UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

Evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de tres extractos de la raíz 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:

Castillo Rojas Jhon Fernando

DIRECTOR:

Lic. Mg. Glenda Rodríguez León

LOJA- ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN DEL DOCENTE DIRECTOR

Lic. Mg. Glenda Rodríguez León.

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 la raíz de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar.", elaborado por el Sr. Castillo Rojas Jhon Fernando 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.

Lic. Mg. Glenda Rodríguez León.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Jhon Fernando Castillo Rojas declaro ser autor 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: Jhon Fernando Castillo Rojas

Firma:.....

Cédula: 010467920-4

Fecha: 27 de enero de 2014

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

Yo, **Jhon Fernando Castillo Rojas** declaro ser autor de la tesis titulada **"Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de tres extractos de la raíz 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 24 días del mes de noviembre del dos mil trece.

Firma.....

Autor: Jhon Fernando castillo Rojas
C.I. 010467920-4

Dirección: Barrio "Los Rosales". Calles: Ramón del Valle y Rosario Castellanos (Loja – Ecuador).

Correo electrónico: jhoncamot@hotmail.com. Teléfono: (07) 2 583 – 844.
Celular: 0 985 401 215

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director de tesis: Lic. Mg. Glenda Rodríguez León

Tribunal de grado: Presidente: Dr. Tito Carrión Dávila

Vocal: Dra. Susana González García

Vocal: Dr. Hector Velepucha Velepucha

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Papá y mamá

AGRADECIMIENTO

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en todo mi periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mi familia por el esfuerzo realizado por ellos. El apoyo en mis estudios, de ser así no hubiese sido posible. A mis padres y demás familiares ya que me brindan el apoyo, la alegría y me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis, Lic. Mg. Glenda Rodríguez León, por la colaboración, paciencia, apoyo y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre.

EL AUTOR

1. TÍTULO

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

2. RESUMEN

La presente investigación “Evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de tres extractos de la raíz de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar” se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica y de Microbiología del Centro de Análisis Químicos de la Universidad Nacional de Loja.

La especie vegetal *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente) fue recolectada en la Parroquia Limones, Cantón Zamora de la Provincia de Zamora Chinchipe, lugar en donde se usa las hojas de la especie vegetal mencionada para el tratamiento de heridas causadas por *Leishmania spp*.

El objetivo fundamental de la investigación fue evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica de la raíz de *Hippobroma longiflora,* para lo cual se obtuvieron los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la parte mencionada, preparándose diluciones 1/100,1/1.000,1/10.000 utilizando los solventes hexano, etanol y agua para cada extracto. Las diluciones fueron impregnadas en discos de papel Whatman Nº3 con 20 ul, los cuales fueron colocados en placas con medio de Muller Hinton previamente inoculados con las cepas ATCC *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), *Klebsiella pneumoniae* (13883), *Pseudomona aeruginosa* (27853), *y Cándida albicans* (26790); conjuntamente con discos para controles positivo y negativo. Se utilizó el método de difusión en agar con disco por lo cual luego de 24 horas de incubación se procedió a la lectura de los halos de inhibición.

Se concluyó en este estudio que los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* en las diluciones 1/100,1/1.000,1/10.000 no presentan inhibicion del crecimiento de las cepas ATCC probadas utilizando el método de difusión en agar con disco.

Palabras clave: *Hippobroma longiflora,* método de difusión en agar con disco, actividad antibacteriana y antifúngica.

SUMMARY

This research "Evaluation of the antimicrobial and antifungal activity of three extracts from the root of *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (brave Cholo) by the agar diffusion method " was performed at the Laboratory of Microbiology of Phytochemistry and Chemical Analysis Center of the National University of Loja.

The plant species Hippobroma longiflora (L.) G. Don (brave Cholo) was collected on the lemons, Canton Province of Zamora Zamora Chinchipe, a place where the leaves of the plant species mentioned for the treatment of wounds caused by Leishmania spp Parish used .

The fundamental objective of the research was to evaluate the antibacterial and antifungal activity of root Hippobroma longiflora , for which the hexane , ethanolic and aqueous extracts were obtained part mentioned , preparing dilutions of 1 /100, 1/1000th 1:10,000 using the hexane solvent , ethanol and water for each extract . Dilutions were impregnated paper discs Whatman No3 with 20ul, which were placed on media plates Muller Hinton previously inoculated with the strains ATCC Escherichia coli (25922) , Staphylococcus aureus (25923) , Klebsiella pneumoniae (13883) , Pseudomonas aeruginosa (27853) , and Candida albicans (26790), together with discs for positive and negative controls. Diffusion method was used in agar disk so after 24 hours of incubation proceeded to the reading of the zones of inhibition .

It was concluded in this study that the hexane , ethanolic and aqueous extracts of the root of Hippobroma longiflora in dilutions of 1 /100, 1/1000th 1:10,000 not show inhibition of growth of ATCC strains tested using the agar diffusion method with disk.

Keywords: *Hippobroma longiflora,* agar diffusion method with disco, antibacterial and antifungal activity.

3. INTRODUCCIÓN

La presente investigación que tiene por tema “Evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de tres extractos de la raíz de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar”, ha sido desarrollada en la provincia de Zamora Chinchipe cantón Zamora.

La provincia de Zamora Chinchipe posee una gran variedad de plantas medicinales, destacándose 60 especies divididas en 38 familias, por lo cual se decidió realizar el presente trabajo de investigación en esta área al poseer escasos estudios fitoquímicos y de sensibilidad y un extenso número de plantas **(1).**

En la provincia de Zamora Chinchipe, cantón Zamora lugar de la zona de estudio, la situación socio-económica de acuerdo a las estadísticas muestran que los índices promedio de pobreza son de 18.3 % y la extrema pobreza es de 3.3 %. En las parroquias los índices analizados más altos se ubican en Timbara con el 38.8% de pobreza y extrema pobreza 8%. El promedio de necesidades básicas insatisfechas[1] (NBI) es de 64.4%, destacándose la parroquia Imbana con el 93.5 % de NBI, ubicándose como la parroquia más pobre del cantón**.** La situación socio-económica que atraviesa la población junto con la falta de servicios de salud (el 95% de los barrios del cantón Zamora no poseen puestos de salud)[2] provoca que la mayoría de la población opte por la medicina tradicional como fuente de salud, utilizando para ello las plantas medicinales del sector, constituyéndose en una zona rica en conocimientos ancestrales de alto potencial científico **(2).**

El Ecuador cuenta con alrededor de 17.000 tipos de plantas de las cuales 3118 especies son usadas con fines medicinales por la población. Las plantas medicinales poseen principios activos, sustancias que tiene una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad es

[1]Indicador directamente relacionado con cuatro áreas de necesidades básicas de las personas (vivienda, servicios sanitarios, educación básica e ingreso mínimo), disponibles en los censos de población y vivienda.
[2]Fuente: Departamento provincial de salud de Zamora

servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud pérdida **(3).**

La falta de reconocimiento a la medicina tradicional y consecuentemente a las plantas medicinales por la adopción de la medicina contemporánea y la no transmisión del conocimiento de generación en generación, han contribuido al continuo abandono de la medicina natural a base de plantas, disminuyendo la utilización y promoción en salud de plantas medicinales en diferentes poblaciones del Ecuador, eliminándose una magnifica opción para el tratamiento de diversas enfermedades **(4).**

El surgimiento de enfermedades infecciosas que han aparecido recientemente o que han existido en el pasado con diferentes características inmunológicas, mayor virulencia y especialmente con variada resistencia, a causa del continuo crecimiento poblacional, hacinamiento, falta de servicios básicos, migraciones, inhabilitan el uso de fármacos actuales, haciéndose necesario buscar nuevas fuentes de antimicrobianos y alternativas de tratamiento utilizando como base las plantas medicinales **(5).**

Los efectos indeseables que los medicamentos sintéticos (medicina contemporánea) causan en la fisiología normal del cuerpo humano, alteraciones gastrointestinales, del sistema nervioso central, reacciones alérgicas entre otras, por los altos niveles de toxicidad de los fármacos, motivan la búsqueda de sustancias de origen vegetal con actividad antimicrobiana con bajos niveles de toxicidad, ideales para el uso humano **(6).**

Por lo cual la Universidad Nacional de Loja, el Área de la Salud Humana y la Carrera de Laboratorio Clínico junto con el Centro de Investigacion y Servicios de Analisis Químico ejecutó el Proyecto “Plantas medicinales, plaguicidas y tóxicas de la Región Sur del Ecuador: estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe” desde el año 2010 el cuál está dirigido a la evaluación antimicrobiana de las plantas usadas con fines medicinales, estableciendose el presente trabajo de investigación como complemento de este proyecto.

Al termino del presente estudio, se comprobó que las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 de los extractos etanólico, acuoso y hexánico de la raíz de *Hippobroma*

longiflora no presentan actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar con disco, frente a las cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), y la cepa fúngica de *Cándida albicans (ATCC 26790).*

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales elaboran principios activos, sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida **(3).**

La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal, y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, etc **(7).**

4.1.1. Importancia y uso

Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de los profesionales tradicionales, las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria. Es más, durante los últimos decenios, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en los países industrializados, y se halla en expansión el uso de plantas medicinales y medicamentos herbarios.

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos **(8).**

4.1.2. Plantas medicinales y pueblos ancestrales

Las plantas medicinales y sus productos derivados han sido utilizados durante miles de años en la medicina tradicional indígena, y son también la materia prima para la concepción de muchos medicamentos farmacéuticos actuales. Las comunidades indígenas, al vivir estrechamente ligadas a la naturaleza, poseen un gran conocimiento del uso de estas plantas con fines terapéuticos.

Estos conocimientos son un verdadero tesoro en manos de los pueblos indígenas, no solamente para cuidar su salud, sino también como posibilidad de desarrollo económico, a través del cultivo, procesamiento y la comercialización de las plantas medicinales **(9).**

En el Ecuador se reportan 1016 taxones vegetales con usos medicinales incluidos en 143 familias botánicas. Las familias con más registros de uso son Solanaceae, Malpighiaceae y Piperaceae.

Las plantas han sido un recurso fundamental para las comunidades campesinas e indígenas de nuestro país. Se estima que el 80% de la población ecuatoriana depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas o productos naturales, para la atención primaria de la salud y bienestar. Si consideramos que nuestras culturas andinas, son poseedoras un enorme conocimientos sobre el uso de las plantas, la cantidad de especies usadas podría ser más diversas de las que hasta ahora se han documentado y publicado siendo un potencial valioso de conocimientos que podrían ser de gran utilidad para toda la población ecuatoriana **(10).**

La provincia de Zamora Chinchipe posee una gran diversidad de plantas, 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 por los habitantes de la provincia para tratar sus enfermedades **(1).**

En el cantón Zamora la mayoría de la población preserva la tradición milenaria de la medicina tradicional, para sanar ciertas enfermedades mediante la utilización de plantas curativas propias del lugar como son: matico, saúco, menta, llantén, mortiño, cadillo, escancél, yansao, ruda, toronjil, geranio, chine, verbena, sábila, limón, ayarosa, guabiduca, natemasamike, suelda con suelda y la sangre de drago. La utilización de estas plantas es mediante la experiencia y conocimientos ancestrales de sus moradores, o con la intervención de personas con conocimientos en el campo de la medicina tradicional **(2).**

4.1.3. Medicina tradicional

La OMS define a la medicina tradicional (MT) como las prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas

basadas 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 **(11).**

La MT se utiliza ampliamente y es un sistema sanitario que está creciendo rápidamente y de gran importancia económica. En África hasta un 80% de la población utiliza la MT para ayudar a satisfacer sus necesidades sanitarias. En Asia y en Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la MT como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. En China, la MT alrededor de un 40% de la atención sanitaria. A las personas que practican la MT se les conoce por lo general como sanadores tradicionales, colocador de huesos, herbolarios, etc **(12).**

4.1.3.1 Tipos de medicina tradicional

Las diferentes técnicas empleadas en la medicina tradicional se han reunido en cinco grandes grupos de clasificación.

Los cinco grupos son los siguientes:

- Sistemas Médicos Alternativos.
- Intervenciones mente-cuerpo.
- Terapias basadas en la biología.
- Métodos basados en la manipulación del cuerpo.
- Terapias de energía.

Sistemas médicos alternativos.-Son sistemas basados en teoría y práctica, muchos de ellos han evolucionado o vienen directamente de la medicina tradicional. Algunos sistemas médicos alternativos son la acupuntura, homeopatía y ayurveda[3] **(13).**

Intervenciones mente-cuerpo.- Son un cúmulo de técnicas diseñadas para mejorar la conexión mente-cuerpo, y sobre todo la capacidad de la mente a actuar sobre ciertos síntomas. Entre las técnicas tenemos yoga y tai-chi **(14).**

[3]Antiguo sistema de medicina tradicional originado en la India

Terapias basadas en la biología.- Estas terapias utilizan sustancias que se pueden encontrar en la naturaleza para potencializar el cuerpo. Son los elementos que podemos encontrar en los suplementos dietéticos o en los productos herbales. Es precisamente el ámbito donde se desarrolla la investigación de plantas medicinales. Entre estas tenemos la fitoterapia empleada en este estudio.

Fitoterapia.- Conocida también como herbolaria, es el uso extractivo de plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos, para prevención o tratamiento de patologías. Las plantas, según sus diferentes modos de uso o preparación, pueden actuar desde el plano propiamente físico (tejidos, órganos, y sistemas del cuerpo) hasta estados mentales, emocionales, o incluso el campo energético y espiritual. Muchas de las plantas se usan de múltiples formas y muchos de estos remedios pueden complementarse o tener efectos similares. Podemos beneficiarnos de las propiedades de las plantas por medio de los alimentos o bebidas, baños, inhalaciones, colutorios, gargarismos, y masajes **(15).**

Métodos basados en la manipulación del cuerpo.- Técnicas donde el terapeuta mueve una o varias partes del cuerpo para obtener resultados. Entre ellas se encuentra la acupresión, quiropraxia, terapia de masajes, la reflexología, entre otras.

Terapias de energía.- Las terapias de energía utilizan los campos de energía que rodean y penetran el cuerpo humano, los manipulan con las manos, como en el caso del Reiki y la radiestesia **(15).**

4.2. PLANTAS CON ACTIVIDADES BIOLÒGICAS

La actividad biológica describe los efectos benéficos o adversos de una droga sobre la materia viva, esta actividad es ejercida por los principios activos de la sustancia, pero puede ser modificado por otros constituyentes de la droga. La principal clase de actividad biológica es la toxicidad de la sustancia. La actividad es generalmente dependiente de la dosis y no es común que tenga efectos adversos la sustancia cuando va de bajas a altas dosis **(16).**

Los principios activos son sustancias presentes en especies vegetales, que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre el organismo vivo influyendo en el metabolismo. Su utilidad a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida, es decir que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes **(17) (18).**

Las partes de la planta están desigualmente provistas de principios activos. Las que se utilizan se denominan drogas vegetales.

La hoja, asiento de todas las síntesis químicas vegetales, es la parte más empleada, la que produce los heterópsidos y la mayor parte de los alcaloides.

El tallo, es solo una vía de tránsito entre las raíces y las hojas, pero puede contener principios activos, en especial en la corteza y la albura, parte del tallo situada entre el corazón y la corteza, tienen, a veces, virtudes terapéuticas; así la albura del tilo es hipotensora, la del quino antipalúdica. El tallo termina en una yema donde se localizan las expectativas de crecimiento de la planta; es un tallo completo en miniatura. Algunas yemas son antisépticas como las de abeto. A nivel del suelo existen a veces tallos especializados en almacenamiento. Son los rizomas, tubérculos y bulbos. Los tubérculos de las plantas están repletos de moléculas azucaradas, el almidón. Esencias sulfuradas se encuentran en bulbos de ajo y cebolla.
La raíz extrae el agua con sales minerales del suelo y la bombea hacia las hojas. Acumula a menudo azúcares, otras veces vitaminas y alcaloides.

La flor es la encargada de transmitir el mensaje hereditario, a veces cargada de principios activos, es apreciada en Fitoterapia. Los pétalos coloreados son ricos en pigmentos. El conjunto de pequeñas hojas y pedúnculos florales constituyen las sumidades florales. Los pedúnculos florales, vulgarmente llamados rabos; son útiles los de cereza, por sus propiedades diuréticas. El polen es rico en vitaminas y oligoelementos. La semilla o grano es un depósito de prótidos, glúcidos y lípidos para la planta **(17).**

Existen diversas especies de plantas con actividad biológica (bioactividad), actividad que se atribuye a la presencia de sustancias específicas presentes, llamadas generalmente metabolitos, las cuales le confieren a la especie vegetal propiedades benéficas. Por ejemplo entre las especies de plantas que presentan actividad biológica tenemos la *Catharanthus roseus* (vicaria) es una fuente de ajmalina, usada como un medicamento que incrementa la circulación cerebral y los alcaloides diméricos vinblastina y vincristina, dos importantes medicamentos antitumorales **(19).**

Se considera medicamento a toda sustancia medicinal y sus asociaciones o combinaciones destinadas a su utilización en las personas o en los animales que se presente dotada de propiedades para prevenir, diagnosticar, tratar, aliviar o curar enfermedades o dolencias o para afectar a funciones corporales o al estado mental. También se consideran medicamentos las sustancias medicinales o sus combinaciones que pueden ser administrados a personas o animales con cualquiera de estos fines aunque se ofrezcan sin explícita referencia a ellos **(20).**

4.2.1. Tipos de actividad biológica de plantas

Los varios tipos de actividad biológica conferida a las plantas medicinales, se dan por distintas sustancias biológicas, presentes de forma indistinta en las partes de la planta, como son los metabolitos secundarios, sustancias aromáticas o compuestos fitoquímicos antimicrobianos **(21).**

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de una especie vegetal se fundamenta en dos factores, primero la acción de la sustancia antimicrobiana tiene que alcanzar niveles óptimos para ejercer su efecto antimicrobiano y segundo la susceptibilidad del microorganismo que se desea inhibir **(22 p. 172).**

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de las plantas medicinales está dada por compuestos fitoquímicos como los fenoles, polifenoles, quinonas y terpenoides.

El ácido cafeico y el cinámico, ambos fenoles muestran actividad antibacteriana junto con las antraquinonas que presentan acción bactericida contra *Pseudomona aeruginosa*. El bakuchiol, presente es especies de plantas como *Psoraleacorylifolia y Pubescensotholobium*, *es* un terpenoide que ha sido probado contra diferentes especies de bacterias, incluyendo *Streptococcus mutans, S. sobrinus, Porphyromonas gingivalis, Enterococcus faecalis, E. faecium, Lactobacillus acidophilus, L. plantarum, L. casei, S. sanguis, S. salivarius, Actinomyces viscosus,* generando diversos valores del MIC que van desde 1.0 hasta 4.0 µg/ml y una concentración esterilizante entre los 5.0 hasta los 20.0 µg/ml.

El rango de la actividad antibacteriana de las quinonas es amplio, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas **(21).**

Actividad antimicótica

La actividad antimicótica de las plantas medicinales esta conferida por compuestos fitoquímicos como los aceites esenciales, cumarinas y terpenoides.

Los terpenos o terpenoides como el petalostemumol son activos contra bacterias, virus, hongos (*Candida albicans*) al igual que las cumarinas con experimentos utilizando conejos. Las tioninas y kalata son péptidos tóxicos para las levaduras **(23).**

Existen diversas plantas con actividad antimicótica entre las cuales tenemos *Larrea divaricata Cav, Gnaphalium gaudichaudianum D.C, Baccharis trímera Less y Schinus terebenthifolius,* entre otras **(24).**

Actividad antiviral

Las plantas medicinales poseen actividad antiviral por compuestos fitoquímicos que se encuentran en sus órganos como los alcaloides, terpenoides y taninos.
El ácido betulínico es un triterpenoide que muestra actividad inhibitoria del virus VIH.

Las plantas de las especies de *Vacciniumcon* tienen taninos que poseen actividades antivirales, antiadherentes o antioxidantes **(25).**

Actividad antiparasitaria

Las plantas medicinales poseen compuestos que le otorgan actividad antiparasitaria. Algunas sustancias activas son los alcaloides que tienen efecto contra parásitos como giardia y entamoeba.

La berberina es un alcaloide representativo por su actividad potencialmente efectiva contra tripanosoma y plasmodium. Se ha descrito que tiene actividad microbicida (por ejemplo, sobre *giardia y entamoeba*), pero se cree que su acción antidiarreica probablemente se deba a sus efectos sobre el tiempo de tránsito del bolo alimenticio en el intestino delgado **(21).**

Actividad anti inflamatoria

La actividad antiinflamatoria de las plantas ha sido muy estudiada en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios.

Flavonoides, taninos, compuestos polifenólicos y antioxidantes como el tocoferol, son sustancias que interfieren directamente en el proceso inflamatorio. Las sustancias naturales que presentan probada acción antioxidante también se reportan como antiinflamatorias. Reportes populares plantean el uso de la *Chamaemelum nobile* (manzanilla), *Jatrophagos sypiifolia L* (túatúa), *Artemisia absinthium* (artemisa), *Costus spiralis* (cañuela), *Jasminum sambac* (diamela) y otras como antiinflamatorias **(26).**

Actividad anticancerígena

Los variados compuestos presentes en las plantas medicinales que han sido identificados con actividad anticancerígena bloquean diversas acciones hormonales y procesos metabólicos que están asociados con el desarrollo del cáncer.

Existen muchas sustancias con actividad anticancerígena como son los compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, terpenoides, isoflavonas,

glutaratos, la mayoría de ellos con actividad antioxidante y por ende anticancerígena.

Los múltiples flavonoides de las plantas poseen amplias propiedades biológicas que promueven la salud humana y ayudan a reducir el riesgo de enfermedades. Los flavonoides expanden la actividad de la vitamina C actuando como antioxidantes. El romero, la salvia, el orégano, el tomillo y otras hierbas aromáticas que pertenecen a la familia de las labiadas poseen una fuerte actividad antioxidante **(27).**

Actividad analgésica

Las plantas medicinales poseen sustancias activas analgésicas que disminuyen la sensibilidad al dolor al inhibir la síntesis o acción de mediadores como los eicosanoides, histamina, bradicinina, entre otras, impidiendo la acción sensibilizadora de éstos sobre las terminaciones nerviosas.

Las principales sustancias que presentan acción analgésica son los alcaloides y los terpenos, como los sesquiterpenos derivados de especies de la familia *Asteraceae* **(28).**

4.2.2. Bioactividad y metabolitos secundarios

Las plantas producen más de 100.000 productos naturales de bajo peso molecular conocidos como metabolitos secundarios, diferenciándose de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Se han aislado alrededor 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son parte de un proceso evolutivo adquirido por las plantas para mejorar la defensa frente al ataque de microorganismos, insectos y otros animales, los cuales también poseen actividades biológicas beneficiosas en el ser humano **(29).**

4.2.2.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por las plantas que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia

de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien si se verá afectada. Los metabolitos secundarios no participan directamente en el crecimiento o desarrollo de la planta sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno.

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición, no obstante, los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura) **(30).**

La actividad biológica de las plantas se debe principalmente a la presencia de metabolitos secundarios producidos por las plantas para la defensa de diferentes organismos del medio como otras especies vegetales o insectos. Inicialmente se consideraban los metabolitos secundarios como sustancias de desecho de las plantas pero diversas investigaciones determinaron la actividad biológica de varias especies de plantas **(31).**

4.2.2.2. Metabolitos con actividad antimicrobiana

Las plantas poseen un enorme potencial desde el punto de vista medicinal. Dentro de su metabolismo son capaces de producir compuestos químicos con diferentes perfiles de actividad biológica, y susceptibles de ser utilizados en la terapia contra varias enfermedades que afectan al ser humano y los animales, además de servir como prototipos químicos para la obtención de nuevos productos con mejores propiedades farmacológicas **(31).**

Existen metabolitos secundarios que han identificados en plantas con actividad antimicrobiana que son usados para el tratamiento de enfermedades.

Quinonas.- Se encuentran principalmente en los cloroplastos, e intervienen a nivel celular en los mecanismos de oxidación reducción como cofactores enzimáticos. Se clasifican, a su vez, en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y fenantroquinonas. Muchas naftoquinonas son antibacterianas, antivirales y fungicidas, otras poseen actividad inhibitoria sobre enzimas topoisomerasas, por lo han sido incluidas en estudios para la búsqueda de agentes antineoplásicos **(32).**

Flavonoides.- Se encuentran en estado libre o glicosidado; son el grupo más abundante de fenoles naturales, le dan los colores (rojo, azul, amarillo) a las flores y las hojas. Son abundantes en las familias *Polugonaceae, Rutaceae, Leguminoceae, Umbellifereae y Compositae*. Existen varios grupos estructurales: flavonas, isoflavonas, flavanoles, flavanonas, dihidroflavonoles, auronas y chalconas, antocianinas y catequinas. Se reporta que estos compuestos poseen varias propiedades farmacológicas, como son: actividad antioxidante, ansiolítica, antidepresiva, antimicrobiana, hepatoprotectora, cardioprotectora, antiinflamatoria, anticancerígena, leishmanicida e inhibición de enzimas **(33).**

Coumarinas.- Son metabolitos típicos de las plantas superiores y de algunos microorganismos. Son lactonas insaturadas de las cuales una gran cantidad se derivan del ácido shikímico. Se encuentran difundidas principalmente en las familias Apiaceae, Papilionaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae y Gramineae, donde regulan el crecimiento vegetal. Las coumarinasposeen varios efectos farmacológicos **(30).**

Lignanos.- Estructuralmente son polímeros del fenilpropano. Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal encontrándose en la mayoría de los granos sin refinar y en los vegetales. Se conocen como lignanos y ligninas Las ligninas son un tipo de fibra comestible insoluble. Los lignanos tienen numerosas propiedades biológicas, que incluyen fungicidas, antioxidante y forman fitoestrógenos. Pueden mejorar la liberación y circulación de estrógenos **(34).**

Isoprenoides.- La mayoría de los isoprenoides o terpenoides están formados por la unión de una o varias unidades de isopreno. Un grupo particularmente importante de lípidos isoprenoides son los esteroides. Sus acciones farmacológicas y aplicaciones prácticas son muy variadas. Se destacan las vitaminas A, D y E, y las hormonas sexuales. Pueden ser estimulantes y afrodisíacos como los encontrados en el ginseng, el cedro y en la siguaraya **(34 p. 104).**

Compuestos fenólicos.- Los vegetales biosintetizan un elevado número de compuestos fenólicos, indispensables para sus funciones. A través de la ruta del

shikimato se obtienen los fenoles sencillos y los ácidos fenólicos, dentro de los primeros se incluyen compuestos poco abundantes en la naturaleza y de escaso valor terapéutico, a excepción de la hidroquinona. Los ácidos fenólicos de interés terapéutico son derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico. Se pueden encontrar en plantas como la alcachofa (actividad colerética); el ortosifón con actividad diurética, la equinácea empleada por sus propiedades inmuno estimulantes y reina de los prados y sauce que poseen derivados del ácido salicílico con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética.
Los taninos presentan estructura fenólica, se pueden encontrar en todos los órganos de las plantas que los contienen.
A los taninos condensados se les han atribuido propiedades similares a los flavonoides, disminuyendo la fragilidad y permeabilidad capilar, propiedades astringentes, antisépticas, antibacterianas y antifúngicas **(32).**

Compuestos nitrogenados.- Entre los compuestos nitrogenados que se encuentran en los vegetales, los más importantes por las actividades farmacológicas son los alcaloides. También están los prótidos, especialmente aminoácidos, péptidos y productos derivados.

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con acción fisiológica enérgica (medicinal o venenosa), como la morfina, la cafeína, la estricnina y la nicotina. La mayoría son venenos vegetales muy activos. Muchos alcaloides se utilizan en la terapéutica como estimulantes cardíacos y cerebrales, al aumentar la dosis disminuye la actividad motora provocando sueño (acción narcótica). Si la dosis sigue aumentando provoca inconsciencia. Su ingesta produce dependencia **(34 p. 104).**

Compuestos nitrogenados derivados de los aminoácidos.- En este grupo se incluyen los principios activos que se derivan directamente de aminoácidos: los heterósidos cianogenéticos y los glucosinolatos.

Los heterósidos cianogenéticos o cianógenos se conoce a un grupo de principios activos de plantas de diferentes familias botánicas (*Rosaceae, Linaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae*), utilizadas como antiespasmódico y estimulante respiratorio.

Los glucosinolatos se biosintetizan a partir de aminoácidos diversos, lo que da lugar a diferentes estructuras químicas, entre ellas, los isotiocianatos, responsables de la acción farmacológica, aunque también de su toxicidad. Las plantas medicinales con glucosinolatos se emplean por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas **(35).**

Compuestos azufrados.- Estos compuestos se han detectado en el ajo y la cebolla. Son utilizados como antisépticos, antihipertensivos, antihelmínticos, expectorantes y diuréticos. Se han comprobado también propiedades inhibitorias de la agregación plaquetaria in vitro, que algunos autores atribuyen a los ajoenos del ajo **(35).**

Saponinas.- Son glucósidos naturales derivados de esteroides, se encuentran frecuentemente en las plantas medicinales. Las saponinas tienen efectos hemolíticos, provocando serios trastornos cuando se inyectan directamente en sangre. Las saponinas relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, por lo tanto son expectorantes. Se emplean también como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias aunque también se han utilizado para sintetizar esteroides **(36).**

4.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se considera susceptible a una cepa o a un microorganismo cuando puede ser tratada/o exitosamente con las dosis recomendadas de un antimicrobiano para la especie microbiana y sitio de la infección eliminándose la totalidad del microorganismo. Los estudios de sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización es 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.

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específica y estandarizada. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al

clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica **(37).**

4.3.1. Pruebas para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana

Existen diferentes métodos para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana entre los cuales tenemos:

Método del antibiograma disco-placa.- El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el CCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI **(38).**

Método de E test.- El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test podemos, mediante lectura directa, determinar la CMI. Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después

de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira (38)**.**

Método de dilución en agar.- Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa pero la aparición de un sistema de inoculación múltiple (microdilución) para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo.

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica, posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando que concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida **(22).**

Microtitulación.- Con esa técnica se pueden determinar los valores de la CMI y la CMB. Aquí empleamos unas placas plásticas, estériles, con tapa, de 96 pozos y un fondo en U, cada placa permite realizar una CMI de un antibiótico a ocho cepas diferentes, o una CMI de una cepa contra ocho diferentes antibióticos.

Para preparar las diferentes diluciones del antibiótico se parte de una solución madre que se debe diluir en las condiciones adecuadas para cada antibiótico. Esta solución madre es diferente para cada antibiótico y su escogencia depende del tipo de antibiótico y la cepa a probar.

Esta técnica consume gran cantidad de tiempo y trabajo, por lo que recientemente se desarrolló una variación sustancial de esta técnica con el nombre de E test o epsilon test **(39).**

Métodos automatizados.- La mayoría de estos novedosos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica del técnico a través de un visor invertido de espejo.

Su manipulación suele ser fácil y rápida, generalmente automatizada o semiautomatizada, lo que los convierte en métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo pero una de sus limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales **(40).**

4.3.2. Medios de cultivo

Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, bacterias, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas. Según lo que se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido. El objetivo último del cultivo es variado: antibiograma, identificación o multiplicación.

Los diferentes medios de cultivo utilizados en la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana deben permitir el crecimiento exponencial de la cepa inoculada y al mismo tiempo ser diferenciales con el organismo que se desea reproducir. Existen diferentes medios de cultivo utilizados en diferentes tipos de pruebas de sensibilidad. El agar Muller Hinton es utilizado para pruebas de difusión en placa y E-test, si es utilizado en estado líquido nos servirá para pruebas de dilución como microtitulación. El medio líquido de HTM es utilizado para antibiograma

con *Haemophilus sp.* El agar chocolate suplementado puede ser utilizado para antibiogramas con tiras e-test **(41).**

Los medios de cultivo principales utilizados para la identificación o multiplicación de microorganismos en el laboratorio son los siguientes:

Agar sangre: El agar sangre al 5% con base de tripticasa soja es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias, así como los del género *Candida*. También permite el crecimiento de algunos gérmenes exigentes como estreptococos, pneumococos, brucella, corinebacterias, erysipelothrix y pasteurellas.

Agar Mac Conkey: Este medio es ligeramente selectivo ya que la concentración de sales biliares inhibe el crecimiento de los microorganismos gram positivo. Se incluye también cristal violeta para inhibir el crecimiento de las bacterias gram positivas, especialmente estafilococos y enterococos **(42).**

Infusión cerebro corazón: Los primeros estudios demostraron que el medio era más eficaz que otros como base glucosada en el aislamiento de determinadas bacterias. Si además se le añadía antibiótico el medio se hacía selectivo para el cultivo de levaduras y hongos, sobretodo en muestras altamente contaminadas por bacterias. Por la presencia de peptona, infusión de cerebro de ternera e infusión de corazón de res, se tienen los componentes necesarios para nutrir microorganismos exigentes. La glucosa se emplea para la fermentación y el fosfato como tampón. No está indicada para la caracterización de hemólisis, pero puede utilizarse suplementado con sangre.

Agar Chapman (Manitol salado): La formulación del medio se basa en la propiedad, ya enunciada por Koch, de que el crecimiento de los Estafilococos no era inhibido por una concentración de Sodio Cloruro del7.5%, mientras que esto sí sucedía con la mayoría de las bacterias restantes. El efecto inhibidor se debe a la alta concentración de sodio cloruro del medio. El medio posee D-Manita que al fermentarse se genera ácido que ocasiona el viraje del rojo de fenol al

amarillo, permitiendo así una mayor claridad en el momento de establecer el diagnóstico, ya que la mayoría de los estafilococos patógenos fermentan este azúcar.

Agar Dextrosa (TSB): Por el contenido de peptona de soja y peptona de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes. Se utilizan como tales o como base para preparar medios especiales (agar sangre, agar proteus).

Agar nutritivo: Es un medio usado para el cultivo de microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales. No contiene inhibidores del desarrollo bacteriano. La pluripeptona es la fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo bacteriano. El agregado de cloruro de sodio permite el enriquecimiento con sangre de carnero u otras sustancias para facilitar el cultivo de microorganismos exigentes **(43).**

Agar tripiticasa de soya: Garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológica tanto grampositivos como gramnegativos, hongos y levaduras, este medio tiene múltiples usos puede ser utilizado para el monitoreo microbiológico de áreas y superficies, para el mantenimiento de cepas ATCC y para el análisis de aguas y alimentos. El agar tripticasa de soya contiene caseína digerida con enzimas pancreáticas y papaína al igual que cloruro de sodio **(44).**

Agar Cetrimide: Se utiliza para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de muestras clínicas y otros materiales, se basa en la fórmula del agar Tech, diseñado por King para la producción mayor de piocianina de *Pseudomonas aeruginosa*, pero se ha modificado con la adición de cetrimida para la inhibición selectiva de organismos diferentes de *P.aeruginosa*. El medio se utiliza para el aislamiento de *P. aeruginosa* en los campos tanto clínicos como farmacéuticos. En el agar cetrimide la peptona sirve como fuente de nitrógeno y el glicerol se utiliza como fuente de carbono y energía. La producción de

piocianina se estimula mediante el cloruro de magnesio y el sulfato potásico en el medio **(45).**

4.3.3. Inóculos

Un inoculo microbiano es una preparación solida o líquida la cual contiene una gran cantidad de microorganismos, como bacterias y hongos. Estos microorganismos se encuentran activados, es decir son viables y están listos para ser, como su nombre lo dice inoculados en un medio de cultivo. Los inóculos pueden ser de un solo microorganismo específico o puede ser una mezcla de microorganismos en conjunto que serán inoculados en medios específicos **(22).**

4.3.4. Cepas de referencia ATCC

Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.

La colección que almacena la ATCC se inició en 1925, sobre una colección de bacteriología iniciada en 1911. Es una organización en la que participan actualmente 21 sociedades científicas la cual se inició en el año 1971. En la actualidad mantiene colecciones de bacteriología, cultivos celulares, plásmidos, ácidos nucleicos, genotecas, micología, botánica, protistología y virología **(46).**

Existen otras clases de cepas de referencia representadas por organizaciones como:

- NCTC: Colección Nacional de Cultivos Tipo. Londres.
- CNCM: Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos. Paris, Francia.
- CCTM: Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos. Instituto Pasteur.
- NCYC: Colección Nacional de las Culturas de levadura. Norwik Reino Unido.
- NCIBM: Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales y Marinas.

- CECT: Colección Española de Cultivos Tipos.

Staphylococcus aureus

Los estafilococos pertenecen a la familia *Micrococcaceae*. El género *Staphylococcus* consta de más de 25 especies y varias subespecies. Las tres especies de mayor interés clínico son: *Staphylococcus epidermidis, saprophyticus y aureus.*

Son cocos gram-positivos. Su pared está compuesta por péptidoglicano asociado a ácidos teicoicos mediante el aminoácido L-lisina. Se agrupan en forma de racimos como su nombre indica. Son anaerobios facultativos y producen catalasa.

La principal característica que diferencia a *Staphylococcus aureus* de los demás estafilococos es la producción de la enzima coagulasa (coagula el plasma citratado). *Staphylococcus aureus* resiste al calor y a la desecación y puede crecer en condiciones de salinidad (7,5% de ClNa).

Muestran β-hemólisis en medios con sangre. Su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol para producir ácido láctico **(47).**

Pseudomona aeruginosa

Es una bacteria gram negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas.

Pseudomona aeruginosa secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo). King, Ward, & Raney desarrollaron el agar "Pseudomonas Agar P" (también conocido como "medio King A") para mejorar la producción de piocianina y piorubina; y "Pseudomonas Agar F" (también conocido como "medio King B") para la fluoresceína.

Pseudomona aeruginosa es a menudo identificada, de modo preliminar, por su apariencia perlada y olor a uvas in vitro. La identificación clínica definitiva de *Pseudomona aeruginosa* frecuentemente incluye, tanto identificar la

producción de piocianina y fluoresceína como determinar su habilidad de crecer a 42 °C. *Pseudomona aeruginosa* es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga **(39).**

Escherichia coli

Son bacterias Gram negativas cilíndricas con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas. Conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen, son bacterias quimioheterótrofas facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β-galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos periticos o inmóviles y normalmente reducen nitrato a nitrito.

El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *Escherichia coli, hermanni, fergusonii, vulneris y blattae.* La especie tipo es *Escherichia coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *Escherichia hermanni* y *Escherichia vulneris* han sido involucradas en infecciones de heridas aunque de manera muy ocasional.

El estudio de distintas reacciones bioquímicas puede ayudar en la diferenciación entre las especies. Las principales pruebas fisiológicas que distinguen a *Escherichia coli* de las demás especies son producción de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol **(48).**

Klepsiella 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 oportunistas. El género fue llamado así en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de finales del siglo XIX.

La tinción de Gram se presenta negativa, la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el medio Kligler, donde son positivos y desprenden

gas, la fermentación acetónica o prueba de Voges Proskauer son positivas. Las condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo a 37 ºC, ph de 7.0, presión osmótica de 1 atm **(49).**

Candida albicans

Son miembros de la flora normal de la piel, las mucosas y del aparato gastrointestinal. Las especies de *Candida* colonizan las superficies mucosas de todos los humanos durante o poco después del nacimiento, y el riesgo de infección endógena siempre está presente. La candidiasis es la micosis sistémica más común. Varias especies del genero *Candida* pueden producir candidiasis.

En cultivo o tejidos las especies de *Candida* crecen como levaduras ovales en gemación (3-6 um de tamaño). También forman pseudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas, pinzadas o constreñidas en los tabiques entre las células. La especie de *Candida albicans* es dimórfica, además de las levaduras y las seudohifas, también pueden producir hifas verdaderas.

En medios de agar en las primeras 24 horas a 37^0C o temperatura ambiente las especies de *Candida* producen colonias blandas de color cremoso con olor a levadura con un crecimiento completo a las 24 horas. Las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar. Dos pruebas morfológicas simples diferencian a *Candida albicans,* el patógeno más común, de otras especies de *Candida:* después de incubación en suero durante casi 90 minutos a 37^0C, las células de *Candida albicans* empiezan a formar verdaderas hifas o tubos germinales. En un medio nutricionalmente insuficiente *Candida albicans* produce clamidosporas grandes y esféricas. Se pueden emplear las pruebas de fermentación de carbohidratos y de asimilación para confirmar la identidad y asignar especie a los aislados de *Candida* más comunes, como *Candida tropicalis, parapsilosis, guilliermondi, kefyr, krusei, lusitaniae, glabrata* y otras. Se pueden examinar frotis teñidos con gram en busca de seudohifas y células en gemación. También se puede utilizar hidróxido de potasio al 10% y calcofluor blanco **(50).**

4.3.5. Antibióticos

Un antibiótico ha sido definido como una sustancia química producida por un organismo vivo capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Los antibióticos modificados por manipulaciones químicas aún se consideran como tales. Un agente antimicrobiano es activo contra los microorganismos y puede ser producido en forma natural por microorganismos o sintéticamente en el laboratorio.

En función de la forma de actuar sobre los microorganismos, hablamos de dos grandes grupos de antibióticos:

Antibióticos bactericidas: Ejercen una acción letal e irreversible sobre el microbio entre los cuales tenemos fosfomicina, vancomicina, B-lactámicos, polimixin, aminoglucósidos, rifampicina, ácidonalidíxico, quinoleínas, nitrofurantoinas, entre otros.

Antibióticos bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento pero no matan al microorganismo, permitiendo que las propias defensas del huésped pueden eliminar a las bacterias, entre estos tenemos, tetraciclina cloranfenicol, sulfonamidas, trimetroprim, lincomicina, clindamicina y macrólidos **(51).**

4.3.6. Incubación

Los distintos factores ambientales (temperatura, pH, oxígeno, concentración de solutos u osmolaridad, etc.) afectan al crecimiento microbiano. Se debe, por tanto, tener en cuenta las condiciones en que se debe cultivar un determinado tipo de microorganismos.

En función de su espectro de crecimiento respecto a la temperatura, distintos tipos de microorganismos crecerán con distintas tasas de crecimiento a una determinada temperatura. Ello puede ser utilizado como base para el aislamiento de organismos psicrófilos, mesófilos o termófilos **(52).**

4.4. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PLANTAS

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar In vitro la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado.

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía.

4.4.1. Método de dilución

El método de dilución en agar o en caldo es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI). En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación.

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, posteriormente se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático **(53).**

4.4.2. Bioautografía

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada. El método consiste en colocar las muestras a evaluar

en placas de cromatografía de capa fina (TLC), seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar , luego de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; posteriormente a la incubación se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo **(54).**

4.4.3. Método de difusión

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados in vitro para determinar la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado.

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (método de Kirby Bauer). Este método fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de ensayos de susceptibilidades de NCCLS de Estados Unidos.

El fundamento de esta determinación es establecer en forma cuantitativa el efecto de un conjunto de sustancias ensayados individualmente, sobre cepas bacterianas que se aíslan de varios procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia.

Las desventajas de esta técnica es la composición del papel filtro Whatman el cual se compone de celulosa los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, absorbiendo e impidiendo la difusión de compuestos en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo.

La ventaja de este método está en que permite evaluar varias sustancias, al colocar varios discos con diferentes extractos en las placas con medio. En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel o los pozos se colocan en forma equidistante, luego de la incubación se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad In vitro de la sustancia **(54).**

4.4.3.1. Método de Kirby Bauer (Método de difusión en agar con disco)

El método de Kirby Bauer se emplea determinar la sensibilidad in vitro contra bacterias u otros agentes antimicrobianos, también es conocido como la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

El procedimiento consiste en preparar una suspensión bacteriana reciente, la cual se inocula sobre la superficie de una placa de Mueller Hinton, sobre la cual colocamos discos de papel impregnados con antimicrobianos. Después de la incubación, se analiza el patrón de crecimiento o inhibición alrededor cada disco, posteriormente se mide el tamaño de cada halo y se compara con tablas apropiadas de acuerdo con las especies bacterianas analizadas **(55).**

Estandarización

El método de Kirby Bauer está sujeto a numerosos errores, pero es la elección en el laboratorio por su sencillez de ejecución, exacta reproducción, la facilidad de lectura y la fiabilidad de sus resultados, por lo que ha sido reconocido y estandarizado internacionalmente por organismos como la FDA, NCCLS, CDC y ICS; protocolos estandarizados que sirven de base para la creación de métodos intralaboratorio acorde a las circunstancias del medio de trabajo.

Medios de cultivo

Se utiliza agar Mueller Hinton que está formulado y avalado de acuerdo a los criterios de CLSI. El medio debe tener una profundidad de 4mm. Debe estar entre 7.2 y 7.4. Un pH bajo puede bajar la potencia de aminoglucosidos y macrólidos mientras que otros agentes antimicrobianos pueden parecer tener mayor

actividad como las tetraciclinas. Si el pH es alto se observa el efecto contrario **(55).**

Cepas estandarizadas

La utilización de cepas estandarizadas en métodos de difusión con disco se utiliza para conocer si el medio de cultivo empleado permite desarrollar al microorganismo inoculado todas sus características macroscópicas conocidas, además de conocer el diámetro de los halos de inhibición utilizados y compararlos con halos de pruebas estandarizadas por organismos internacionales como control de calidad **(56).**

4.5. HIPPOBROMA LONGIFLORA

Hippobroma es un género monotípico de plantas, perteneciente a la familia *Campanulaceae*. Su única especie *Hippobroma longiflora* , es originaria de Jamaica y se ha extendido por todo el mundo, naturalizándose en los trópicos americanos y en Oceanía **(57).**

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Campanulaceae
Subfamilia:	Lobelioideae
Género:	*Hippobroma* G.DON

4.5.1. Descripción botánica

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. Posee hojas sésiles membranosas (sin embargo hay muestras de un peciolo envolvente en muchas de las muestras colectadas), u oblongo-lanceoladas, irregularmente dentadas hasta con 17-20 lóbulos, la longitud de la hoja es de 15-20 cm, con 5cm de ancho, denticuladamente callosas, reticuladas. La filotaxia es alterna. La base de la hoja es envolvente. Las estomas foliares son anomocíticos[4].

Las flores son blancas, con 5 pedicelos largos de 5 a 20 cm, un par de bracteolas filiformes en la base de la flor que en general es solitaria.

Las semillas son negras y pueden medir menos de un milímetro y el fruto puede contener muchas de ellas. Los sépalos son persistentes. El estilo mide cerca de 9 cm de largo, el estigma es lobulado, gomoso, de unos 3 cm de ancho, rodeado de cuatro estambres. Anteras adnatas fusionadas entre sí rodean el estigma, la antera presenta unas estructuras lobulares en forma de fleco (tricomas para dispersión de polen). El polen es tricolpado. Los frutos son capsulares de 1.5 – 5 mm de diámetro.

Se ha reportado que el período de floración se da a través de todo el año y la distribución altitudinal 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. Las poblaciones de *H. longiflora* presentan una distribución agregada y se han observado más de 20 individuos en cada uno de los sitios visitados. Esta especie se ha observado durante todo el año en flor, principalmente entre abril y junio y en fructificación simultáneamente. Se ha localizado en sitios de crecimiento secundario a orillas de las carreteras, ríos, paredones, cercanas a lagunas, caños lodosos; usualmente en sitios donde la vegetación no es muy abundante. Crece en

[4]No posee células anexas.

lugares donde aparentemente hay abundante agua y los suelos generalmente son pedregosos **(58).**

Fuente: Fotografía del autor

4.5.2. Propiedades

Las propiedades de la planta se basan en dos alcaloides: lobelina y nicotina. Los efectos de la nicotina y lobelina son psicoactivos a dosis pequeñas y con efectos desagradables como vómitos, parálisis muscular y temblor en dosis más altas. La savia de la planta es un irritante que puede ser absorbido por la piel y en los ojos puede causar ceguera (59)**.**

4.5.3. Estudios realizados

La especie vegetal *Hippogroma lonfiflora* L (G) Don no presenta estudios realizados con todos los métodos utilizados para la evaluación de la actividad antimicrobiana, sin embargo la planta mencionada es utilizada empíricamente para curar lesiones cutaneas y las producidas por la Leishmaniasis (60)**.**

Se han realizado varios estudios de sensibilidad antimicrobiana similares al actual, utilizando otras especies vegetales, por citar algunos ejemplos tenemos "Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* cultivada en el departamento del Quindío" o "Evaluacion de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las

especies vegetales *Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos"; estudios que corroboran la efectividad antimicrobiana de algunas planta frente a patógenos humanos.

4.5.4. Sinonimia y nombres vulgares

- *Lobelia longiflora* L., Sp. Pl.: 930 (1753).
- *Rapuntium longiflorum* (L.) Mill., Gard. Dict. ed. 8: n. 7 (1768).
- *Isotoma longiflora* (L.) C.Presl, Prodr. Monogr. Lobel.: 42 (1836).
- *Laurentia longiflora* (L.) Peterm., Pflanzenreich: 444 (1845).
- *Solenopsis longiflora* (L.) M.R.Almeida, Fl. Maharashtra 3A: 155 (2001).
- *Isotoma runcinata* Hassk., Bonplandia (Hannover) 7: 181 (1859).
- *Laurentia longiflora var. runcinata* (Hassk.) E.Wimm., Ann. Naturhist. Mus. Wien 56: 337 (1948).
- *Isotoma longiflora var. runcinata* (Hassk.) Panigrahi, P.Daniel & M.V.Viswan., Indian J. Forest. 4: 151 (1981).

Nombres vulgares: jazmín de estrella, cinco estrellas, caraña, doricu, camíbar **(58).**

4.5.5. Distribución geográfica

Se distribuye en las Antillas Occidentales donde aparentemente se originó. Está ampliamente extendida en América Tropical, desde el sur de México hasta Brasil y Perú. La savia causa severas inflamaciones en los ojos y puede llegar a provocar ceguera **(58).**

5. MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación es un estudio de tipo experimental que se realizó en el periodo Junio – Noviembre de 2013.

ÁREA DE ESTUDIO

La provincia de Zamora Chinchipe, Cantón Zamora, Parroquia ¨Limones¨.

UNIVERSO

Hippobroma longiflora (L) G. Don (Cholo valiente).

MUESTRA

Raíces de *Hippobroma longiflora* (L) G. Don (Cholo valiente).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Raíces de *Hippobroma longiflora* (L) G. Don en buen estado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Plantas que no fueron identificadas morfológicamente como *Hippobroma longiflora* (L) G. Don (Cholo valiente) por el personal del Jardín botánico y Herbario ¨Reinaldo Espinoza¨.

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

- Cámara fotográfica
- Hojas de registro de resultados

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

Se aplicarán en cada una de las etapas de investigación, procesos de control de calidad a cada uno de los instrumentos utilizados como también a los procedimientos que se utilizaran en la determinación de la actividad antimicrobiana de extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* (Cholo valiente) tanto en la parte fitoquímica como microbiológica.

VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS

La validación de los procedimientos utilizados se realizó utilizando la planta *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor) cuyo aceite posee actividad antimicrobiana comprobada contra la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* (25923). Se empleó aceite puro y en diluciones 25/100, 50/100.

MÉTODOS TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PLANTA DE REFERENCIA *SYZYGIUM AROMATICUM* (CLAVO DE OLOR)

PRUEBA PILOTO

Se realizaron pruebas piloto previas al estudio con la raíz de *Hippobroma longiflora*, los cuales siguieron estrictamente los protocolos establecidos en las Unidades de Microbiología y Fitoquímica del Laboratorio de Análisis Químico de la UNL.

Primeramente se prepararon los medios de cultivo utilizados en la reconstitución (infusión cerebro corazón) y viabilización (agar sangre) de la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) siguiendo los protocolos establecidos (anexo Nº 11, protocolos # 2, 10, 22)

Luego de la preparación de los medios de cultivo se obtuvo el tubo # 0,5 de la escala de Mac Farland que fué utilizado como patrón para el inóculo bacteriano con la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* con solución salina esteril, el cual será leído en el espectrofotómetro con valores de entre 0.10 a 0.08 nm (anexo Nº11, protocolo # 20).

Los discos de papel Whatman #3 fueron elaborados con un sacabocados de 6 mm de diámetro, bajo condiciones de asepsia y esterilizados bajo luz UV de acuerdo al protocolo de la Unidad de Microbiología (anexo Nº11, protocolo # 20).

Todo el material que fue empleado en las pruebas piloto como pinzas, cajas, tubos, hisopos, lápiz, fue correctamente esterilizado aplicando los controles de calidad adecuados.

Para la evaluación antimicrobiana se aplicó el método de difusión en agar con disco, empleando aceite de clavo de olor puro previamente obtenido y las

diluciones 25/100, 50/100 con etanol que poseen actividad comprobada. Las diluciones fueron impregnadas en discos (20 ul) de papel Whatman #3 sobre mallas plásticas en cajas petri estériles. Los discos fueron colocados en placas con medio de agar Muller Hinton previamente inoculadas utilizando como estándar el tubo 0,5 de la escala Mac Farland, junto al control positivo (vancomicina) y al control negativo (disco de papel Whatman con 20 ul de etanol) en cámara de flujo laminar e inmediatamente incubadas a 37^0C, conforme a los protocolos (anexo Nº11, protocolo # 30).

Luego del periodo de incubación, los halos de inhibición fueron leídos con un calibrador y los datos asentados en hojas de registro de resultados.

Se aplicó controles de calidad en todos los procesos realizados, como también en los procesos de esterilización. Todo el material y los equipos empleados fueron esterilizados. Durante todos los procesos se aplicaron condiciones de bioseguridad de acuerdo a los protocolos de la Unidad de Microbiología (anexo Nº11, protocolo # 1).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PLANTA DE ESTUDIO *HIPPOBROMA LONGIFLORA* (L) G. DON (CHOLO VALIENTE)

La evaluación de la actividad antimicrobiana de la raíz de *Hippobroma longiflora* se realizó en dos etapas, primero se procedió a la obtención de los extractos de la raíz de la planta mencionada y posteriormente se evaluó mediante diluciones la acción antimicrobiana de los extractos empleando el método de difusión en agar con disco frente a las cepas ATCC de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y *Cándida albicans (ATCC 26790).*

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE LA RAÍZ DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA*

1. Colecta de la especie vegetal

La recolección de la raíz de la planta de estudio se realizó en la parroquia “Limones”, cantón Zamora, en la provincia de Zamora Chinchipe, para lo cual se empleó un saco de yute y se tomaron fotografías de la especie vegetal, conforme

al protocolo de recolección de plantas del laboratorio de la Unidad de Fitoquímica del Centro de investigación y servicios de análisis químico (CISAQ) de la Universidad Nacional de Loja. Un ejemplar de la planta fue remitido al Herbario Reinaldo Espinoza para su identificación (anexo Nº 10, protocolo # 1).

2. Lavado de la raíz de *Hippobroma longiflora*

El lavado de la materia vegetal (raíces de *Hippobroma longiflora*) se realizó utilizando agua corriente e hipoclorito de sodio al 0.05%, con el fin de eliminar los restos de tierra que podrían interferir en la molida de las raíces; luego del lavado las raíces son secadas a temperatura ambiente sobre papel periódico y posteriormente en una estufa de aire caliente siguiendo las instrucciones del protocolo de lavado del laboratorio de la Unidad de Fitoquímica (anexo Nº 10, protocolo # 1).

3. Secado de la raíz de *Hippobroma longiflora*

El secado se realizó según el protocolo del laboratorio de la Unidad Fitoquímica, en el cual indica que después de ser colectada y lavada la planta, las partes de interés se secarán a temperatura ambiente, bajo sombra, extendiéndolas sobre papel periódico limpio (en blanco) o en estufa de aire caliente a 35^0C por 3 días o hasta que la parte que nos interesa de la planta se encuentre totalmente seca. Las raíces de *H. longiflora* se secaron a temperatura ambiente por 4 dias y en estufa de aire por 3 días (anexo Nº 10, protocolo # 1).

4. Molienda de la droga vegetal

Luego del proceso de secado se procedió a la molienda de la raíces según el protocolo de molienda del Laboratorio de Fitoquímica, en el cual se usó un molino de cuchillas con un tamiz de 2 mm. Las raíces de *Hippobroma longiflora* fueron cortados en un tamaño que facilito su tratamiento (molienda). La droga vegetal (raíz de *Hippobroma longiflora*) molida se colocó en fundas herméticas etiquetadas que protegen del aire y la humedad (anexo Nº 10, protocolo 2).

5. Obtención de extracto hexánico

El proceso de obtención del extracto hexánico de la raíz molida de *Hippobroma longiflora,* se realizó de acuerdo al protocolo de obtención de extractos por maceración del laboratorio de la Unidad de Fitoquímica, en el cual la raíz molida

se maceró con hexano en un matraz Erlenmeyer por 24 horas a temperatura ambiente en agitación con la ayuda de un agitador magnético; se separó el macerado por filtración empleando un cono de papel filtro en un matraz Erlenmeyer y concentrarlo en el equipo rotavapor a 20° C. El proceso se repitió dos veces más y el extracto concentrado fue liofilizado (anexo Nº 10, protocolos 2, 3).

6. Obtención del extracto etanólico

El proceso de obtención de extracto etanólico de la raíz de *Hippobroma longiflora,* se realizó según el protocolo de obtención de extractos por maceración de plantas del laboratorio de la Unidad de Fitoquímica, en el cual la raíz molida que resulta de la anterior extracción (extracto hexánico) se maceró con etanol (99.5%) en un matraz Erlenmeyer por 24 horas a temperatura ambiente en agitación con la ayuda de un agitador magnético; se separó el macerado por filtración utilizando un cono de papel filtro en un matraz Erlenmeyer y se concentró en el equipo rotavapor a 40° C. El proceso se repetirá dos veces más y el extracto concentrado será liofilizado (anexo Nº 10, protocolos 2, 3).

7. Obtención del extracto acuoso

El proceso de obtención del extracto acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* se realizó según el protocolo de obtención de extractos por maceración de plantas del laboratorio de la Unidad de Fitoquímica, en el cual la raíz molida que resulta de la anterior extracción (extracto etanólico) se maceró con agua destilada en un matraz Erlenmeyer por 24 horas en agitación empleando un agitador magnético a 40^0C. Para filtrar el macerado se colocó un pedazo de gaza en la boca del matraz que sirvió como primer filtro, el macerado que se obtiene es filtrado nuevamente a través de un embudo con plumón en un matraz. El macerado obtenido es filtrado nuevamente en un cono de papel filtro en un matraz Erlenmeyer y se concentró en el equipo rotavapor a 50^0C. El proceso se repitió dos veces más y el extracto concentrado fue liofilizado (anexo Nº 10, protocolos 2, 3).

8. **Preparación de soluciones**

Los extractos puros hexánico, etanólico y acuoso obtenidos de la raíz de *Hippobroma longiflora* fueron utilizados en la preparación de tres diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 para cada uno de los extractos, usando el mismo solvente con que se hizo la extracción. Para la preparación de las diluciones, primero se realizó la dilución 1/100 pesando 10 mg de cada extracto en una balanza electrónica en un frasco de vidrio con 990 ul del solvente de extracción empleando pipetas automáticas. Las diluciones 1/1000 y 1/10000 fueron preparadas de forma seriada; tomando 100 ul de la dilución 1/100 con 900 ul del solvente de extracción para preparar la dilución 1/1000; para la dilución 1/10000 se tomó 100 ul de la dilución 1/1000 con 900 ul del solvente de extracción (anexo Nº 11, protocolos 30,31).

9. **Preparación de discos**

Los discos fueron elaborados con papel Whatman N° 3, usando un sacabocados de 6 mm diámetro bajo condiciones de asepsia y esterilizados bajo luz UV de acuerdo al protocolo de la Unidad de Microbiología (anexo Nº11, Protocolo # 20).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA RAÍZ DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA*

1. **Preparación de medios de cultivo**

Los medios de cultivo fueron preparados por etapas de acuerdo a las cepas ATCC empleadas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y *Cándida albicans (ATCC 26790).*

La preparación de los diferentes medios de cultivo se realizó de acuerdo a protocolos ya establecidos en el laboratorio de la Unidad de Microbiología del CISAQ, aplicando todas las medidas de bioseguridad y control de calidad como pH del medio (especialmente en medios de Muller Hinton), grosor y esterilidad para asegurar resultados exactos en el desarrollo de cada prueba.

Todo el material empleado en la preparación de los medios es esterilizado bajo luz UV (cajas de plástico, lápiz graso, cinta, recipientes) y en autoclave (cajas de

vidrio, probetas). Para asegurar la esterilidad de los medios, el vertido de los mismos se lo realizo en el interior de una cabina de flujo laminar con mechero Bunsen, tomando en cuenta todas las recomendaciones para evitar la contaminación. Los medios fueron previamente autoclavados a 121^{0}C por 15 min conforme al protocolo (anexo Nº 11, protocolos # 2 - 14).

2. Viabilización de cepas ATCC

La viabilización se realizó según la instrucciones del fabricante y los protocolos del laboratorio de la Unidad de Microbiología para la viabilización de cepas liofilizadas; se lo realizó colocando 0.5 ml de infusión cerebro-corazón con jeringas para insulina en cada uno de los viales que contienen las cepas puras y al cabo de una hora se sembró en los medios específicos para el desarrollo de cada cepa ATCC bacteriana y fúngica (anexo Nº 11, protocolos # 22 - 26).

Las cepas viabilizadas son inoculadas en medios de cultivo específicos en dos pases consecutivos para asegurar que el microorganismo se encuentre en fase exponencial:

- Agar chapman manitol: *Staphylococcus aureus.*
- Agar Mac Conkey: *Klepsiella pneumoniae y Escherichia coli.*
- Agar cetrimide: *Pseudomona aeruginosa.*
- Agar Saboraud dextrosa: *Cándida albicans*.

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

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27653)
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883)
- *Cándida albicans* (ATCC 26790)

3. Selección de discos para controles positivos

La selección de discos que fueron utilizados, se estableció de acuerdo a criterios del CLSI y los puntos de corte establecidos para las cepas ATCC de *Escherichia*

coli (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), *Klebsiella pneumoniae* (13883), *Pseudomona aeruginosa* (27853) y *Cándida albicans* (26790) con los antimicrobianos utilizados ciprofloxacino (CIP), ampicilina sulbactan (SAM), ampicilina ácido clavulánico (AMC), gentamicina (CN) y fluconazol (FL).

4. Antibiograma – Método de difusión en agar con disco

La evaluación de la actividad antimicrobiana de la raíz de *Hippobroma longiflora* se realizó empleando el método de difusión en agar con disco, utilizando las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 de cada uno de los extractos hexánico, etanólico y acuoso. Las cepas ATCC empleadas fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans.*

Se utilizaron controles positivos que consistían en discos de antibiótico para cada cepa utilizada. Para *Staphylococcus aureus* se utilizó el disco de ampicilina + sulbactan (SAM), con *Escherichia coli* el disco de ciprofloxacino (CIP), con *Klepsiella pneumoniae* se emplearon discos de ampicilina + ácido clavulánico (AMC), para *Pseudomona aeruginosa* se utilizó discos de gentamicina (CN) y con *Cándida albicans* discos de fluconazol (FL).

Los controles negativos consistieron en discos de papel Whatman N^0 3 de 6mm de diámetro obtenidos con un sacabocados bajo condiciones de asepsia, los discos fueron inoculados con 20 ul de solvente (hexano, etanol o agua).

El procedimiento de evaluación consistió en inocular las placas de medio de Muller Hinton con un inoculo de la cepa ATCC reconstituida en fase exponencial teniendo como estándar el tubo 0,5 de la escala de la escala Mac Farland, y colocar con pinzas estériles los discos de control positivo, negativo y la sustancia ensayada. Las placas son incubadas a 37^0C por 24 horas; la cepa de *Cándida albicans* tuvo un tiempo de incubación de 48 horas. Todo el proceso se realizó en cámara de flujo laminar.

Luego del periodo de incubación se procedió a la lectura de los halos de inhibición con un calibrador, el tamaño de los halos obtenidos tanto del control positivo como de la sustancia ensayada son puestos en hojas de registro de

resultados. Todo el proceso de evaluación antimicrobiana fue acorde a los protocolos del laboratorio de la Unidad de Fitoquímica del CISAQ (anexo Nº 11, protocolos # 30, 31).

5. Pruebas bioquímicas

Estas pruebas se utilizaron para confirmar las características bioquímicas de las cepas ATCC utilizadas y descartar problemas de contaminación. Para todas las cepas bacterianas se utilizaron distintas pruebas bioquímicas como prueba de la catalasa, coagulasa, TSI, SIM, citrato, urea y prueba de Kligger; las cuales fueron preparadas de acuerdo a los protocolos establecidos en el laboratorio de la Unidad de Microbiología (anexo Nº 11, Protocolos # 11 - 16). Las pruebas bioquímicas se realizaron con la cepa reconstituida en fase exponencial previo a la evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con disco.

6. Tinción de Gram, KOH y test de filamentación

La tinción de Gram se efectuó con el fin de confirmar las características morfológicas y tintoriales de las cepas bacterianas empleadas, se realizó con la cepa reconstituida en fase exponencial previo a la evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con disco, conforme al protocolo del laboratorio de la Unidad de Microbiología (anexo Nº 11, protocolo # 19).

El test de filamentación y la prueba de KOH fueron efectuadas con el fin de corroborar las características microscópicas y morfológicas de la cepa ATCC de *Cándida albicans* en fase exponencial, las pruebas fueron realizadas de acuerdo a la metodología descrita en los protocolos del laboratorio de la Unidad de Microbiología del CISAQ (anexo N0 11, protocolos 17, 18).

7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) no se efectuó, al no obtener resultados inhibitorios con

las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/100000 de los extractos de la raíz de *Hippobroma longiflora* frente a las cepas ATCC de *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), *Klebsiella pneumoniae* (13883), *Pseudomona aeruginosa* (27853) y *Cándida albicans* (26790) (anexo No11, protocolos # 32, 33).

8. Difusión de resultados

La difusión de los resultados se realizó con la autorización previa de la Coordinadora de la Carrera de Laboratorio Clínico, Dra. Beatriz Bustamante García, quien asigno los paralelos respectivos para la socialización del trabajo de investigación. Los resultados fueron expuestos a los estudiantes y docentes que cursan el II ciclo y el quinto módulo de la misma carrera, entregándoseles un tríptico y presentación visual de los resultados obtenidos. Se obtuvo un registro de asistencia y fotografías de la presentación como también la certificación del docente.

6. RESULTADOS

TABLA # 1

Actividad antibacteriana de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* frente a *Staphylococcus aureus ATCC* (25923)

MICROORGANISMO	EXTRACTO *Hippobroma longiflora-Raíz*	DILUCIÓN DEL EXTRACTO	Nº	SUSTANCIA ENSAYADA	CONTROL POSITIVO (SAM) R ≤ 12 I 12–14 S ≥ 14	CONTROL NEGATIVO
***Staphylococcus aureus ATCC* (25923)**	Hexánico	1/100	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	43mm	-
		1/1000	1	-	43mm	-
			2	-	44mm	-
			3	-	43mm	-
		1/10000	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	43mm	-
	Etanólico	1/100	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	45mm	-
		1/1000	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	43mm	-
		1/10000	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	44mm	-
	Acuoso	1/100	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	45mm	-
		1/1000	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	44mm	-
		1/10000	1	-	43mm	-
			2	-	43mm	-
			3	-	43mm	-

Leyenda: mm, milímetros; SAM, ampicilina+sulbactan.
Fuente: Registro de resultados del Laboratorio de Microbiología – CISAQ.
Autor: Jhon Castillo.

INTERPRETACIÓN:

La presente tabla de resultados nos muestra que las diluciones ensayadas (sustancia ensayada) 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora (L.) G. Don* (Cholo valiente) no presentaron halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus ATCC* (25923) empleando el método de difusión con disco. Los controles positivos (sensidiscos de ampicilina+sulbactan) presentaron halos de inhibición de 43 a 44 mm, considerándose como sensibles para el microorganismo ensayado; contrariamente los discos de control negativo no presentaron halos de inhibición. La concentración mínima inhibitoria y bactericida no se realizó al obtener resultados negativos con la sustancia ensayada.

TABLA # 2

Actividad antibacteriana de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* frente a *Escherichia coli ATCC* (25922)

MICROORGANISMO	EXTRACTO *Hippobroma longiflora-Raíz*	DILUCIÓN DEL EXTRACTO	Nº	SUSTANCIA ENSAYADA	CONTROL POSITIVO (CIP) R ≤ 15 / I 16-20 / S ≥ 21	CONTROL NEGATIVO
***Escherichia coli ATCC* (25922)**	Hexánico	1/100	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
		1/1000	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
		1/10000	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
	Etanólico	1/100	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
		1/1000	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
		1/10000	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
	Acuoso	1/100	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
		1/1000	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-
		1/10000	1	-	40mm	-
			2	-	40mm	-
			3	-	40mm	-

Leyenda: mm, milímetros; CIP, ciprofloxacina.
Fuente: Registro de resultados del Laboratorio de Microbiología – CISAQ.
Autor: Jhon Castillo.

INTERPRETACIÓN:

La presente tabla de resultados nos muestra que las diluciones ensayadas (sustancia ensayada) 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora (L.) G. Don* (Cholo valiente) no presentaron halos de inhibición frente a *Escherichia coli ATCC* (25922) empleando el método de difusión con disco. Los controles positivos (sensidiscos de ciprofloxacina) presentaron halos de inhibición de 40 mm, considerándose como sensibles para el microorganismo ensayado; contrariamente los discos de control negativo no presentaron halos de inhibición. La concentración mínima inhibitoria y bactericida no se realizó al obtener resultados negativos con la sustancia ensayada.

TABLA # 3

Actividad antibacteriana de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* frente a *Klebsiella pneumonia ATCC* (13883)

MICROORGANISMO	EXTRACTO *Hippobroma longiflora-Raíz*	DILUCIÓN DEL EXTRACTO	Nº	SUSTANCIA ENSAYADA	CONTROL POSITIVO (AMC) R ≤ 11 I 12-14 S ≥ 15	CONTROL NEGATIVO
***Klebsiella pneumoniae ATCC* (13883)**	Hexánico	1/100	1	-	23mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	24mm	-
		1/1000	1	-	23mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	24mm	-
		1/10000	1	-	23mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	23mm	-
	Etanólico	1/100	1	-	23mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	24mm	-
		1/1000	1	-	23mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	23mm	-
		1/10000	1	-	24mm	-
			2	-	24mm	-
			3	-	23mm	-
	Acuoso	1/100	1	-	23mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	23mm	-
		1/1000	1	-	23mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	24mm	-
		1/10000	1	-	23mm	-
			2	-	24mm	-
			3	-	23mm	-

Leyenda: mm, milímetros; AMC, ampicilina+ac. Clavulánico.
Fuente: Registro de resultados del Laboratorio de Microbiología – CISAQ.
Autor: Jhon Castillo.

INTERPRETACIÓN:

La presente tabla de resultados nos muestra que las diluciones ensayadas (sustancia ensayada) 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora (L.) G. Don* (Cholo valiente) no presentaron halos de inhibición frente a *Klebsiella pneumonia ATCC* (13883) empleando el método de difusión con disco. Los controles positivos (sensidiscos de ampicilina+ac. clavulánico) presentaron halos de inhibición de 23 a 24 mm, considerándose como sensibles para el microorganismo ensayado; contrariamente los discos de control negativo no presentaron halos de inhibición. La concentración mínima inhibitoria y bactericida no se realizó al obtener resultados negativos con la sustancia ensayada.

TABLA # 4

Actividad antibacteriana de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* frente a *Pseudomona aeruginosa ATCC* (27853)

MICROORGANISMO	EXTRACTO *Hippobroma longiflora-Raíz*	DILUCIÓN DEL EXTRACTO	Nº	SUSTANCIA ENSAYADA	CONTROL POSITIVO (CN) R ≤ 13 I 13-14 S ≥ 15	CONTROL NEGATIVO
***Pseudomona aeruginosa ATCC* (27853)**	Hexánico	1/100	1	-	21mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	22mm	-
		1/1000	1	-	21mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	21mm	-
		1/10000	1	-	22mm	-
			2	-	22mm	-
			3	-	24mm	-
	Etanólico	1/100	1	-	21mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	21mm	-
		1/1000	1	-	21mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	21mm	-
		1/10000	1	-	21mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	21mm	-
	Acuoso	1/100	1	-	22mm	-
			2	-	22mm	-
			3	-	22mm	-
		1/1000	1	-	22mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	22mm	-
		1/10000	1	-	21mm	-
			2	-	23mm	-
			3	-	23mm	-

Leyenda: mm, milímetros; CN, gentamicina.
Fuente: Registro de resultados del Laboratorio de Microbiología – CISAQ.
Autor: Jhon Castillo.

INTERPRETACIÓN:

La presente tabla de resultados nos muestra que las diluciones ensayadas (sustancia ensayada) 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora (L.) G. Don* (Cholo valiente) no presentaron halos de inhibición frente a *Pseudomona aeruginosa ATCC* (27853) empleando el método de difusión con disco. Los controles positivos (sensidiscos de gentamicina) presentaron halos de inhibición de 21 a 23 mm, considerándose como sensibles para el microorganismo ensayado; contrariamente los discos de control negativo no presentaron halos de inhibición. La concentración mínima inhibitoria y bactericida no se realizó al obtener resultados negativos con la sustancia ensayada.

TABLA # 5

Actividad antifúngica de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* frente a *Cándida albicans* ATCC (26790)

MICROORGANISMO	EXTRACTO *Hippobroma longiflora-Raíz*	DILUCIÓN DEL EXTRACTO	Nº	SUSTANCIA ENSAYADA	CONTROL POSITIVO (FL)	CONTROL NEGATIVO
***Cándida albicans* ATCC (26790)**	Hexánico	1/100	1	-	20mm	-
			2	-	20mm	-
			3	-	20mm	-
		1/1000	1	-	20mm	-
			2	-	20mm	-
			3	-	20mm	-
		1/10000	1	-	20mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	21mm	-
	Etanólico	1/100	1	-	21mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	20mm	-
		1/1000	1	-	20mm	-
			2	-	20mm	-
			3	-	21mm	-
		1/10000	1	-	21mm	-
			2	-	20mm	-
			3	-	20mm	-
	Acuoso	1/100	1	-	20mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	20mm	-
		1/1000	1	-	20mm	-
			2	-	20mm	-
			3	-	21mm	-
		1/10000	1	-	20mm	-
			2	-	21mm	-
			3	-	21mm	-

Leyenda: mm, milímetros; FL, fluconazol.
Fuente: Registro de resultados del Laboratorio de Microbiología – CISAQ.
Autor: Jhon Castillo.

INTERPRETACIÓN:

La presente tabla de resultados nos muestra que las diluciones ensayadas (sustancia ensayada) 1/100, 1/1000 y 1/10.000 de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora (L.) G. Don* (Cholo valiente) no presentaron halos de inhibición frente a *Cándida albicans* ATCC (26790) empleando el método de difusión con disco. Los controles positivos (sensidiscos de fluconazol) presentaron halos de inhibición de 20 a 21 mm, considerándose como sensibles para el microorganismo ensayado; contrariamente los discos de control negativo no presentaron halos de inhibición. La concentración mínima inhibitoria y bactericida no se realizó al obtener resultados negativos con la sustancia ensayada.

7. DISCUSIÓN

Al término del estudio, se determinó que las diluciones 1/100, 1/1000, 1/10000 de los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don, frente a las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (25923), *Escherichia coli* (25922), *Pseudomona aeruginosa* (27853), *Klebsiella pneumoniae (13883) y Cándida albicans* (26790) no poseen actividad antimicrobiana con el método de difusión en agar con disco; los discos utilizados como control positivo presentaron los halos de inhibición esperados y los controles negativos no mostraron halos de inhibición, lo que permitió comprobar que el método empleado estuvo bien aplicado y los resultados obtenidos son confiables.

En el año 2012, Edith Miranda y Judith Espinosa realizaron un estudio titulado "Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum L., Pterocarpus hayesii L., Tynanthus guatemalensis L. y Spondias purpurea L*." en el cual se empleó el mismo método de evaluación antimicrobiana (método de difusión con disco). Ambos investigadores utilizaron las hojas y la corteza de cada una de las plantas como también los solventes hexano y etanol. Los extractos se probaron con los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Bacillus cereus* ATCC 11778. Los extractos hexánicos de las hojas de las plantas presentaron actividad antimicrobiana al menos con uno de los microorganismos evaluados, mientras que los extractos hexánicos de corteza no presentaron actividad contra ninguno de los tres microorganismos ensayados. Hay que destacar que las diluciones de los extractos que se emplearon en este estudio fueron de 2/100 **(61).**

En el estudio mencionado se utilizó el mismo procedimiento que se empleó para evaluar la actividad antimicrobiana (método de difusión en agar con disco) y se obtuvieron resultados positivos, pero se utilizaron otras diluciones en los extractos, por lo cual no se descarta que el estudio con *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don no posea actividad antimicrobiana ya que no se han evaluado otras diluciones ni otros métodos.

En el año 2010, Sulca Tania realizó un estudio titulado “Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de Acmella repens (Botoncillo), Urtica dioica (Ortiga negra) y Sonchus oleraceus (Kana yuyo), plantas registradas en la parroquia La Esperanza – Imbabura, contra Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa y Candida albicans, causantes de enfermedades bucofaríngeas.” en el cual se utilizaron extractos acuosos, etanólicos y hexánicos de cada una de las plantas en diluciones 25/100, 50/100 y 80/100 aplicando el metodo de difusion en agar con discos húmedos y secos. El extracto etanólico de *Acmella repens* en la dilucion 50/100 presentó inhibición del crecimiento fúngico de *Candida albicans,* mientras que los extractos de *Urtica dioica var. Leptophylla* (dilución 50/100) y *Sonchus oleraceus* (dilución 80/100) presentaron inhibición el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* respectivamente **(62).**

En el estudio citado se utilizaron diluciones diferentes a los extractos, como tambien discos humedos, a diferencia del presente trabajo de tesis, por lo tanto no se anula la posibilidad de obtener resultados positivos, empleando otras diluciones y variaciones en el método utilizado.

8. CONCLUSIONES

Conforme a los resultados obtenidos en la presente investigación se establecieron las siguientes conclusiones:

- Los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz 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 con disco.

- Los extractos hexánico, etanólico y acuoso de la raíz 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 *Candida albicans* (ATCC 26790), mediante el método de difusión en agar con disco.

- Los resultados del presente trabajo de tesis fueron socializados a los estudiantes de II ciclo y V módulo de la carrera de Laboratorio Clínico el día lunes, 11 de noviembre de 2013 en sus respectivas aulas de clases.

9. RECOMENDACIONES

- El presente trabajo investigativo solo ha evaluado determinadas concentraciones de los extractos obtenidos (1/100, 1/1000, 1/10000) y el método de difusión con disco, por lo cual queda a consideración, la evaluación de la actividad antimicrobiana empleando otras concentraciones y otros métodos.

- Aplicar correctamente los protocolos establecidos en todo trabajo investigativo para obtener resultados reproducibles y confiables.

- Aplicar las normas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología preservando la integridad del analista clínico.

- Realizar un estricto control de calidad a los materiales y equipos utilizados en el trabajo de investigación, como también verificar el mantenimiento respectivo.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. **Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Municipio de Loja y Naturaleza y Cultura Internacional.** Perspectivas del medio ambiente urbano: GEO Loja. Loja : s.n., 2007, págs. 96-97.

2. **Macas, R.** *Investigacion y puesta en marcha de los recursos gastronómicos del cantón Zamora.* Primera. Zamora : GAD Zamora, 2010. pág. 5.

3. *Las plantas medicinales.* **Hernández, A.** 1-2, Noviembre de 2008, Biiocenosis, Vol. 21, pág. 21.

4. *Medicina tradicional.* **Universida Tecnológica de Pereira.** 1, Abril de 2008, Scentia et Technica, Vol. 18.

5. **Rey, Jorge.** [En línea] [Citado el: 20 de Junio de 2013.] http://edis.ifas.ufl.edu/in731.

6. **Seija, V y Vignoli, R.** *Principales grupos de antibióticos.* [En línea] http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf.

7. **ECURED.** *Uso de plantas medicinales.* [En línea] 2013. http://www.ecured.cu/index.php/Uso_de_plantas_medicinales.

8. **Serrano, M.** *Manual de plantas medicinales.* [ed.] C Garcia. Primera. España : Fundación de religiosos para la salud, 2012. pág. 7.

9. **Verda, S.** *Pobles Harmonía.* [En línea] 2007. [Citado el: 22 de 05 de 2013.] http://www.poblesharmonia.org/?p=476&lang=es.

10. *Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal.* **ESPOL.** 1, Diciembre de 2010, Revista tecnológica ESPOL, Vol. 23, pág. 90.

11. **Organización Mundial de la Salud Ginebra.** *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.* [En línea] 2005. [Citado el: 28 de Junio de 2013.] http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf.

12. **Estado Plurinacional de Bolivia.** *Biblioteca virtual de pueblos indígenas .* [En línea] 2010. [Citado el: 20 de Junio de 2013.] http://pueblosindigenas.bvsp.org.bo/php/level.php?lang=es&component=50&item=3.

13. *Medicina alternativa: intento de análisis.* **Peña, A y Paco, O.** 1, 2007, Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Vol. 68, págs. 88-89. 1025-5583.

14. **Brien, Giddens y Bucher.** *Enfermería Medicoquirúrgica.* [ed.] R Álvarez. Sexta. España : Editorial Elsevier, 2004. pág. 101.

15. **Mier, A, Trejo, O y A, Yáñez.** *Medicina tradicional.* Primera. Mexico : Publicaciones Medx, 2012. págs. 10-26.

16. **FAO.** *Conservación de los recursos naturales para una agricultura sostenible.* [En línea] 2010. [Citado el: 13 de Julio de 2013.] http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/ba/organic_matter.pdf.

17. **Muños, F.** *Plantas medicinales y aromàticas estudio cultivo y procesado.* Madrid : Mundi Prensa libros S.A., 2008. págs. 15.19-20.

18. **Tirado, D y Alcazar, L.** *Compuestos bioactivos.* Ingenieria de alimentos, Universidad de Cartagena. Cartagena : s.n., 2010. págs. 5-9-13, Tesis doctoral.

19. **Bague, A y Alvaréz, N.** *Tecnología farmaceutica.* Primera. España : Editorial Club Universitario, 2005. pág. 340. ISBN 978-84-9948-334-4.

20. **SIGRE Medicamento y medio ambiente.** *Medicamento.* [En línea] 2011. [Citado el: 14 de Julio de 2013.] http://www.sigre.es/Diccionario/25-MEDICAMENTO/.

21. *Actividad antimicrobiana de plantas.* **Díaz, J y Asencios, R.** 1, Enero de 2008, Del alba.

22. **Bailey y Scott.** *Diagnóstico microbiológico.* Decimo segunda. Madrid : Editorial Médica Panamericacna, 2007. pág. 194.

23. *Actividad antimicotica y citotoxica de aceites esenciales.* **Zapata, B, y otros.** 2, Enero de 2010, Revista Iberoamericana de Micología, Vol. 27.

24. *Actividad antifungica de extractos de plantas usadas en medicina.* **Davicino, R, Mattar, M y Casali, Y.** 14, Diciembre de 2007, Scielo, Vol. 2, pág. 247.

25. **Tapia, J.** *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y subextractos clorofórmico y etereo de Senna multijuga, Tagetes zipaquirensis y Coursetia dubia.* Escuela de Bioquímica y Farmacia, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Quito : s.n., 2012. pág. 11, Tesis.

26. *Pantas con actividades antiinflamatorias.* **Garcia, L, y otros.** 3, Julio de 2002, Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, Vol. 21.

27. **Craig, W.** *Fitoquímicos guardianes de nuestra salud.* [En línea] 2006. [Citado el: 20 de Junio de 2013.] http://www.unionvegetariana.org/fitoquim.html.

28. **Lock, O.** Analisis fitoquímico y metabolitos secundarios. *Fitoterapia.* Lima : TEXCOM, 2006, pág. 24.

29. *Plantas con acción antimicrobiana.* **Domingo, D y Lopez, M.** 4, Diciembre de 2003, Revisión Especial Quimioteraoia, Vol. 16, pág. 386.

30. *Metabolitos secundarios de las plantas.* **Valle, C.** Febrero de 2008, Psicoactiva. Revista electrónica.

31. *Componentes quimicos de las plantas medicinales de valor biologico y farmacologico.* **Morales, J.** RevistaCiencias.com. Revista electrónica. Codigo ISPN: EFPUPPZZKVBDOMPCEL.

32. **Marcano, D y Hasegawa, M.** *Fitoquímica orgánica.* [ed.] M Urbina. Segunda. Venezuela : Torino, 2002.

33. **Causee, C.** *Los secretos de salud de los antioxidantes.* Primera. Monaco : HispanoEuropea, 2010. pág. 44.

34. **Gil, A.** *Tratado de nutrición.* Segunda. Españ : Editorial Médica Panamericana , 2010. pág. 414. 978-84-9835-347-1.

35. **Hidalgo, J.** *Tratado de etnología.* Primera. Madrid : Grupo Mundi Prensa, 2010. págs. 410-534.

36. **Universidad de Philadelphia.** *Farmacia Reminton.* Vigesima. Montevideo : Editorial Médica Panamericac, 2003. pág. 477.

37. *Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana.* **Palavecino, E.** 3, Boletin de la Escuela de Medicina , Vol. 26.

38. **Sociedad Española de Enfermedades.** *Procedimientos en Microbiología Clínica .* [En línea] 2010. [Citado el: 29 de Junio de 2013.] http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap11.htm.

39. **Koneman, R.** *Diagnóstico microbiológico.* España : Medica Panamericana, 2008. pág. 340.

40. **Seminario de antibióticos.** *Los antibióticos .* [En línea] [Citado el: 30 de Junio de 2013.] http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm.

41. **Olivas, E y Alarcón, L.** *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos.* [ed.] M González. Segunda. México : Univarsidad autónoma de Ciudad Juaréz, 2004. págs. 19-20.

42. **Soria, A.** *Analisis microbiológico. Medios de Cultivo.* Peru : Universidad Nacional San Luís Gonzaga de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquìmica. págs. 3-5.8-10. Archivo PDF. http://es.scribd.com/doc/29302476/Medios-de-Cultivo.

43. **Zorbax, Publicado por.** *Medios de cultivo y pruebas bioquímicas.* Documento electrónico. 20 Ene 2013. http://es.scribd.com/doc/5203044/Medios-de-Cultivo-y-Pruebas-Bioquimicas.

44. **Biobacter Medios y reactivos.** *Agar Tripticasa de soya.* Abril 2008. pág. 1. Archivo PDF. 01 Feb 2013. http:// media.wix.com/.../6c7b7a6fe2a40ee8f1763333262c50ea.ugd?....

45. **BD.** *Instrucciones de uso - Medios en placa listos para usar.* Sep 2011. pág. 1. Archivo PDF. 21 Ene 2013. http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8794. PA-254419.05.

46. **Montoya, M.** *Las cepas ATCC .* Microbiología Clínica, Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Cali : s.n. pág. 2, Archivo PDF.

47. **Garcia, S. Acevedo, C. Bennani, A.** *Técnicas para la detección de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en el laboratorio de Microbiología.* Madrid : Asociación Eapañola de Farmaceuticos Analistas, 2005. págs. 74-75, Archivo PDF. 3-28010.

48. **Faleiro, P.** *Formación de biopelículas por Escherichia Coli y su correlación con factores de virulencia: prevencion y actividad de antimicrobianos frente a organismos planstónicos y asociados a biopelículas.* Madrid : s.n., 2010. págs. 26-27, Tesis doctoral. 978-84-692-8575-6.

49. **CODEINEP (Control de infecciones y Epidemiología).** *Klepsiella pneumoniae.* 02-02-2013. http://www.codeinep.org/control/Klebsiella_pneumoniae_ii.pdf.

50. **Arenas, R.** *Micologìa médica ilustrada.* México : Mc Graw Hill Interamericana, 2008. pág. 683.685.

51. **Valcesia, M.** *Terapéutica antiinfecciosa Generalidades.* [En línea] [Citado el: 27 de 06 de 2013.] http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/clas2do/16_atb_marco_concp08.pdf.

52. **Rodríguez, V.** *Prácticas de Microbiología.* [En línea] [Citado el: 25 de Mayo de 2013.] http://egg.umh.es/frvalera/manualDePracticas.pdf.

53. **Negroni, M.** *Microbiología estomatológica.* Segunda. Madrid : Editorial Médica Panamericana, 2009. pág. 562.

54. *Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen animal.* **Ramirez, L.** 45, Agosto de 2009, Scientia at Technica, Vol. XV, pág. 266.

55. **Cavallini, E, y otros.** *Bacteriología general.* Primera. Argentina : Universidad de Costa Rica, 2005. pág. 339.

56. **Sensibilidad, Comité Europeo de Estudios de.** *Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos - Método de difusión con discos.* 2010. págs. 4-13. Archivo PDF. Versión 1.1.

57. **Baldwin, R.** *Hawai Poisonous Plants.* U.S.A : Hawaii: The Petroglyph Press Ltd, 2010. pág. 26.

58. *Distribución y fenología de Hippobroma longiflora y Clematis acapulsensis.* **Moreira. Ileana. Arnaez, E.** Costa Rica : Tecnològica, 2004, Vols. 17-4, pág. 37.40. 0379-3982.

59. **Milecri, M.** *Hippobroma.* s.l. : Wikipedia, 04 Nov 2008. http://es.wikipedia.org/wiki/Hippobroma.

60. *Estudio preliminar de la Biología reproductiva de Clematis acapulsensis y Hippobroma longiflora .* **Moreira, I y Arnaez, E.** 1-3, Marzo de 2004, Mesoamericana, Vol. 8, pág. 53.

61. *Actividad antimicrobiana de extractos de extractos de Psidium friedrichsthalianum L., Pterocarpus hayesii L., Tynanthus guatemalensis L. y Spondias purpurea L.* **Miranda, Edith y Judith, Espinosa.** 4, Santiago de Chile : Redalyc, 2012, Vol. 11, págs. 354 - 361.

62. **Sulca, Tania.** Determinación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Acmella repens (Botoncillo), Urtica dioica (Ortiga negra) y Sonchus oleraceus (Kana yuyo) (...) sobre

Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa y Candida albicans (...). *REDALYC.* [En línea] 21 de 11 de 2010. [Citado el: 28 de 10 de 2013.] repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2648/1/T-ESPE-030037.pdf.

63. **Prat, M.** Novedades CLSI 2012 I Parte. [En línea] Ministerio de Salud Pública de Chile, Mayo de 2012. [Citado el: 15 de Noviembre de 2013.] Pag. 13.. http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/2012/presentamicrobiologia/micro_8_def.pdf.

64. —. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. [En línea] Instituto de Salud Pública de Chile, Marzo de 2010. [Citado el: 19 de Noviembre de 2013.] Pag. 20.. http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf.

11. ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Certificado de realización del trabajo de campo en el laboratorio de la Unidad de Fitoquímica y Microbiología del CISAQ.	**77**
ANEXO 2 Certificado de identificación taxonómica de la planta de estudio.	**79**
ANEXO 3 Certificados de autorización para la difusión de resultados.	**81**
ANEXO 4 Certificados de difusión de resultados.	**84**
ANEXO 5 Registros de asistencia a la difusión de resultados.	**87**
ANEXO 6 Trípticos de difusión de resultados.	**93**
ANEXO 7 Formato de registro de actividades en el laboratorio de la Unidad de Fitoquímica y Microbiología del CISAQ.	**96**
ANEXO 8 Formato de registro de resultados de actividad antimicrobiana.	**98**
ANEXO 9 Fotografías de los procedimientos realizados.	**100**
ANEXO 10 **PROTOCOLOS DEL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE FITOQUÍMICA DEL CISAQ:** **Protocolo N.- 001:** Instructivo para la colecta de drogas. **Protocolo N.- 002:** Obtención de extractos de plantas medicinales por maceración. **Protocolo N.- 003:** Operación de concentración en rotavapor.	**118**
ANEXO 11 **PROTOCOLOS DEL LABORATORIO DE LA UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA:** **Protocolo N.- 001:** Bioseguridad.	**125**

Protocolo N.- 002: Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar sangre. **Protocolo N.- 003:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Mac-Conkey. **Protocolo N.- 004:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Mueller Hinton. **Protocolo N.- 005:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: Agar Chapman Manitol. **Protocolo N.- 006:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Cetrimide. **Protocolo N.- 007:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: caldo Tripticasa de Soja. **Protocolo N.- 008:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Tripticasa de Soja. **Protocolo N.- 009:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: agar Dextrosa Sabouraud. **Protocolo N.- 010:** Procedimientos para la preparación de medio de cultivo: caldo agar de Infusión Cerebro Corazón. **Protocolo N.- 011:** Procedimientos para la preparación del medio citrato de Simmons. **Protocolo N.- 012:** Procedimientos para la preparación del medio triple azúcar hierro (TSI). **Protocolo N.- 013:** Procedimientos para la preparación del medio Sulfuro Indol Movilidad (SIM). **Protocolo N.- 014:** Procedimientos para la preparación del medio de fenilalanina desaminasa. **Protocolo N.- 015:** Procedimiento para la realización de la prueba de Catalasa. **Protocolo N.- 016:** Procedimiento para la realización de la prueba de Coagulasa. **Protocolo N.- 017:** Procedimiento para la realización de la prueba de identificación micótica: KOH.	

Protocolo N.- 018: Procedimiento para la realización del test de filamentación. **Protocolo N.- 019:** Procedimiento para la realización de la tinción de Gram. **Protocolo N.- 020:** Procedimiento para la preparación del patrón n.- 5 de Mac Farland. **Protocolo N.- 021:** Procedimiento para la preparación del Inóculo. **Protocolo N.- 022:** Viabilización y conservación de *Staphylococcus aureus*. **Protocolo N.- 023:** Viabilización y conservación de *Escherichia coli.* **Protocolo N.- 024:** Viabilización y conservación de *Klebsiella pneumoniae*. **Protocolo N.- 025:** Viabilización y conservación de *Pseudomona aeruginosa***.** **Protocolo N.- 026:** Viabilización y conservación de *Cándida albicans*. **Protocolo N.- 027:** Preparación de discos de sensibilidad. **Protocolo N.- 028:** 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 realización del trabajo de campo en el laboratorio de la Unidad de Fitoquímica

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Dirección de investigaciones
Laboratorio de Análisis Quimico
Unidad de Fitoquimica

Loja, 27 de Noviembre del 2013

Dr. Luis Morocho Yaguana
RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE FITOQUÍMICA DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO-UNL.

CERTIFICA:

Que el egresado Jhon Fernando Castillo Rojas 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 la raiz de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el método de difusión en agar"**, el mismo que lo realizó desde el 15 de enero al 21 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 Fitoquimica-LAQ

Anexo 2

Certificado de identificación taxonómica de la planta de estudio

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES
JARDIN BOTÁNICO Y HERBARIO "REINALDO ESPINOSA"

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

HERBARIO LOJA U.N.L.

Ing. Zhofre Aguirre Mendoza M.Sc.
DIRECTOR DEL HERBARIO

Bolívar Merino
TÉCNICO DEL HERBARIO

Anexo 3

Certificados de autorización para la difusión de resultados

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

Ofic. Cir. N° 913- 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 **JHON FERNANDO CASTILLO ROJAS,** 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 tres extractos de la raiz 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
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° 913- 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 **JHON FERNANDO CASTILLO ROJAS,** 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 tres extractos de la raiz 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
COORDINADORA (E) DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

cc. archivo

Elaborado: María Jiménez

Anexo 4

Certificados 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 Castillo Rojas Jhon Fernanado, con numero de cedula 0104679204, 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 la raiz 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. Maria Susana Gonzales Garcia

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

Certifica:

Que el egresado Castillo Rojas Jhon Fernanado, con numero de cedula 0104679204, de la carrera de Laboratorio Clinico 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 la raiz de *Hippobroma longiflora* (L.) G. Don (Cholo valiente), por el metodo 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 Garcia

DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

Anexo 5

Registros de asistencia a la difusión de resultados

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
Gaban Lopez	[illegible]	Lab Clínico	V	
Kleber Yarrachumbe	[illegible]	Lab. Clínico	V	
Gustavo Rafrio	[illegible]	Lab. Clínico	V	
Alexis Carrión	[illegible]	Lab Clínico	V	
Karen P. Lagarti	1105140840	Lab Clínico	V	
Gisella Velasco	[illegible]	Lab clínico	V	
Jhon Tipan	[illegible]	[illegible]	V	
Evelin Cuenca	1104766204	Laboratorio Clínico	V	
Carol Chillogalle	1058004951	Lab Clínico	V	
William Guamán	1104618477	Lab Clínico	V	
Wilker Salas	[illegible]	Lab. Clínico	V	
Nathaly Estrella	[illegible]	Lab. Clínico	V	
Walter Cordero	[illegible]	Lab. Clínico	V	
Alex Villavicencio	[illegible]	Lab. Clínico	V	
Marlon Bravo	[illegible]	Lab. Clínico	V	

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
[illegible]	[illegible]	Laboratorio Clínico	V	
[illegible]	[illegible]	Laboratorio Clínico	V	
[illegible]	[illegible]	Lab Clínico	V	
[illegible]	[illegible]	Lab Clínico	V	
[illegible]	[illegible]	Lab Clínico	V	
Pablo Andrés Villavicencio	1104511339	Laboratorio Clínico	V	
Karla Armijos Macas	1104612264	Laboratorio Clínico	V	
[illegible]	[illegible]	Laboratorio Clínico	V	
[illegible]	[illegible]	Lab Clínico	V	

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
Andrea Cecilia Jiménez	1100906407	Laboratorio Clínico	V	
Glenda Soto	1105116527	Laboratorio Clínico	V	
Irene Sugilanda	1105634632	Lab. Clínico	V	
Cristian Luna	1104378563	Lab. Clínico	V	
Jaime Ruiz Armijos	1105266668	Laboratorio Clínico	V	
Carmen Gladys Castillo	1105194430	Lab. Clínico	V	
Dagmito Andrade	1104493257	Lab. Clínico	V	
Margoth Guirado	1105646004	Lab. Clínico	V	
Gabriela Maria A	1104786130	Laboral Clínico	V	
Liliana Jima S.	1105332670	Laboral Clínico	V	
Dayra Lunto S.	1104033111	Laboral Clínico	V	

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
Jonathan Vargas	1104712502	Laboratorio Clínico	II	
Jonathan Arcapiña	1104518892	Lab. Clínico	II	
María Virginia Mora	0706697949	Lab. Clínico	II	
Rubelli Mauricio Cardenas	1900478688	Lab. Clínico	II	
Miguel Soto	1105777757	Lab. Clínico	II	
Miriam A. Tucto Y.	1108009516	Lab. Clínico	II	
Estefanía Chacón	0706173384	Laboratorio Clínico	II	
Mayon Oramba		Laboratorio Clínico	II	
María Cordero	1106021887	Laboratorio Clínico	II	
Adriana Sánchez Jaramillo	1150142346	Laboratorio Clínico	II	
Gabriela Jiménez Soto	1900474114	Laboratorio Clínico	II	
Andy Aaron Chávez Tiburcio	1104669309-3	Laboratorio Clínico	II	
Adrián Flores	0706142993	Laboratorio Clínico	II	

REGISTRO DE ASISTENCIA DE LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

NOMBRE	NUMERO DE CEDULA	CARRERA	MODULO	FIRMA
David Andres	1104809172	Laboral Clínica	II	
Lady Viviana	1150123344	Laboral Clínica	II	
Glenda Monocho	1900815095	Laboral Clínica	II	
Lady Sedia	[illegible]	Laboral Clínica	II	
Sofia Serrano	1104622167	Lab. Clínico	II	
Xavier Gordillo	1104357346	Lab. Clínico	II	
Katherine Mitaguero	1105776209	Lab. Clínico	II	
Shirley Lucero	1104156257	Lab. Clínico	II	
Jessica Chamaicho	1106557417	Lab. Clínico	II	
Jenny Elizabeth Erraez	1105[illegible]	Lab. clínico	II	
Jasmina Ordóñez	1100497630	Lab. Clínico	II	
Daniela Armijos	1150004172	Lab. Clínico	II	

Anexo 6

Tríptico de difusión de resultados

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 presentó actividad detectable a las concentraciones evaluadas según la metodología descrita. Considerándose que se pueden realizar otros estudios a mayor concentración y utilizando otros métodos.

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

E. coli

S. aureus

P. aeruginosa

K. pneumoniae

C. albicans

CONCLUCIONES

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

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

TEMA:

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

OBJETIVO GENERAL:

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

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

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

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

METODOLOGÍA

- **Tipo de estudio**

La presente investigación es de tipo descriptivo, experimental.

- **Área de estudio**

La provincia de Zamora Chinchipe

- **Universo**

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

- **Muestra**

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

- **Criterio de inclusión**

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

PROCESAMIENTO DE PLANTA

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

El material recolectado se lavó con hipoclorito de sodio al 0,5% según el protocolo de lavado de plantas del Laboratorio de Fitoquímica.

1.-La viabilización se realizó con 0,5 ml de infusión cerebro corazón

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

3.-Los discos se [illegible] con ayuda del filtro Whatman N° 3, usando un sacabocados de 6 mm [illegible] a los cuales, se les impregnaron [illegible] 10 [illegible] extracto para una concentración [illegible] y 7 mg [illegible].

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

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

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

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se maceró 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 ANTIMICÓTICA

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

Anexo 7

Formato de registro de actividades en el laboratorio de la Unidad de Fitoquímica

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Laboratorio de Análisis Químico: Unidad de Fitoquímica

Registro de tutorías/Trabajo en Laboratorio

Fecha	Horas		Tema tutoría/Actividad	Nombre Estudiante	C.I.	Firma	Novedades
	Inicio	Fin					

f: _____

Dr. Luis A. Morocho

f: _____

Coordinador/Responsable Administ.

Anexo 8

Formato de registro de resultados de actividad antimicrobiana.

PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIMICOTICA DE TRES EXTRACTOS (HEXÁNICO, ETANÓLICO Y ACUSO) DE RAICES DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA* (CHOLO VALIENTE).

FECHA:

HONGO ATCC:

ANTIBIÓTICO:

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

Anexo 9

Fotografías de los procedimientos realizados

RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL *HIPPOBROMA LONGIFLORA*

LAVADO DE LA RAÍZ DE HIPPOBROMA LONGIFLORA

SECADO DE LA RAÍZ DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA*

DIGITHEAT

RAICES
HIPPOBROMA LONGIFLORA

MOLIENDA DE LA RAÍZ DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA*

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO, ETANÓLICO Y ACUOSO DE LA RAÍZ DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA*

50gr de planta en
500ml de Etanol

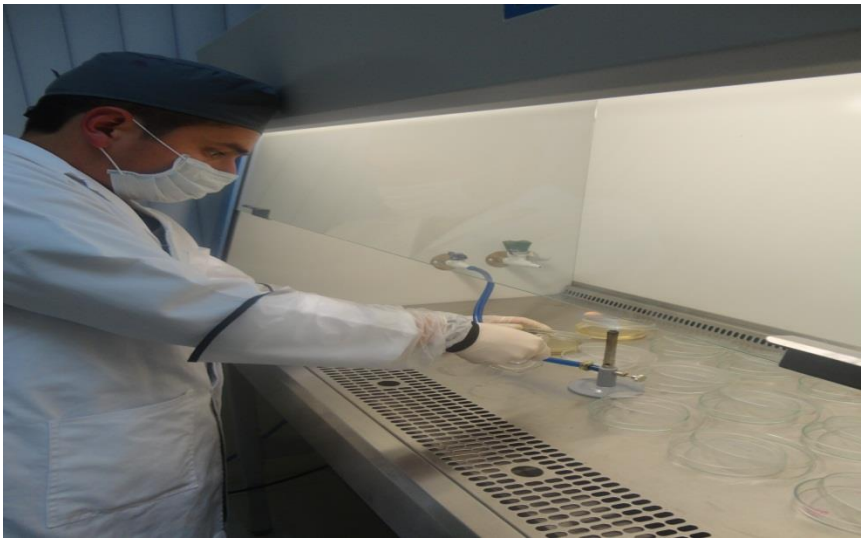
RAICES

HOJAS
HIPPOBROMA LONGIFLORA
BM100

Labotec

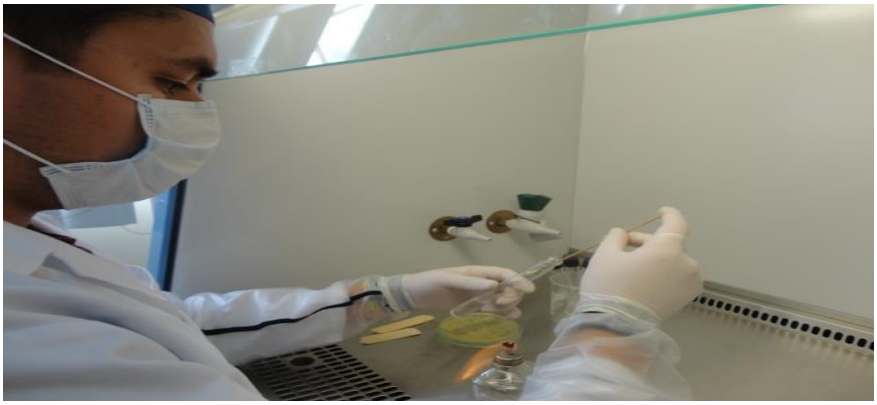
EXTRACTO
RAICES H.L.
30-01-2013
ADAM
81.83 g
Print
Mode
Smpl
%
Tare
Zero
On/off

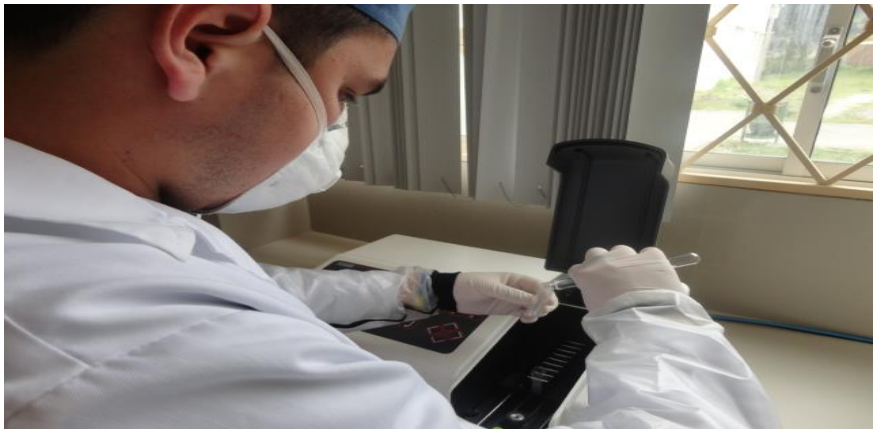
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



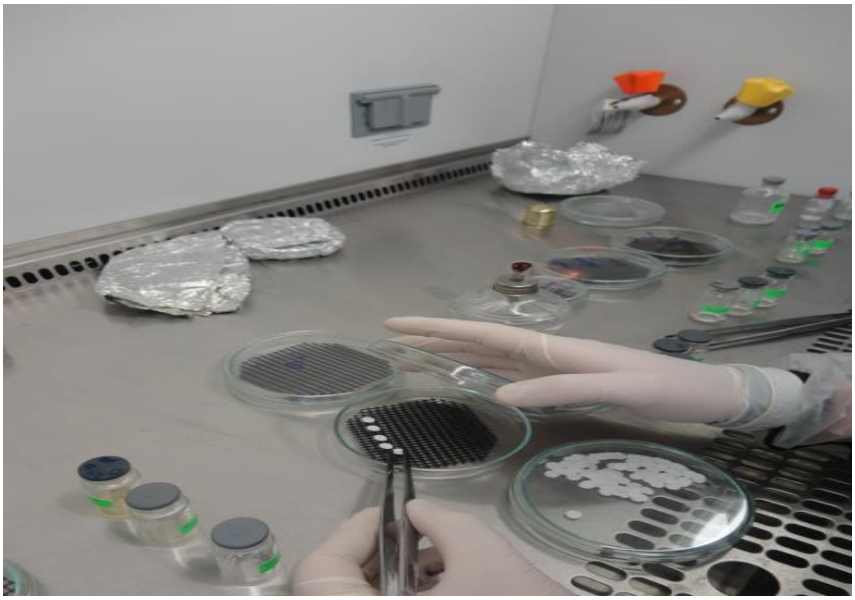
PREPARACIÓN DEL TUBO 0,5 DE LA ESCALA MAC FARLAND

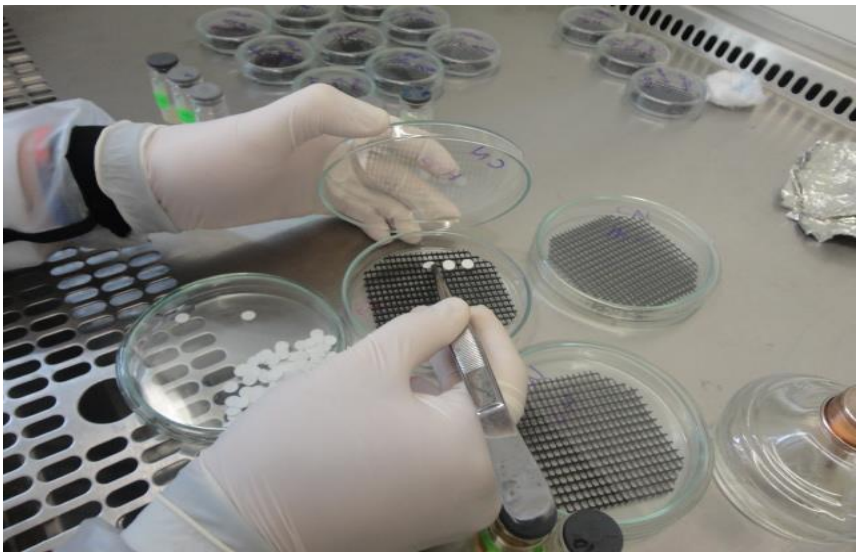
PREPARACIÓN DEL INÓCULO



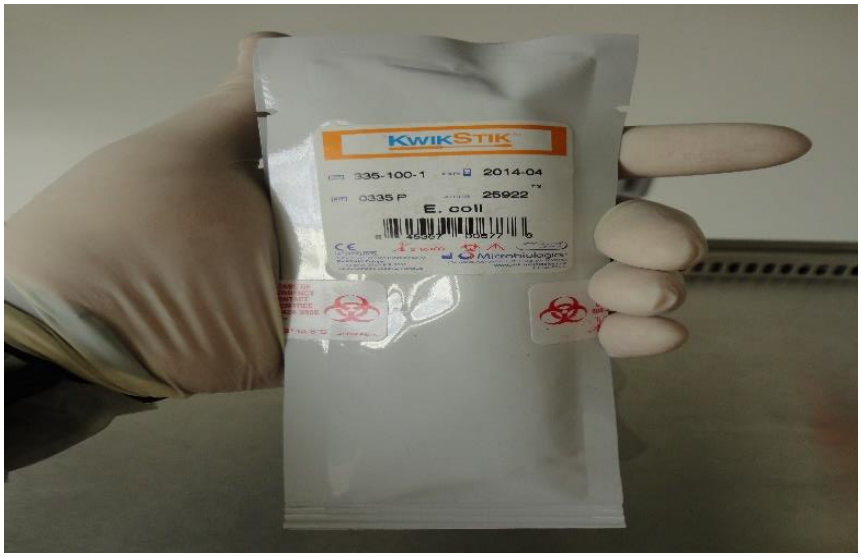


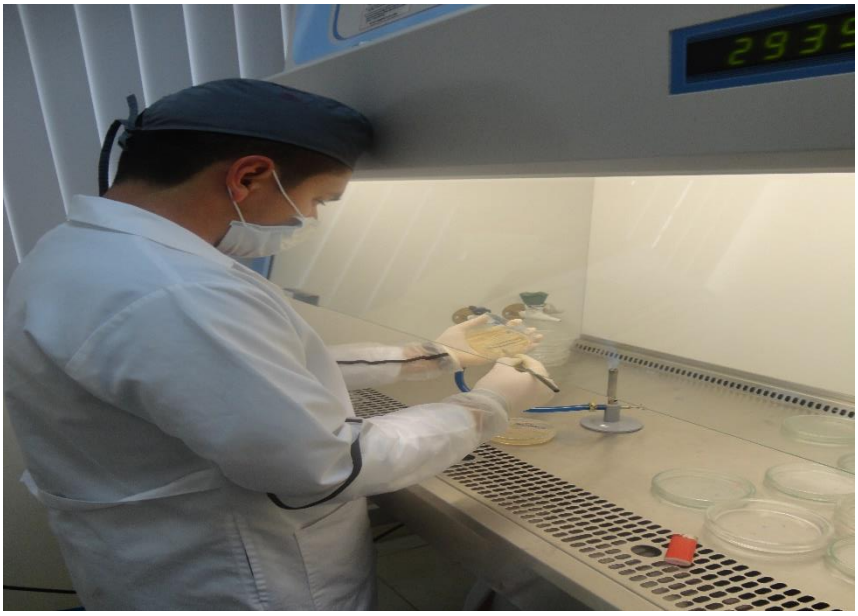
ANTIBIOGRAMA – MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO



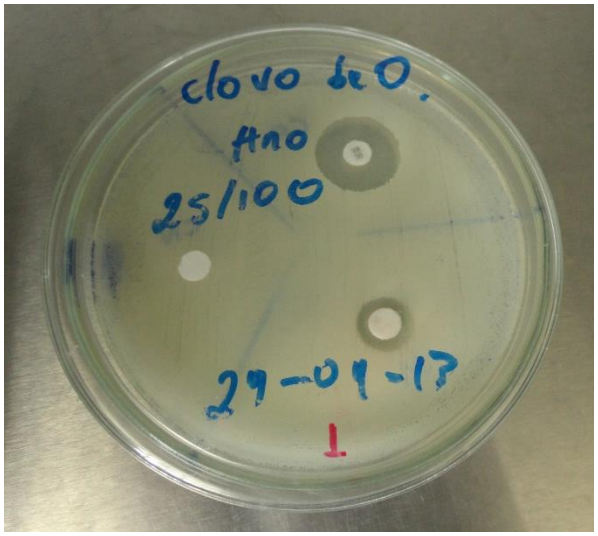


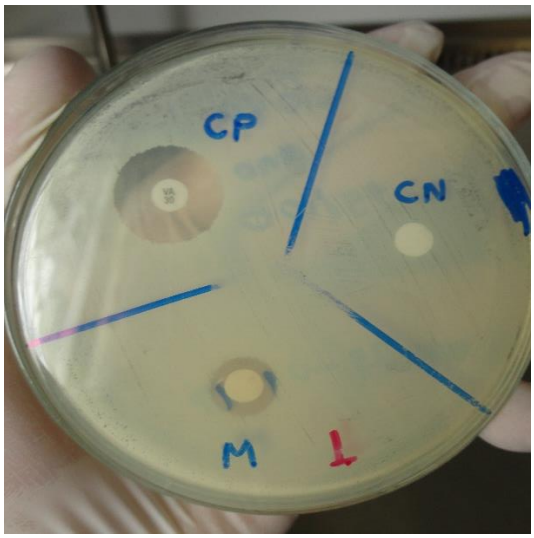
VIABILIZACION DE CEPAS ATCC

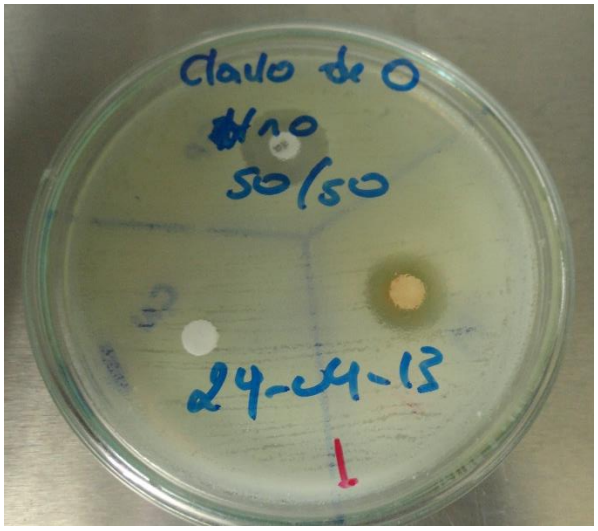


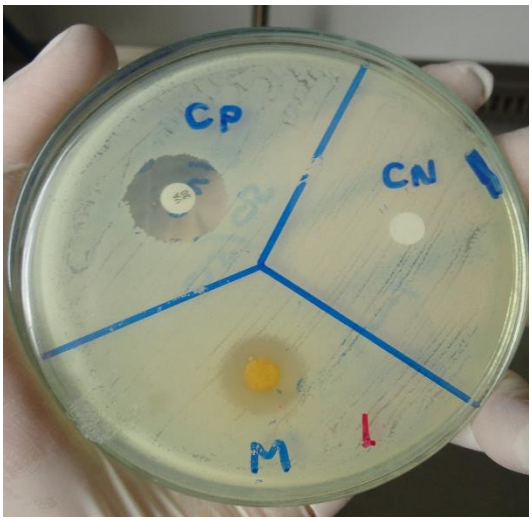


RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA CON *SYZYGIUM AROMATICUM* (CLAVO DE OLOR) - PLANTA DE REFERENCIA

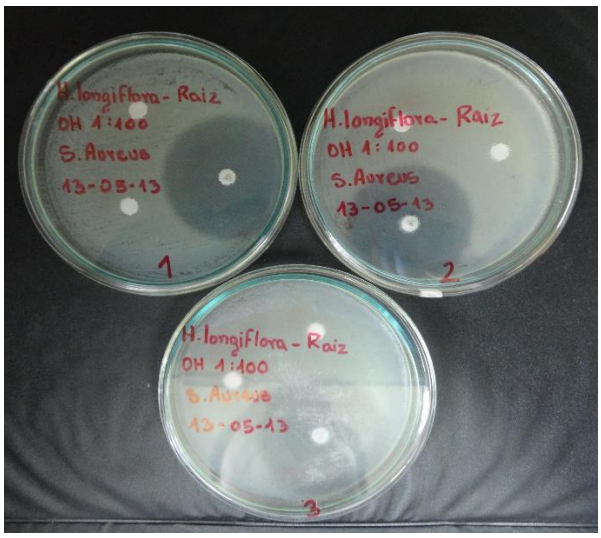


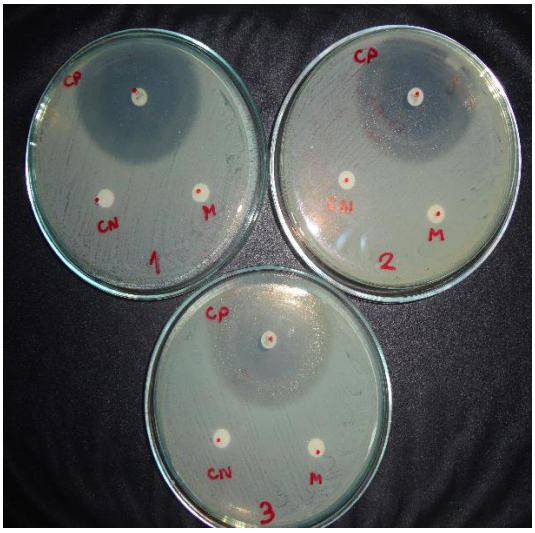


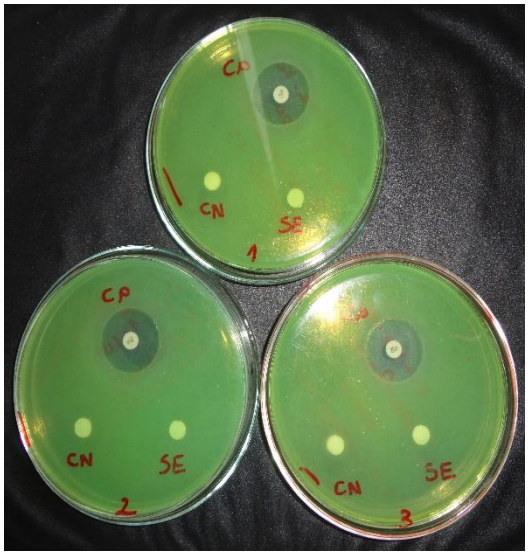


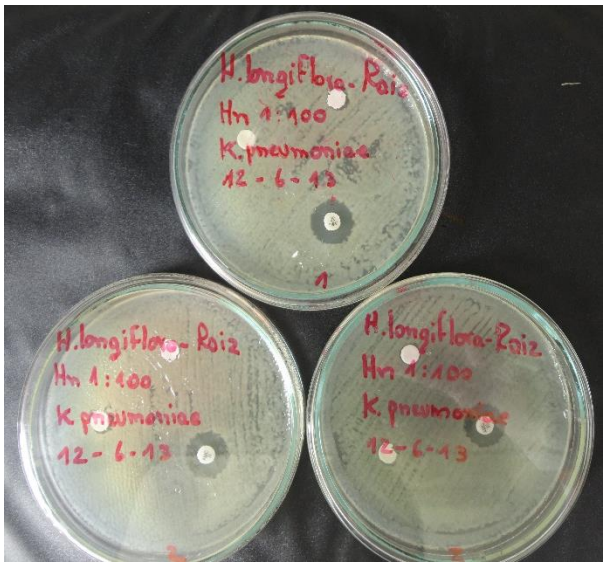


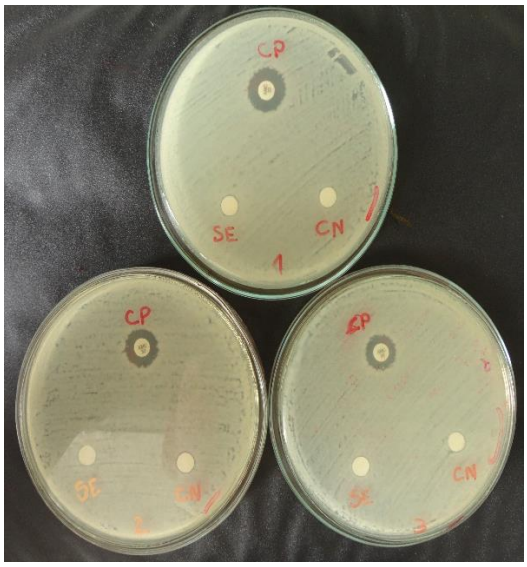
ANTIBIOGRAMA DE LA RAÍZ DE *HIPPOBROMA LONGIFLORA* – PLANTA DE ESTUDIO



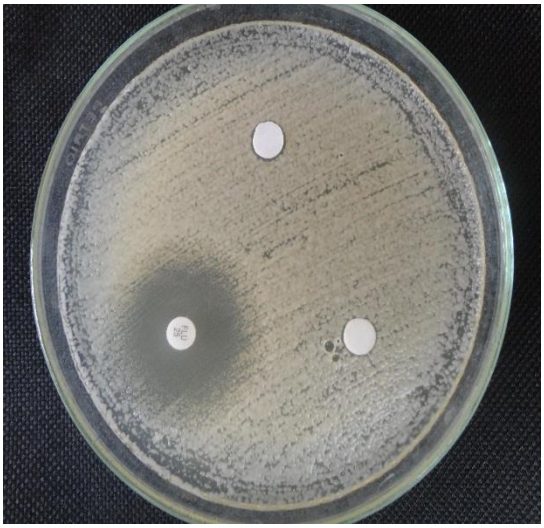


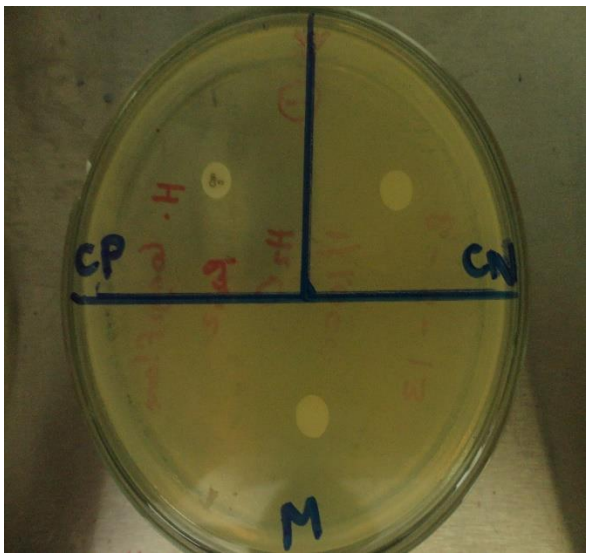


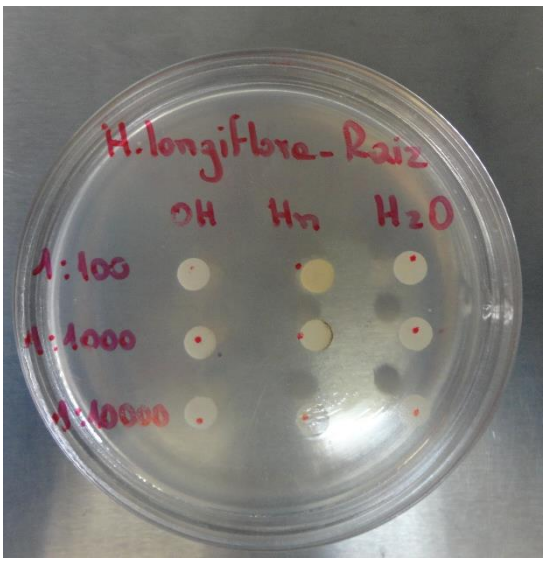




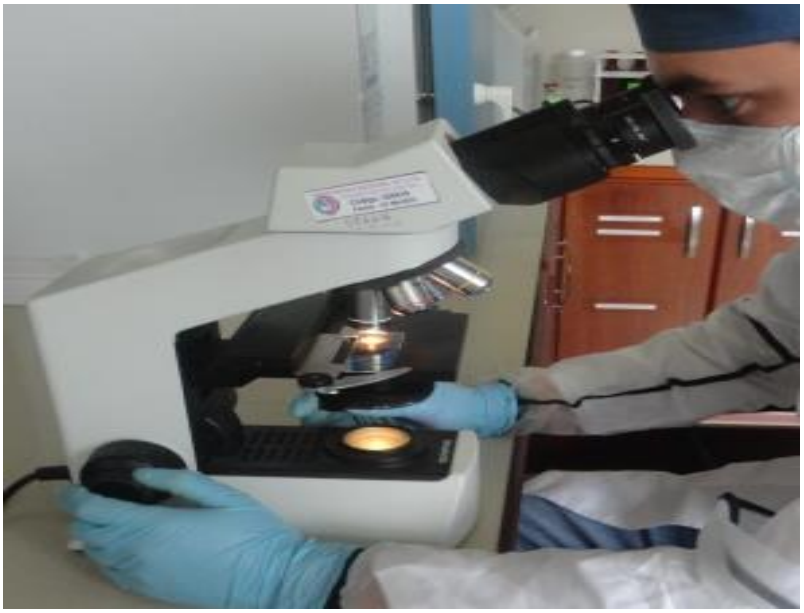
H. longiflora - Raiz
Hn 1:100
C. albicans
21-10-13
A

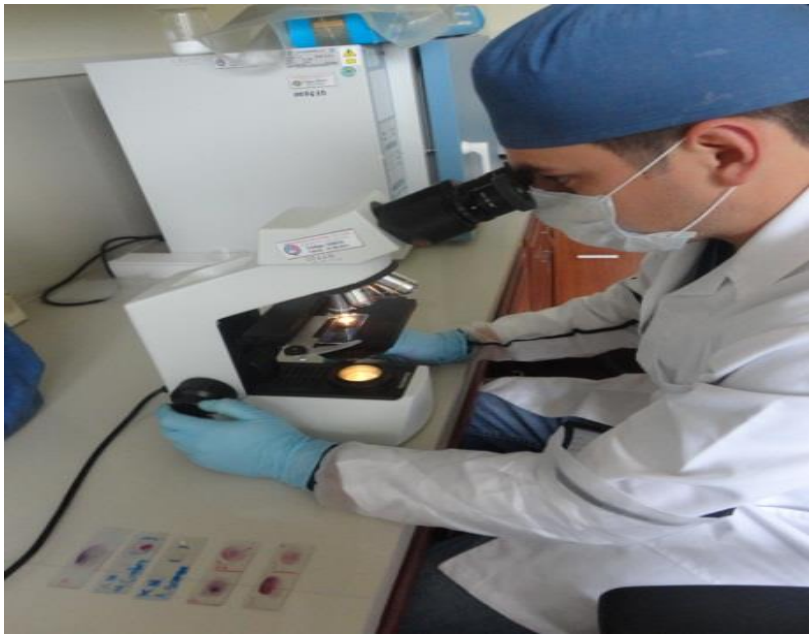



CP
CN
M


H. longiflora - Raiz
OH
Hn
H2O
1:100
1:1000
1:10000

ANALISIS MICROSCÓPICO DE LAS CEPAS UTILIZADAS





DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Anexo 10

Protocolos del laboratorio de la Unidad de Fitoquímica del CISAQ

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

   Aplicación: Técnico de Laboratorio, estudiantes/tesistas, pasantes.

   Verificación: Responsable del laboratorio de Fitoquímica.

   Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

5. **PROCEDIMIENTO:**

Requisitos previos a la recolección:

Personal Técnico:

- Botánico
- Guía
- Colector(es)

Instrumentos/equipos:

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

a) Recolección y transporte

1. Determinar de antemano las mejores condiciones para la colección de la parte de la planta (droga vegetal) a estudiar:

   a) **Hojas**: Se colectan generalmente cuando la fotosíntesis es más activa, cuando están verdes, antes y durante la floración y antes de la maduración de los frutos.

   b) **Flores:** Antes o durante la época de polinización.

c) **Frutos:** Generalmente cuando ya están de desarrollados o cuando están verdes o maduros.
d) **Semillas:** Cuando el fruto ya está maduro, antes de que expulse las semillas.
e) **Corteza:** Cuando empiezan los proceso vegetativos, cuando hay más circulación de sabia.
f) **Raíces y rizomas:** Cuando finalizan los procesos vegetativos.

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

b) Secado

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

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

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

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

   Verificación: Responsable del Laboratorio de Fitoquímica.

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

   a) Pesar una cantidad preestablecida de droga seca previamente molida.

   b) Colocar la droga pesada en un recipiente de vidrio provisto con tapa con cierre hermético y agregar el solvente elegido en pequeñas cantidades hasta unos 2 cm por sobre la superficie de la droga.

   c) 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).

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 aíre del sistema.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

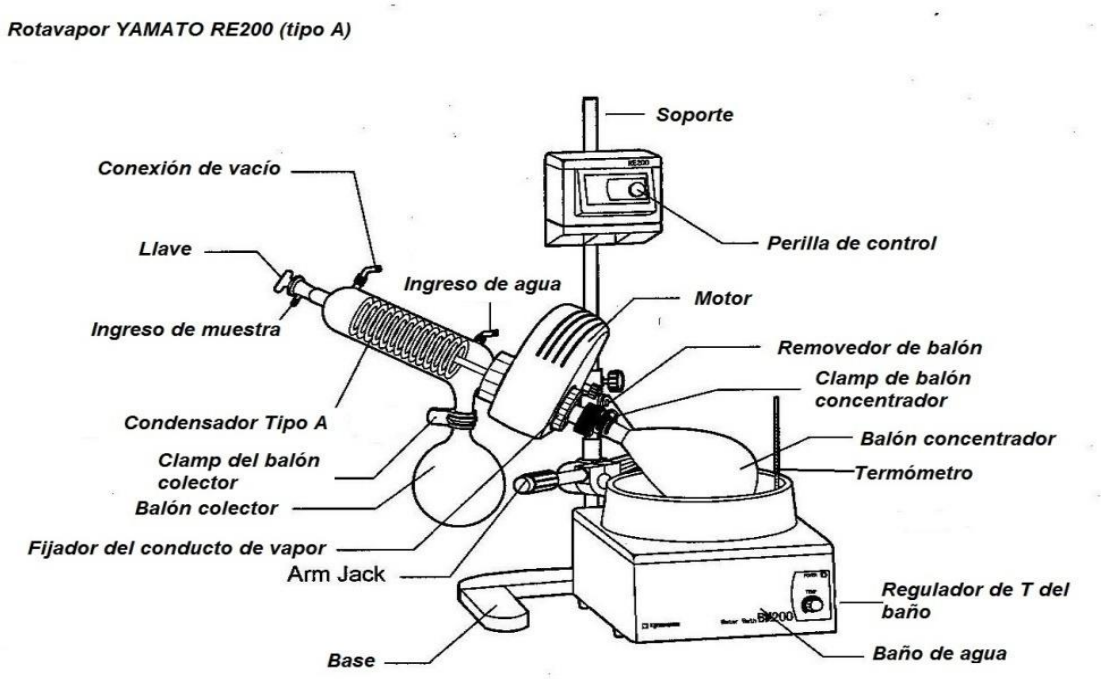
o) Deposite en contenido del balón concentrador en un cristalizador o recipiente adecuado para proceder al secado final o liofilización.

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



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

Anexo 11

Protocolos de la Unidad de Microbiología del Laboratorio de Análisis Químico

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 actividadpráctica en el Laboratorio, donde se requiera la manipulación de cultivos de microorganismos, los cuales pueden alcanzar concentraciones muy elevadas y puedenllegar a provocar una infección si no son manipulados adecuadamente.

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Normas de Bioseguridad para el Laboratorio de microbiología**	- El acceso al laboratorio estará limitado solo al personal autorizado. - En la zona de laboratorio no se permitirá comer, guardar alimentos, beber, fumar, ni usar cosméticos. - Las superficies de trabajo se deben descontaminar antes y después de cada jornada de trabajo y siempre que haya un derrame. - Utilizar cabina de bioseguridad biológica, no olvidar encender la lámpara y el flujo antes de abrir la ventana. - Colocar el símbolo de riesgo biológico en las áreas biocontaminadas. - No guardar alimentos en las neveras ni en los equipos de refrigeración de trabajo deben ser confortables.

		- El transporte de las muestras dentro o entre laboratorios se realizará en cajas herméticas, para evitar que se produzcan salpicaduras. - Todos los cultivos se autoclavan antes de ser eliminados. - Todos los desechos biológicos ya sean líquidos o sólidos deben ser descontaminados antes de eliminarlos.
2	**Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio**	- Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos. Evitar distracciones. - En el laboratorio de microbiología se prohíbe el ingreso con teléfono celular y pertenencias personales, el ingreso al laboratorio será solo con el uniforme específico de bioseguridad. - Nunca se pipeteará con la boca. - Todo el personal se lavará las manos al ingresar al laboratorio y después de haber manipulado material y al salir del laboratorio. - Quitarse los guantes para utilizar equipos o instrumentos no contaminados como teléfonos, computadoras, y material de escritorio - Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito. - El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido. - Emplee mascarilla y protectores oculares durante procedimientos que salpicaduras, aerosoles o derrames importantes de sangre u otros líquidos orgánicos. - Absténgase de tocar con las manos enguantadas alguna parte de su cuerpo puedan generar salpicaduras o gotitas aerosoles de sangre u otros líquidos corporales. - Evite la atención directa de pacientes si usted presenta lesiones exudativas o curitas. - Mantenga actualizado su esquema de vacunación contra Hepatitis B.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- ✓ Garcés A. Normas de seguridad en el laboratorio de microbiología. Abril 2008
- ✓ OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3era edición. Ginebra. 2005. Pags 89-90
- ✓ Vega E. normas de bioseguridad del Sistema Nacional de Laboratorios de Diagnóstico. 2002. Pág. 31-32.
- ✓ Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ra edición; Organización Mundial de la Salud Ginebra Suiza, 2005 En: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf; consultado el 20 de Abril Del 2013.

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

Agar Sangre: Medio para propósitos generales, para el aislamiento y cultivo de todas las bacterias de importancia clínica, excepto las más exigentes. Con la adición de sangre, el medio es útil para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis. El medio consiste en una base que contiene una

fuente de proteínas, digerido proteico de soja, cloruro de sodio, agar y sangre de carnero al 5%.

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer las instrucciones de preparación del agar sangre (casa comercial SCHARLAU), según la cual se debe suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido.

		Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Colocación de la sangre humana desfibrinada**	Enfriar el medio de cultivo preparado hasta la temperatura entre 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5% y homogenizar.
6	**Distribución del medio de cultivo y solidificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
7	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
8	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Los medios de cultivo en microbiología: disponible en http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/medioscult/_madre_medios.html Consultado 20 de noviembre de 2011 18:00
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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

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

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

RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

3. DEFINICIONES:

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

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

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

Agar Mac-Conkey: Medio de cultivo usado para el aislamiento selectivo de entero bacterias, se caracteriza por contener lactosa y un indicador de cambio de pH que detecta la actividad fermentadora sobre este azúcar, que vira a rojo ladrillo en medio acido. Las sales biliares y

el cristal violeta actúan como inhibidores, además este medio tiene sustancias inhibidoras de Gram-positivos.

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

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

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

4. **METODOLOGÍA:** Lapreparación 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 las instrucciones del envase para la preparación de Agar Mac Conkey (casa comercial HIMEDIA), según la cual se debe suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
		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

2	**Pesaje**	destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se cierran adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pag 64
- Prats Pastor G. Microbiología Clínica. 1era edición. Editorial medica panamericana. Madrid 2007
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

Condiciones necesarias para la preparación del agar Mueller-Hinton

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

  Si el pH es menor de 7,2, parecerá que algunos antibióticos pierden potencia (por ejemplo aminoglucósidos y macrólidos), mientras que otros agentes pueden mostrar una actividad excesiva (ej., tetraciclinas). Si el pH es mayor de 7,4 se espera el efecto opuesto.
- **Humedad**: Si las placas a utilizar presentan humedad excesiva deben colocarse en una estufa (35 ºC) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos).

Medio de cultivo: Es cualquier sustancia líquida o sólida que puede utilizarse en el laboratorio para el crecimiento de microorganismos. Cualquiera que sea el medio debe incluir todo lo necesario para el crecimiento, lo cual varía según el organismo que se quiere

cultivar, pero que comprende: agua, compuestos nitrogenados, una fuente de energía y otros factores de crecimiento. Los requerimientos nutricionales de las bacterias varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee las instrucciones del envase para la preparación de Agar Mueller-Hinton (casa comercial SCHARLAU), por cada 1 litro de preparación debe haber 38 g de polvo. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
		Colocar 5ml de medio de cultivo en un tubo de ensayo, esperar que se solidifique, introducir una

5	**Medición del pH.**	varilla, realizar un orificio y con la ayuda de la aguja del potenciómetro introducir en el orificio del agar y medir el pH; que oscile ente (7,2 ± 0.2 a 7,4), a temperatura ambiente (25ºC).
6	**Distribución del medio de cultivo y solidificación.**	Verter con ayuda de una probeta de 25ml del medio recién preparado en una placa de petri, colocadas sobre una superficie horizontal nivelada para obtener una profundidad uniforme de aproximadamente 4mm. Esto corresponde a unos 60 ml a 70 ml del medio para las placas cuyo diámetro sea de 150mm, y unos 25ml a 30 ml para las placas de 100 mm de diámetro. Ya sólidas, se cierran adecuadamente, Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
7	**Control de calidad del medio de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva. Comprobar si hay signos de deterioro como: contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, o agrietamiento en el medio de cultivo el lote debe ser eliminado.
8	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado. La duración de este medio de cultivo es de 7 a 14 días.

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

7. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10, 198 y 199.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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

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

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

3. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. DEFINICIONES:

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

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

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

Agar Champan Manitol: Medio selectivo- diferenciador de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus,* inhibiendo el crecimiento de otras bacterias al utilizar una alta concentración de sal. Al adicionar cloruro de sodio al 7.5% actúa como inhibidor y no permite el crecimiento de ningún otro microorganismo, las peptonas y el extracto de carne que contiene este medio

proporciona la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El rojo de fenol actúa como indicador de pH y el agar es un agente solidificante. Las colonias de *Staphylococcus aureus* fermentan el manitol, son amarillas o anaranjadas.

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

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

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

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

6. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer las instrucciones del envase para la preparación del agar champan manitol (casa comercial SCHARLAU), según la cual se debe suspender 111 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
		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

2	**Pesaje**	destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo y solidificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 24.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pág. 67
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

Agar Cetrimide: Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento e identificación del género Pseudomonas (principalmente *P. Aeruginosa)*; y que sobre la base de este agarse promueve tanto la producción de la piocianina como la fluoresceína. Esta última solo puede observarse bajo una lámpara de luz ultravioleta. Contiene cetrimide, que es el agente selectivo contra flora microbiana alterna (2).Está compuesto por digerido pancreático de

gelatina 20,0 g, Cloruro de magnesio 1,4 g, Sulfato de potasio 10 g, Agar 13,6 g, Bromuro de N-cetil N,N,N- Trimetil amonio (cetrimide) 0,3 g, Glicerina 10,0 mL, Agua destilada 1.000 mL, pH final 7,2 ± 0,2.

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación del agar cetrimide (casa comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de agua destilada que contenga 10 ml de glicerol, deben haber 46.7 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación.

		Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubadora bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Araceli García del Valle. Manual de Microbiología Médica. 1998. Pág. 229.
- María del Rosario Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2ª edición. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid-España. 2000. Pág. 304.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier. 2009. Pág. 162.
- Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias (http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf) consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: CALDO TRIPTICASA DE SOJA**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: caldo tripticasa de soja.

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación de caldo tripticasa de soja (casa comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de preparación deben haber 27.5 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este

		homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
2. Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

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

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación del agar tripticasa 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	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3		Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este

	Disolución del polvo a través de una plancha de calor.	homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, 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- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
2. Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

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

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR DEXTROSA SABOURAUD.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar dextrosa Sabouraud.

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación de Agar dextrosa Sabouraud (casa comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de preparación debe haber 65 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Mezclar utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este

		homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y solidificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles con probetas en una medida de 20ml en cada una, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

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

RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

3. DEFINICIONES:

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

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

El agar cerebro – corazón mantiene los mismos principios que el caldo para el cultivo de estreptococos y otras bacterias exigentes.

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

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

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación de agar cerebro corazón (casa comercial HIMEDIA), según la cual por cada litro de agua destilada debe haber 37g de agar. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.

		Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.[9.2i]
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	La preparación debe hervir hasta que tome un aspecto transparente. Evitar que se derrame.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	El matraz debe ser taponado con algodón o gasa, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca papel aluminio sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Esterilizar en autoclave a 121 ° C. se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en los tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

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

3. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. DEFINICIONES:

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

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

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

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

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

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

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

5. **METODOLOGÍA:** 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	**Lectura de las indicaciones**	Leer las instrucciones del envase para la preparación de medio citrato de Simmons, según la cual se debe suspender 24.3 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del medio, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3		Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este

	Disolución del polvo a través de una plancha de calor	homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Colocar los medios en una gradilla. Roturar con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Método de inoculación en el medio.**	Sembrar: punción y estría en pico de flauta con un pequeña colonia de crecimiento del microorganismo.
9	**Incubación del medio**	Colocar en incubación de 35 a 37ºC por 24 horas.
10	**Lectura de resultados**	La producción de un color azul en el medio indica la presencia de productos alcalinos y es un resultado positivo; y en caso de no haber viraje de color es negativo.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

Prueba bioquímica: consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes.

La identificación bioquímica se fundamenta demás en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

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

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación de agar triple azúcar hierro TSI. (Casa Comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de preparación deben haber 6.5 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de

		vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Método de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Se siembra en TSI primero por punción a través del centro del medio hasta el fondo del tubo y después por formación de estrías en la superficie del agar inclinado.

9	**Incubación del medio**	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35 ºC en aerobiosis por un tiempo de 18 a 24 horas.
10	**Lectura de resultados**	Agar inclinado alcalino/sin cambio de color en el fondo (K/NC) = no utilizador de la glucosa, lactosa y la sacarosa; esto puede registrarse como K/K (agar inclinado alcalino/fondo alcalino). Agar inclinado alcalino/fondo ácido (K/A)= fermentación de la glucosa solamente. Agar inclinado ácido/fondo acido (A/A)= fermentador de la glucosa, la sacarosa o la lactosa. La formación de CO_2 e H_2 es indicada por la presencia de burbujas o grietas en el agar. La producción de H_2S se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.

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

7. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO SULFURO INDOL MOVILIDAD (SIM).**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Sulfuro Indol Movilidad (SIM), como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación de sulfuro indol movilidad SIM (casa comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de preparación deben haber 36.23 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este

		homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml de medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya solidos se cierran adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Procedimiento de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Luego se realiza una picadura en el medio en forma vertical.
9	**Incubación del medio.**	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35-37 ºC en aerobiosis por un tiempo de 24 a 48 horas.
10	**Lectura de resultados.**	**Ácido sulfhídrico** Positivo: ennegrecimiento del medio Negativo: sin ennegrecimiento. **Indol** (añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs). Positivo: anillo rojo en la superficie del medio. Negativa: no se produce color. **Movilidad** Positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad.

		Negativa: crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea se siembra.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias (http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf) consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FENILALANINA DESAMINASA.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de fenilalanina desaminasa**,** como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

Prueba bioquímica: consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes.

La identificación bioquímica se fundamenta demás en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

Agar fenilalanina: Medio que contiene fenilalanina, empleado para determinar la presencia de la enzima fenilalanina desaminasa en las bacterias. El ácido fenilpirúvico resultante se detecta mediante la adición de cloruro férrico con el cual se forma un quelato de color verdoso entre el ácido fenil pirúvico y los iones Fe3+. Además el medio de cultivo, el extracto de levadura aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Leer las instrucciones del envase para la preparación de Agar, según la cual se debe suspender 23 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más

		exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una plancha de calor.**	Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad**	Realizar el control de calidad retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Procedimiento de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Sembrar con asa por agotamiento, estriando la superficie del medio.
9	**Incubación del medio**	Se deja la tapa floja y se Incuba de 18 a 24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.
		El análisis de los resultados debe realizarse dentro de los primeros 5 minutos.

10	**Lectura de resultados**	**Positivo:** desarrollo de color verde pálido a intenso en el pico de flauta y en el líquido de condensación. **Negativo:** sin cambios de color. El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Agar de Fenilalanina "http://www.mcd.com.mx/pdfs/agar_fenilalanina.pdf" 27 de Noviembre del 2011.
- Koneman, E. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ta ed. Editorial Médica Panamerica. Argentina 2008. Págs. 1401-1402.
- Guerrero F., Gamboa M., Mora J. & Rodríguez E.: Bacteriología Diagnóstica: Tinciones, Medios de Cultivos y Pruebas Diagnósticas. Oficina de Publicaciones, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Consultado el 20 de abril del 2013.

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CISAQ** **UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA**	**PR-PC-UNL.-015**

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

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

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

3 RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4 DEFINICIONES:

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

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

6 DESARROLLO:

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

		microorganismos grampositivos, la Interpretación debe hacerse con cuidado. Por ejemplo, los *estafilococos* son positivos para catalasa, mientras que los *estreptococos* y los *enterococos* son negativos.

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

7 BIBLIOGRAFÍA:

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

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CISAQ** **UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA**	**PR-PC-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 Staphylococus aureus, que es coagulasa positivo, del resto de especies de Staphylococus que son coagulasa negativa.

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

6 DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Preparación del material.**	Tubo de ensayo, lápiz graso, plasma, asa, incubadora y cepa en estudio.
2	**Suspensión de la cepa.**	Colocar 0.5ml de plasma en el tubo de ensayo luego con el asa coger de dos a tres colonias y suspender en el tubo, dejar reposar en la incubadora a 37ºC por 24 horas, en la mayoría de los casos si la bacteria es coagulasa positiva

		después de una incubación de 4 horas ya se observa el coagulo.
3	**Interpretación del resultado.**	Coagulasa positiva: formación del coagulo. Coagulasa negativa: no se observa la formación del coagulo.

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

8 BIBLIOGRAFÍA:

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

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

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CISAQ** **UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA**	**PR-PKOH** **UNL-017**

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 KOHse realiza tomando en cuenta la preparación en fresco, enfoque microscópico y visualización.

6. DESARROLLO:

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

1. TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN DE GRAM.

2. OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la realización de la tinción de Gram.

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

3. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. DEFINICIONES:

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

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

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

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

8. **BIBLIOGRAFÍA:**

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

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL TEST DE FILAMENTACIÓN.**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la realización del test de filamentación.

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

Suspensión: Acción y efecto de suspender o disolver.

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Suspensión del inóculo.**	Colocar un inoculo muy pequeño de una colonia aislada en 0,5 ml de suero.
2	**Incubación**	Incubar de 35 a 37ºC durante no más de 3 horas.
3	**Observación microscópica**	Después de la incubación se extrae una gota de la suspensión y colocarla sobre un porta y cubre objetos. Observar al microscopio con el lente de 40x.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

3 RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4 DEFINICIONES:

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

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

Patrón Mac Farland: es una 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 x 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

5 METODOLOGÍA: la preparación del Patrón Mac Farland se realiza a través de la mezcla de diferentes volúmenes de Ácido Sulfúrico al 1% (V/V) y de Cloruro de Bario al 1.175% (p/V), para obtener soluciones con densidades ópticas específicas.

6 DESARROLLO:

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

Tabla N.- 1
<table>
<tr><td>Tubo N.</td><td>Cl_2Ba (1%)</td><td>SO_4H_2 (1%)</td><td>U.F.C/ml</td></tr>
<tr><td>5</td><td>0.5</td><td>99.5</td><td>$1.5x10^8$</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>3</td><td>Calibración del Patrón N. 5 de Mc Farland por espectrofotometría.</td><td>Encender el espectrofotómetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar la suspensión en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.080 y 0.10. Es conveniente verificar mensualmente la turbidez de dicho Patrón.</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Almacenamiento y conservación.</td><td>Sellar los tubos y mantenerlos en refrigeración.
Cuando el fino precipitado blanco de Sulfato de Bario se sacude, cada tubo posee una densidad diferente que corresponde aproximadamente a cada suspensión bacteriana.</td></tr>
</table>

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

1 TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

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

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

3 RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4 DEFINICIONES:

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

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

- La cantidad de inóculo debe estar estandarizada por una técnica reconocida de modo que los controles sean comparables y reproducibles.
- No deje pasar más de 15 minutos después de preparar el inóculo.
- Verificar que la solución salina no esté contaminada, debe estar totalmente esteral.
- Para comprobar la calidad de la solución estéril, autoclavar en tubos adecuados una cantidad de 5 a 6 ml por un lapso de 20 minutos a 121 º C.

5 METODOLOGÍA: El inóculo se prepara por suspensión de las cepas en solución salina, equivalente al tubo 0.5 de la escala de 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.

2	**Suspensión de la cepa en la solución salina.**	Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina, o tener autoclavado la solución estéril para evitar 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	**Estandarización visual de la turbidez del inóculo.**	Comparar la turbidez de la suspensión del microorganismo con el Patrón No. 5 de Mac Farland, para lo cual se debe colocar juntos la suspensión bacteriana y el tubo de Mac Farland, observándolos contra un fondo de rayas negras. Es muy importante agitar bien los tubos antes de realizar este paso.
4	**Verificar la turbidez de la suspensión a través de un espectrofotómetro.**	Es conveniente el uso de un instrumento como el espectrofotómetro para realizar el control de calidad. Encender espectrofotómetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar el inóculo en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.085 y 0.10, adecuada para realizar el antibiograma. Si la suspensión bacteriana no presenta inicialmente la turbidez deseada, se la puede diluir o agregarle más microorganismos, según sea necesario.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento Microbiano*:* Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

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

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

Caracterización De Bacterias*:* Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la visualización macroscópicas (colonias), microscópicas (morfología), y a través, de la realización de pruebas bioquímicas, las mismas que determinan la actividad de una

vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

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

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***Staphylococcus aureus***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de chapman manitol, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de chapman manitol inoculado, a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de chapman manitol específico para ***Staphylococcus aureus***. Incubar a 37ºC durante 24 horas.

		Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Staphylococcus aureus*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *S. aureus.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, bordes enteros, prominentes, y brillantes. Sus colonias son de color amarillo dorado intenso por la fermentación del manitol, inclusive el medio se torna a amarillo. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** cocos Gram positivos, dispuestos en pares, tétradas o racimos, con morfología celular redonda. **Pruebas bioquímicas:** **Catalasa:** Positivo **Coagulasa:** Positivo

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez “Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes”.
- Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

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

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

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

3. RESPONSABLES:
Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.
Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.
Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.
Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. DEFINICIONES:

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento Microbiano*:* Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

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

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

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

Viabilización de Microorganismos*:* La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a

partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, y desarrollando sus funciones de una manera normal.

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Escherichia coli* ATCC 25922**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Escherichia coli* ATCC 25922 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***E. coli***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Mac Conkey, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Escherichia coli* ATCC 25922**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, específico para ***Escherichia coli***. Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Escherichia coli*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *E. coli.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, convexas, bordes enteros, crecimiento regular. Sus colonias son de color

		rosado o rojas con halo turbio, debido a la fermentación de lactosa en el Agar MacConkey. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** bacilos cortos Gram negativos. **Pruebas bioquímicas:** **TSI:** A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **SIM:** Movilidad (+), Indol (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **Citrato:** Negativo **Lisina:** Positivo **Fenilalanina:** Negativo **Urea:** Negativo

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

3. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. DEFINICIONES:

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento Microbiano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

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

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

Caracterización de Bacterias*:* Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la visualización macroscópicas (colonias), microscópicas (morfología), y a través,

de la realización de pruebas bioquímicas, las mismas que determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

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

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Klebsiella pneumoniae*** **ATCC 13883**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***K. pneumoniae***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Mac Conkey, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, específico para ***Klebsiella pneumoniae***

		Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Klebsiella pneumoniae*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *K. pneumoniae.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, muy mucoides, bordes enteros, crecimiento regular. Se observa la fermentación de lactosa en el Agar MacConkey donde las colonias son de color rosado. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** bacilos largos Gram negativos. **Pruebas bioquímicas:** **TSI:** A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **SIM:** Movilidad (-), Indol (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **Citrato:** Positivo **Lisina:** Positivo **Urea:** Positivo **Catalasa:** Positivo

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. Benintende, S.,"Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.

5. Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
6. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta 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.

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

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

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

3. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. DEFINICIONES:

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento Microbiano*:* Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

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

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

Caracterización de Bacterias*:* Se trata de la identificación de los microorganismos mediante la visualización macroscópicas (colonias), microscópicas (morfología), y a través,

de la realización de pruebas bioquímicas, las mismas que determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no.

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

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Pseudomona aeruginosa*** **ATCC 27653**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27653 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***P. aeruginosa***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Cetrimide, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Cetrimide inoculado, a 37º - 42º C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27653**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Cetrimide, específico para ***Pseudomona aeruginosa***. Incubar a 37ºC – 42ºC durante 24 - 48 horas.

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. Benintende, S.,"Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.

5. Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
6. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 257-258.
7. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".
8. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 4.

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

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.
Investigadores del proyecto: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aprobar el procedimiento.
Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.
Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

Cultivo Microbiano: Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable un medio óptimo de elementos físicos, químicos, y nutritivos adecuados para el crecimiento y multiplicación de células y microorganismos; es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y hongos.

Crecimiento Microbiano*:* Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, el incremento de la población y de la masa total de todo el conjunto de la población.

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

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

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

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Cándida albicans* ATCC 26790**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentra de

		positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC).
2	**Recuperación de *Cándida albicans* ATCC 26790 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***C. albicans***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 30 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Sabouraud, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Sabouraud inoculado, a 37º - 42º C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Cándida albicans* ATCC 26790**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Sabouraud, específico para ***Cándida albicans***. Incubar a 37ºC – 42ºC durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo .
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Cándida albicans*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y pruebas específicas de las mismas. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *C. albicans.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, bordes enteros, aspecto cremoso, mucoides, y de color blanco. **Características Microscópicas (morfología):** **Hidróxido de potasio (KOH):** esporas y levaduras aisladas y en gemación. **Otras pruebas:**

		Test de filamentación: Presencia de tubo germinal a las 2 horas.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de los discos.**	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN Nº 3 de 6 mm de diámetro.

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

1. TITULO: PREPARACION DE DISCOS DE SENSIBILIDAD.

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

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

4. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

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

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

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

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

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

7 DESARROLLO:

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

6. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Inoculación de las placas.**	- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente. - Rotular los medios de cultivo. - Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo (protocolo Nº 12), se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton (protocolo Nº 10), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar. - La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antimicrobiano (solución de extracto seco de drogas vegetales).
2	**Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada**	- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo Nº 18), sobre la superficie inoculada del agar. - Realizar por triplicado en la misma caja. - Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm. Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

3. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

6. **DESARROLLO**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Inoculación de las placas.**	- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente. - Rotular los medios de cultivo. - Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo (protocolo Nº 12), se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Sabouraud (protocolo Nº 8), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar. - La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antimicrobiano (solución de extracto seco de drogas vegetales).
2	**Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada.**	- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo Nº 18), sobre la superficie inoculada del agar. - Realizar por triplicado en la misma caja. - Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. - Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

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

4. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

Antibiótico: Sustancia antimicrobiana obtenida por el cultivo de un microorganismo o producida 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	**Dilución del inoculo.**	Se prepara el inoculo con las cepas en solución salina a una concentración similar al patrón 0.5 de la escala de MacFarland.
2	**Preparación de subdiluciones.**	Se colocan 8 tubos con 3 ml de caldo tripticasa soja, en el primer tubo se adiciona 1 ml del extracto que presente la inhibición en la actividad antimicrobiana, de este se extrae 1 ml y se realizan las diluciones sucesivas de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, hasta el tubo 6. En el tubo 7 se coloca un antibiótico conocido para el control positivo y en el tubo 8 se adiciona 1 ml de etanol al 70% que nos servirá como blanco
3	**Preparación de las muestras.**	En la diluciones anteriores se colocan en los 8 tubos 1ml del inoculo.
4	**Incubación.**	Se incuba 24 horas a 37ºC.
5	**Lectura de resultados.**	Se leen los resultados, en los que se considera como CMI la del tubo con mayor dilución del extracto que no presente aumento de turbidez respecto al tubo testigo utilizado como blanco.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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

4. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

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

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

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

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

CMB: Es la menor concentración de antimicrobiano capaz de eliminar una cepa bacteriana dada.

Variables biológicas de las pruebas del CMB:

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

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

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

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

8. **DESARROLLO:**

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

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

8. **BIBLIOGRAFÍA:**

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

ÍNDICE

CONTENIDO **PAGINAS**

CARATULA……..i

CERTIFICACIÓN……..…….…..ii

AUTORÍA…….…...iii

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS……..….iv

DEDICATORIA…….…….…....v

AGRADECIMIENTO……...…..……..…….…vi

1. TÍTULO…….……..…….....7

2. RESUMEN: ABSTRACT…….…….…….…….....8

3. INTRODUCCIÓN……10

4. REVISIÓN DE LITERATURA……13

5. MATERIALES Y MÉTODOS……..……..44

6. RESULTADOS……..……..……54

7. DISCUSIÓN……...……...……..64

8. CONCLUSIONES……...……..…….……..…..66

9. RECOMENDACIONES……...……..…..……..67

10. BIBLIOGRAFÍA…….……68

11. ANEXOS……...…….……73

12. ÍNDICE