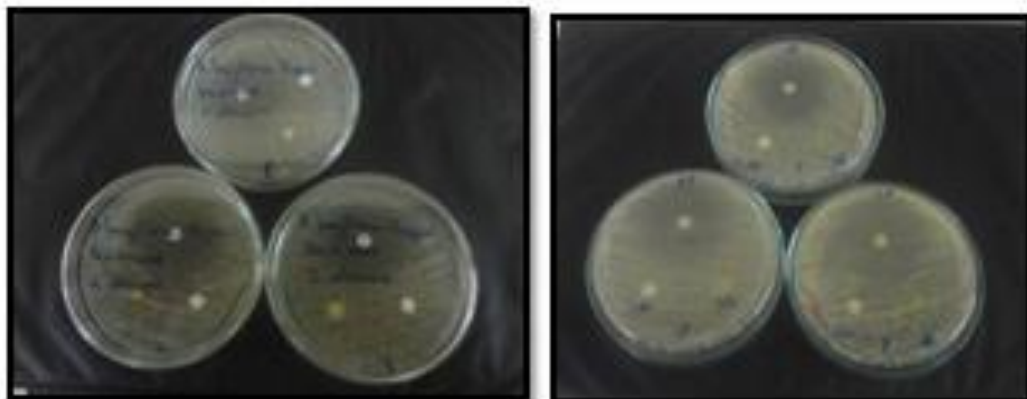


KLEBSIELLA PNEUMONIAE



PSEUDOMONA AERUGINOSA

## RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA



CANDIDA ALBICANS

## DIFUSION DE RESULTADOS

### ALUMNOS DEL II CICLO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO



### ALUMNOS DEL V MODULO DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO



**ANEXO N.- 9**

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO  
UNIDAD DE FITOQUÍMICA**

**POD-LF- 01**

- 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**

- Determinar de antemano las mejores condiciones para la colección de la parte de la planta (droga vegetal) a estudiar:
  - 1. 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.
  - 2. Flores:** Antes o durante la época de polinización.
  - 3. Frutos:** Generalmente cuando ya están de desarrollados o cuando están verdes o maduros.


4. **Semillas:** Cuando el fruto ya está maduro, antes de que expulse las semillas.
  5. **Corteza:** Cuando empiezan los proceso vegetativos, cuando hay más circulación de sabia.
  6. **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/registrarse 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.

**Responsable:** Dr. Luis Morocho.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO UNIDAD DE FITOQUÍMICA</b>	<b>POD-LF- 02</b>
---	---	-------------------

**1. TITULO: OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON ETANOL, HEXANO Y AGUA 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) Dejar reposar por al menos 48 horas, agitando de vez en cuando.
- d) Transcurrido el tiempo indicado, cubrir la boca del recipiente con una gasa y filtrar por papel filtro en un Erlenmeyer de capacidad adecuada. Una vez filtrado todo el extracto obtenido proceder a concentrarlo en el 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 al menos 4 horas y retomar el proceso de concentración. Repetir este procedimiento hasta agotamiento (hasta cuando el extracto es casi del color del solvente usado).

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

**Responsable:** Dr. Luis Morocho.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO</b> <b>UNIDAD DE FITOQUÍMICA</b>	<b>POD-LF- 03</b>
---	---	-------------------

**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.



- 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 aire 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  $\frac{1}{2}$  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  $\frac{1}{2}$  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.

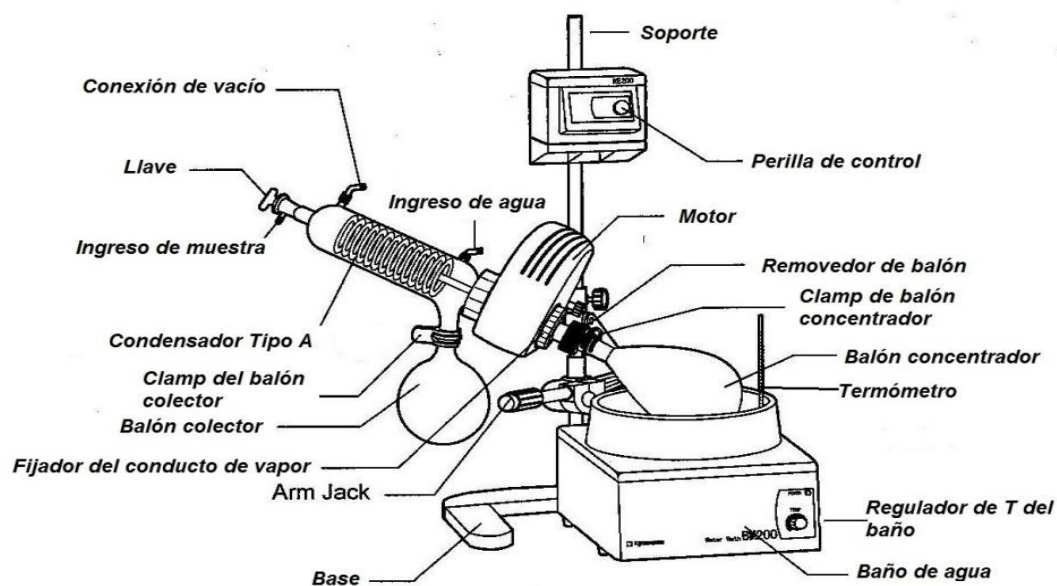
**NOTA:** Mientras realiza esta actividad, con la mano derecha sostenga firmemente el balón concentrador.

**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.

## 5.- DIAGRAMA/ANEXOS

*Rotavapor YAMATO RE200 (tipo A)*




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

**Responsables:** Dr. Luis Morocho.

**ANEXO N.- 10**

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

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-NB</b>  <b>UNL.- 001</b>
---	---	--------------------------------------

**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 todas las personas involucradas.

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<p align="center"><b>Normas de Bioseguridad para el Laboratorio de microbiología</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El acceso al laboratorio estará limitado solo al personal autorizado.</li> <li>- En la zona de laboratorio no se permitirá comer, guardar alimentos, beber, fumar, ni usar cosméticos.</li> <li>- Las superficies de trabajo se deben descontaminar antes y después de cada jornada de trabajo y siempre que haya un derrame.</li> <li>- Utilizar cabina de bioseguridad biológica, no olvidar encender la lámpara y el flujo antes de abrir la ventana.</li> <li>- Colocar el símbolo de riesgo biológico en las áreas biocontaminadas.</li> <li>- No guardar alimentos en las neveras ni en los equipos de refrigeración de trabajo deben ser confortables.</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- El transporte de las muestras dentro o entre laboratorios se realizará en cajas herméticas, para evitar que se produzcan salpicaduras.</li> <li>- Todos los cultivos se autoclavan antes de ser eliminados.</li> <li>- Todos los desechos biológicos ya sean líquidos o sólidos deben ser descontaminados antes de eliminarlos.</li> </ul>
2	<p style="text-align: center;"><b>Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos. Evitar distracciones.</li> <li>- 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.</li> <li>- Nunca se pipeteará con la boca.</li> <li>- Todo el personal se lavará las manos al ingresar al laboratorio y después de haber manipulado material y al salir del laboratorio.</li> <li>- Quitarse los guantes para utilizar equipos o instrumentos no contaminados como teléfonos, computadoras, y material de escritorio</li> <li>- Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito.</li> <li>- El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido.</li> <li>- Emplee mascarilla y protectores oculares durante procedimientos que salpicaduras, aerosoles o derrames importantes de sangre u otros líquidos orgánicos.</li> <li>- Absténgase de tocar con las manos enguantadas alguna parte de su cuerpo puedan generar salpicaduras o gotitas aerosoles de sangre u otros líquidos corporales.</li> <li>- Evite la atención directa de pacientes si usted presenta lesiones exudativas o curitas.</li> <li>- Mantenga actualizado su esquema de vacunación contra Hepatitis B.</li> </ul>


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf); consultado el 20 de Abril Del 2013.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-AS</b>  <b>UNL-002</b>
---	---	------------------------------------

**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 rodófitas. 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 8° 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	<b>Lectura de las indicaciones</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
2	<b>Pesaje</b>	<p>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</p>

		necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
<b>3</b>	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor</b>	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.
<b>4</b>	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	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.
<b>5</b>	<b>Colocación de la sangre humana desfibrinada</b>	Enfriar el medio de cultivo preparado hasta la temperatura entre 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5% y homogenizar.
<b>6</b>	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación.</b>	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.
<b>7</b>	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	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 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
<b>8</b>	<b>Almacenamiento y conservación</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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](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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-MC</b>  <b>UNL-003</b>
---	---	------------------------------------

**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 mucilaginoso amorfa que se extrae de algunas algas rojas o rodófitas. 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 enterobacterias, 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 ácido. 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 8° 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 <b>Mac-Conkey</b> (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.
		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

<b>2</b>	<b>Pesaje</b>	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.
<b>3</b>	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor</b>	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.
<b>4</b>	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	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.
<b>5</b>	<b>Distribución del medio de cultivo y sodificación.</b>	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.
<b>6</b>	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	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 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
<b>7</b>	<b>Almacenamiento y conservación</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-AMH</b>  <b>UNL-004</b>
---	---	-------------------------------------

**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 °C) 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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor.</b>	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	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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.
		Colocar 5ml de medio de cultivo en un tubo de

5	<b>Medición del pH.</b>	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 (25°C).
6	<b>Distribución del medio de cultivo y sodificación.</b>	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	<b>Control de calidad del medio de cultivo.</b>	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 35°-37°C 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	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, 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 Montaña. Año 2010.


**Actualizado por:** Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narvárez 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](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. 1<sup>ra</sup> Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3<sup>ra</sup> 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/imagenes/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-ACM</b>  <b>UNL-005</b>
---	---	-------------------------------------

**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 8° 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	<b>Lectura de las indicaciones</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
		Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la

2	<b>Pesaje</b>	<p>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.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor</b>	<p>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.</p>
4	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	<p>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.</p> <p>Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.</p>
5	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación.</b>	<p>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.</p>
6	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	<p>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 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.</p>
7	<b>Almacenamiento y conservación</b>	<p>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.</p> <p>Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.</p>


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-AC UNL-06</b>
---	---	-------------------------

**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 rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 promueve tanto la producción de la pirocianina 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 (cetrímide) 0,3 g, Glicerina 10,0 mL, Agua destilada 1.000 mL, pH final  $7,2 \pm 0,2$ .

**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 8° 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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Cetrímide (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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor.</b>	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	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo y sodificación</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubadora bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PR-CTS  
UNL- 007

**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 rodófitas, 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 a 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 8° 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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor.</b>	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	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1<sup>ra</sup> Edición. Marzo 1995. Pág. 37, 38.
6. Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3<sup>ra</sup> 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%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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-ATS- UNL-008</b>
---	---	----------------------------

**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 mucilaginoso que se extrae de algunas algas rojas o rodófitas, 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 8° 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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Triptona de Soja (Casa Comercial 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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través</b>	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la

	<b>de una plancha de calor.</b>	fuentes de calor.
<b>4</b>	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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.
<b>5</b>	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación</b>	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 selladas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
<b>6</b>	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
<b>7</b>	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	Empaquetar los medios de cultivo con papel aluminio, no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1<sup>ra</sup> Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
6. Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3<sup>ra</sup> 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%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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-ADS-UNL-009</b>
---	---	-----------------------

**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 mucilaginoso que se extrae de algunas algas rojas o rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 8° 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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor.</b>	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	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo y sodificación</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PR-AICC  
UNL.- 010

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 rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 8° 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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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. <sup>9,2i</sup>
3	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	La preparación debe hervir hasta que tome un aspecto transparente. Evitar que se derrame.
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1<sup>ra</sup> Edición. Marzo 1995. Pág. 28, 29, 37, 39 y 45.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3<sup>ra</sup> 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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-MCS</b>  <b>UNL-011</b>
---	---	-------------------------------------

**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 mucilaginososa que se extrae de algunas algas rojas o rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 además 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 8° 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 8°C.

**5. METODOLOGÍA:** Lapreparación 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	<b>Lectura de las indicaciones</b>	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	<b>Pesaje</b>	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.
<b>3</b>	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor</b>	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.
<b>4</b>	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	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.
<b>5</b>	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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.
<b>6</b>	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	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 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
<b>7</b>	<b>Almacenamiento y conservación</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.
<b>8</b>	<b>Método de inoculación en el medio.</b>	Sembrar: punción y estría en pico de flauta con un pequeña colonia de crecimiento del microorganismo.
<b>9</b>	<b>Incubación del medio</b>	Colocar en incubación de 35 a 37°C por 24 horas.
<b>10</b>	<b>Lectura de resultados</b>	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 Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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.
- Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Editorial medica panamericana. 6ª edición. Argentina 2008. Pag 64, 217
- Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria del Instituto Catalán de la Salud. Volumen II. 1ª edición. Marzo 2006. Pags 189-190
- Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial medica panamericana. 3ª edición. Madrid 2003
- Tortora B. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9ª edición. Madrid 2007. Pag 139

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-MTSI</b>  <b>UNL-012</b>
---	---	--------------------------------------

**1. TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO TRIPLE AZÚCAR 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 mucilaginoso que se extrae de algunas algas rojas o rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 además 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<sub>2</sub>S). 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<sub>2</sub>S, respectivamente. La formación de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>S 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 8° 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 8°C.

**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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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.
<b>3</b>	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	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.
<b>4</b>	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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.
<b>5</b>	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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.
<b>6</b>	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
<b>7</b>	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.
<b>8</b>	<b>Método de inoculación en el medio.</b>	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.
<b>9</b>	<b>Incubación del medio</b>	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35 °C en aerobiosis por un tiempo de 18 a 24 horas.
<b>10</b>	<b>Lectura de resultados</b>	<p>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.</p> <p>Agar inclinado ácido/fondo ácido (A/A)= fermentador de la glucosa, la sacarosa o la lactosa.</p> <p>La formación de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> es indicada por la presencia de burbujas o grietas en el agar.</p> <p>La producción de H<sub>2</sub>S se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.</p>

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-MTSI</b>  <b>UNL-012</b>
---	---	--------------------------------------

**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 mucilaginoso que se extrae de algunas algas rojas o rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 además 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 desdoblarse 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 8° 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 8°C.

**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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	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	<b>Esterilización del medio de</b>	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.

	<b>cultivo.</b>	Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
<b>5</b>	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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.
<b>6</b>	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
<b>7</b>	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.
<b>8</b>	<b>Procedimiento de inoculación en el medio.</b>	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.
<b>9</b>	<b>Incubación del medio.</b>	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35-37 °C en aerobiosis por un tiempo de 24 a 48 horas.
<b>10</b>	<b>Lectura de resultados.</b>	<b>Ácido sulfhídrico</b> Positivo: ennegrecimiento del medio Negativo: sin ennegrecimiento. <b>Indol</b> (añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs). Positivo: anillo rojo en la superficie del medio. Negativa: no se produce color. <b>Movilidad</b> 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 de siembra.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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.



	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-MFD UNL- 014</b>
---	---	----------------------------

**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 rodófitas, 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 además 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 8° 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 8°C.

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	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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.
<b>3</b>	<b>Disolución del polvo a través de una plancha de calor.</b>	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.
<b>4</b>	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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.
<b>5</b>	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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.
<b>6</b>	<b>Control de calidad</b>	Realizar el control de calidad retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
<b>7</b>	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.
<b>8</b>	<b>Procedimiento de inoculación en el medio.</b>	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Sembrar con asa por agotamiento, estriando la superficie del medio.
<b>9</b>	<b>Incubación del medio</b>	Se deja la tapa floja y se Incuba de 18 a 24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.
		El análisis de los resultados debe realizarse dentro de los primeros 5 minutos. <b>Positivo:</b> desarrollo de color verde pálido a

<b>10</b>	<b>Lectura de resultados</b>	<p>intenso en el pico de flauta y en el líquido de condensación.</p> <p><b>Negativo:</b> sin cambios de color. El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.</p>
-----------	------------------------------	--


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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/ClaseProcariotes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%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](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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-PC- UNL.-015</b>
---	---	----------------------------

**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 hidrógeno, 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	<b>Preparación del material.</b>	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	<b>Suspensión de la cepa.</b>	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	<b>Interpretación del resultado.</b>	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

		<p>hidrógeno.</p> <p>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 <i>estafilococos</i> son positivos para catalasa, mientras que los <i>estreptococos</i> y los <i>enterococos</i> son negativos.</p>
--	--	--

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA**

**PR-PO-  
UNL.- 016**

**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 *Staphylococcus aureus*, que es coagulasa positivo, del resto de especies de *Staphylococcus* 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 37°C 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	Coagulasa positiva: formación del coagulo.


	<b>resultado.</b>	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. 3<sup>ra</sup> Edición. Editorial MASSON S.A. Año 2005. Pág 195-208.
- John Bernard Henry. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Parte VI Microbiología Médica. 9<sup>a</sup> Edición. Editorial Masson-Salvat Medicina. Pág.1070.



	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-PIM</b>  <b>UNL-017</b>
---	---	-------------------------------------

**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	<i>Cándida albicans</i> : células ovals 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. 11<sup>a</sup> edición. Madrid 2007 Pág. 821

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-PTG-</b> <b>UNL-018</b>
---	---	----------------------------------

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 mecherode 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	<b>Preparación del frotis.</b>	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	<b>Tinción de Gram.</b>	La tinción de Gram requiere la utilización de cuatro soluciones en el siguiente orden:
	<b>2.1. Primer colorante.</b>	Cubrir el frotis con cristal violeta dejando que el colorante actúe por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar escurrir.
	<b>2.2. solución mordiente</b>	Cubrir el frotis con solución de lugol dejando que el colorante actúe por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
	<b>2.3. Agente decolorante</b>	Cubrir el frotis con alcohol cetona por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
	<b>2.4. Colorante de contraste</b>	Cubrir el frotis con solución de Safranina dejando que el colorante actúe 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 Narvárez 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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-PTF- UNL- 019</b>
---	---	-----------------------------

**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 *Candidaalbicans*.

**6. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Suspensión del inóculo.</b>	Colocar un inóculo muy pequeño de una colonia aislada en 0,5 ml de suero.
2	<b>Incubación</b>	Incubar de 35 a 37°C durante no más de 3 horas.
3	<b>Observación microscópica</b>	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.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PR-PN5-MF  
UNL.-020

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

**2 OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del Patrón N°. 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 escalade 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  $1.5 \times 10^8$  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:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO								
1	<b>Preparación del material.</b>	En una gradilla disponer de un tubo de ensayo de 10ml totalmente estéril, rotularlo.								
2	<b>Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla N.- 1.</b>	<p>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:</p> <p>Tabla N.- 1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tubo N.</th> <th>Cl<sub>2</sub>Ba (1%)</th> <th>SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> (1%)</th> <th>U.F.C/m l</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>0.5</td> <td>99.5</td> <td>1.5x10<sup>8</sup></td> </tr> </tbody> </table>	Tubo N.	Cl <sub>2</sub> Ba (1%)	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> (1%)	U.F.C/m l	5	0.5	99.5	1.5x10 <sup>8</sup>
Tubo N.	Cl <sub>2</sub> Ba (1%)	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> (1%)	U.F.C/m l							
5	0.5	99.5	1.5x10 <sup>8</sup>							
3	<b>Calibración del Patrón N. 5 de Mc Farland por espectrofotometría.</b>	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.								
4	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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.								

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. 3<sup>ra</sup> 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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA**

**PR-IN-  
UNL.-021**

**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 ° C.

**5 METODOLOGÍA:** El inóculo se prepara por suspensión de las cepas en solución salina, equivalente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland ( $10^8$  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


2	<b>Suspensión de la cepa en la solución salina.</b>	contaminaciones. 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	<b>Estandarización visual de la turbidez del inóculo.</b>	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	<b>Verificar la turbidez de la suspensión a través de un espectrofotómetro.</b>	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. 3<sup>ra</sup> 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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-VSA-</b> <b>UNL-022</b>
---	---	----------------------------------

**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	<b>Obtención de la <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	<b>Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 Cultivo primario</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <b><i>S. aureus</i></b>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos.</li> <li>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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Chapman manitol inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	<b>Obtención del cultivo secundario de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	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 <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> . Incubar a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.

4	<b>Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</b>	<p>El Control de Calidad de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>S. aureus</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b></p> <p>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.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b></p> <p><b>Tinción de Gram:</b> cocos Gram positivos, dispuestos en pares, tétradas o racimos, con morfología celular redonda.</p> <p><b>Pruebas bioquímicas:</b></p> <p><b>Catalasa:</b> Positivo</p> <p><b>Coagulasa:</b> Positivo</p>
---	---	---


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. 1<sup>ra</sup> Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
- Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
- Benintende, S., "Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Cecilia [http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf)) 27 noviembre del 2011.
- Murray, P.R. Microbiología médica. 6ta Ed. Editorial ElsevierMosby. España 2009. Pág. 220
- Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18<sup>a</sup> edición. Editorial el Manual 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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-VEC-</b> <b>UNL-023</b>
---	---	----------------------------------

**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 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	Recuperación de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Cultivo primario	<p>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</p> <p>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <i>E. coli</i>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos.</p> <p>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.</p> <p>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</p>
3	Obtención del cultivo secundario de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<p>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 <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Incubar a 37°C durante 24 horas.</p> <p>Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.</p>
4	Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados	<p>El Control de Calidad de <i>Escherichia coli</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>E. coli</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b></p> <p>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.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b></p>

		<p><b>Tinción de Gram:</b> bacilos cortos Gram negativos.</p> <p><b>Pruebas bioquímicas:</b></p> <p><b>TSI:</b> A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-)</p> <p><b>SIM:</b> Movilidad (+), Indol (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-)</p> <p><b>Citrato:</b> Negativo</p> <p><b>Lisina:</b> Positivo</p> <p><b>Fenilalanina:</b> Negativo</p> <p><b>Urea:</b> Negativo</p>
--	--	--

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. 1<sup>ra</sup> 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" (Cecilia [http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](http://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. 18<sup>a</sup> edición. Editorial el Manual Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Perez "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.



	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-VKP- UNL-024</b>
---	---	----------------------------

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	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	Recuperación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 Cultivo primario	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <i>K. pneumoniae</i>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos.</li> <li>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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	Obtención del cultivo secundario de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 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 <i>Klebsiella pneumoniae</i> Incubar a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
		El Control de Calidad de <i>Klebsiella pneumoniae</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>K. pneumoniae</i> .

<b>4</b>	<b>Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</b>	<p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b> 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.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b> <b>Tinción de Gram:</b> bacilos largos Gram negativos.</p> <p><b>Pruebas bioquímicas:</b> <b>TSI:</b> A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) <b>SIM:</b> Movilidad (-), Indol (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) <b>Citrato:</b> Positivo <b>Lisina:</b> Positivo <b>Urea:</b> Positivo <b>Catalasa:</b> Positivo</p>
----------	---	--


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. 1<sup>ra</sup> 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" (Cecilia [http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](http://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 HarwoodAcademicPublishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
6. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18<sup>a</sup> edición. Editorial el Manual Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo IzquietaPerez "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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-VPA- UNL-025</b>
---	---	----------------------------

**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	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27653	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	Recuperación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27653 Cultivo primario	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <i>P. aeruginosa</i>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos.</li> <li>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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Cetrimide inoculado, a 37° - 42° C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	Obtención del cultivo secundario de <i>Pseudomona aeruginosa</i> 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 <i>Pseudomona aeruginosa</i> . Incubar a 37°C – 42°C durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
		El Control de Calidad de <i>Pseudomona</i>

4	Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados	<p><b><i>aeruginosa</i></b> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>P. aeruginosa</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b> Grandes, redondas, bordes irregulares, mucoides, produce un olor dulzón semejante al jugo de uva o de maíz, de color verde fluorescente. <i>P. aeruginosa</i> también produce el pigmento fluorescente pio verdina que confiere el color verdoso al medio.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b> <b>Tinción de Gram:</b> bacilos delgados cortos Gram negativos dispuestos en pares y en cadenas.</p> <p><b>Pruebas bioquímicas:</b> <b>TSI:</b> K/A fermentador de glucosa ; Producción de Gas (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) <b>SIM:</b> Movilidad (+), Indol (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) <b>Citrato:</b> Positivo <b>Urea:</b> Negativo <b>Catalasa:</b> Positivo <b>Oxidasa:</b> Positivo <b>Fenilalanina:</b> Negativo</p>
---	--	---

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. 1<sup>ra</sup> 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" (Cecilia [http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](http://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. 18<sup>a</sup> edición. Editorial el Manual 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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-VCA- UNL-026</b>
---	---	----------------------------

**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	<i>Cándida albicans</i> ATCC 26790	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentra de



		positiva en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC).
2	<b>Recuperación de <i>Cándida albicans</i> ATCC 26790 Cultivo primario</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <b><i>C. albicans</i></b>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos.</li> <li>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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Sabouraud inoculado, a 37° - 42° C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	<b>Obtención del cultivo secundario de <i>Cándida albicans</i> ATCC 26790</b>	<p>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 <b><i>Cándida albicans</i></b>.</p> <p>Incubar a 37°C – 42°C durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo</p> <p>.</p>
4	<b>Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</b>	<p>El Control de Calidad de <b><i>Cándida albicans</i></b> 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 <i>C. albicans</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b> Pequeñas, redondas, bordes enteros, aspecto cremoso, mucoides, y de color blanco.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b> <b>Hidróxido de potasio (KOH):</b> esporas y levaduras aisladas y en gemación.</p> <p><b>Otras pruebas:</b> <b>Test de filamentación:</b> Presencia de tubo germinal a las 2 horas.</p>

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. 1<sup>ra</sup> 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" (Cecilia [http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](http://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. 9<sup>na</sup> edición. Madrid 2007. Págs. 346-347.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo IzquietaPerez "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.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PR-PDS-  
UNL- 027

**1. TITULO: PREPARACION DE DISCOS DE SENSIBILIDAD CON ETANOL**

**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 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-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	<b>Obtención de los discos.</b>	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN N° 3 de 6 mm de diámetro.

2	<b>Esterilización de los discos.</b>	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	<b>Impregnación del extracto. Vegetal.</b>	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	<b>Elaboración de controles negativos.</b>	Colocar un disco de papel filtro WHATMAN N° 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	<b>Controles positivos.</b>	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.


**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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/centredopatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo\\_patentesextractosplantas.pdf](http://www.pcb.ub.edu/centredopatents/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](http://www.t3quimica.com/pdfs/49i_etanol.pdf)
- Obregón G. RevMedExp 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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-PDS- UNL- 028</b>
---	---	-----------------------------

**1. TITULO: PREPARACION DE DISCOS DE SENSIBILIDAD CON HEXANO**

**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<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.

**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	<b>Obtención de los discos.</b>	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN N° 3 de 6 mm de diámetro.
2	<b>Esterilización de los discos.</b>	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.
<b>3</b>	<b>Impregnación del extracto. Vegetal.</b>	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.
<b>4</b>	<b>Elaboración de controles negativos.</b>	Colocar un disco de papel filtro WHATMAN N° 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.
<b>5</b>	<b>Controles positivos.</b>	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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](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](http://www.t3quimica.com/pdfs/49i_etanol.pdf)
- Obregón G. RevMedExp 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PR-PDS-  
UNL- 029

1. **TITULO: PREPARACION DE DISCOS DE SENSIBILIDAD CON AGUA**

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 H<sub>2</sub>O. 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	<b>Obtención de los discos.</b>	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN N° 3 de 6 mm de diámetro.
2	<b>Esterilización de los discos.</b>	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.
<b>3</b>	<b>Impregnación del extracto. Vegetal.</b>	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.
<b>4</b>	<b>Elaboración de controles negativos.</b>	Colocar un disco de papel filtro WHATMAN N° 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.
<b>5</b>	<b>Controles positivos.</b>	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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/centrepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo\\_patentesextractosplantas.pdf](http://www.pcb.ub.edu/centrepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo_patentesextractosplantas.pdf)
- Significado de etanol, [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: [http://www.t3quimica.com/pdfs/49j\\_etanol.pdf](http://www.t3quimica.com/pdfs/49j_etanol.pdf)
- Obregón G. RevMedExp 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.



	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-EAA- UNL-030</b>
---	---	----------------------------

**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	<b>Inoculación de las placas.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente.</li> <li>- Rotular los medios de cultivo.</li> <li>- Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inóculo (protocolo N° 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.</li> <li>- Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton (protocolo N° 10), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.</li> <li>- 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).</li> </ul>
2	<b>Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo N° 18), sobre la superficie inoculada del agar.</li> <li>- Realizar por triplicado en la misma caja.</li> <li>- Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.</li> </ul> <p>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.</p> <p>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.</p>


3	<b>Incubación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35°C ± 2°C (las temperaturas de &gt;35°C pueden impedir la detección de estafilococos a meticilina) antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos.</li> <li>- 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.</li> </ul>
4	<b>Lectura de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura.</li> <li>- Las placas se examinan después de 18 a 24 horas de incubación.</li> <li>- Si la placa se estrió como corresponde y el inóculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluyente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares.</li> <li>- Si se observan colonias aisladas, significa que el inóculo estaba diluido y la prueba debe repetirse.</li> <li>- Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.</li> </ul>
5	<b>Interpretación de resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- &lt; 6mm Negativo (Resistente)</li> <li>- 6 – 9 mm Intermedio</li> <li>- &gt; 9mm Positivo (Sensible).</li> </ul>

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. RevMedExp 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. 3ª Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 122-124.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-EAA- UNL-031</b>
---	---	----------------------------

**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.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente.</li> <li>- Rotular los medios de cultivo.</li> <li>- Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo (protocolo N° 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.</li> <li>- Inocular la superficie seca de una placa de agar Sabouraud (protocolo N° 8), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.</li> <li>- 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).</li> </ul>


2	<b>Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo N° 18), sobre la superficie inoculada del agar.</li> <li>- Realizar por triplicado en la misma caja.</li> <li>- Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.</li> <li>- 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.</li> <li>- 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.</li> </ul>
3	<b>Incubación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35°C ± 2°C antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos.</li> <li>- 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.</li> </ul>
4	<b>Lectura de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura.</li> <li>- Las placas se examinan después de 48 horas de incubación.</li> <li>- Si la placa se estrió como corresponde y el inóculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluyente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares.</li> <li>- Si se observan colonias aisladas, significa que el inóculo estaba diluido y la prueba debe repetirse.</li> <li>- Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.</li> </ul>
5	<b>Interpretación de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- &lt; 6mm Negativo (Resistente)</li> <li>- 6 – 9 mm&lt; Intermedio</li> <li>- &gt; 9mm Positivo (Sensible).</li> </ul>

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. RevMedExp 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. 3ª 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.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-PCMI- UNL-032</b>
---	---	-----------------------------

**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 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.

**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	<b>Dilución del inóculo.</b>	Se prepara el inóculo con las cepas en solución salina a una concentración similar al patrón 0.5 de la escala de MacFarland.
2	<b>Preparación de subdiluciones.</b>	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	<b>Preparación de las muestras.</b>	En la diluciones anteriores se colocan en los 8 tubos 1ml del inóculo.
4	<b>Incubación.</b>	Se incuba 24 horas a 37°C.
5	<b>Lectura de resultados.</b>	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 Montaña. 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. 3<sup>ra</sup> Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 121.
- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 49 – 53.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO</b> <b>UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA</b>	<b>PR-PCMB-</b> <b>UNL-033</b>
---	---	-----------------------------------

**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 inculo 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:**

<b>ITEM</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>
<b>1</b>	<b>Obtención de resultado del CMI</b>	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.
<b>2</b>	<b>Sembrado</b>	Se realizan siembras a partir de los resultados del CMI en Agar MullerHinton 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.
<b>3</b>	<b>Incubación.</b>	Luego de sembrar en los agares se debe incubar a una temperatura de 37°C por 24 horas y observar los resultados.

**Elaborado por:** Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Tania León, Karla Montalvo y Diana Montaña. 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. 3<sup>ra</sup> Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 121.
- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 49 – 53.

## 11.INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	ii
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	iv
1. TITULO.....	7
2. RESUMEN: SUMMARY O ABSTRACT.....	8
3. INTRODUCCION.....	10
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
6. RESULTADOS.....	55
7. DISCUSIÓN.....	60
8. CONCLUSIONES.....	62
9. RECOMENDACIONES.....	63
10.BIBLIOGRAFÍA.....	64
11.ANEXOS.....	69
12.INDICE.....	212